

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES ASOCIADOS AL SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.) EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

ANA MARIA DE LA SOTA RICALDI

LIMA – PERÚ

2023

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 Reglamento de Propiedad Intelectual)**

Document Information

Analyzed document	TSP TCC- 27.11 - L.O 28.11.22.docx (D161467238)
Submitted	2022-11-30 00:59:00
Submitted by	Carmen del Pilar
Submitter email	olivia@lamolina.edu.pe
Similarity	8%
Analysis address	olivia.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/566951-crece-produccion-organica-en-peru-con-ma... Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 2
W	URL: https://www.redagricola.com.pe/fundo-sacramento-transita-por-el-camino-de-lo-organico/ Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 2
W	URL: https://www.fao.org/fileadmin/templates/organicag/files/Glossary_on_Organic_Agriculture.pdf Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 3
W	URL: https://www.redagricola.com.pe/la-efsa-modifica-los-lmr-fosfonato-potasio-arandanos/ Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 3
W	URL: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1182665/D.S.-N_-061-2006-AG20200802-1197146-1wp625a.pdf Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 9
SA	TESIS TOMATE finAL presentación para urkund ing Garces.docx Document TESIS TOMATE finAL presentación para urkund ing Garces.docx (D97374672)	 1
W	URL: https://sefa-agronutrientes.org/insumos-agricolas#:~:text=En%20el%20sector%20agropecuario%252C... Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 1
W	URL: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/FT_190417_v1%20-%20Preparados%20biodin%C3%A1m... Fetched: 2022-12-01 18:46:00	 1
W	URL: https://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/Agricola/Servicios/Coadyuvantes-y-Reguladores-Fisio... Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 2
W	URL: https://biolatina.com/wp-content/uploads/2022/08/GMP-INT-EIN-300722-v2.pdf Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 1
W	URL: https://www.fao.org/3/ad818s/ad818s00.htm#Contents Fetched: 2022-12-01 18:45:00	 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES ASOCIADOS AL SACHA INCHI (*Plukenetia
volubilis* L.) EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

ANA MARIA DE LA SOTA RICALDI

Tesis para optar título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Dr. Sady García Bendezú
PRESIDENTE

.....
Dr. Raúl Blas Sevillano
ASESOR

.....
Dr. Félix Camarena Mayta
MIEMBRO

.....
Ing. Mg. Sc. Jorge Tobaru Hamada
MIEMBRO

.....
Ing. Mg. Sc. Mike Corazon
Guivin
CO-ASESOR

**LIMA – PERÚ
2023**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, a Dios, por ser mi guía día a día, por darme las fuerzas para seguir adelante y por su gran amor y misericordia que son nuevas cada mañana.

A mis padres, por haberme apoyado incondicionalmente durante todo este tiempo con sus consejos, motivaciones, correcciones y económicamente. A mis hermanas por apoyarme en las decisiones tomadas, su gran cariño y el ejemplo que cada una son para mí.

Al Dr. Raúl Humberto Blas Sevillano, por su orientación a lo largo de la ejecución del presente trabajo de tesis y por haber tomado el asesoramiento del mismo.

Al Ing. M. Sc. Mike Anderson Corazón Guivin, responsable del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad de San Martín, por haberme guiado responsablemente y enseñado muchos de sus conocimientos a lo largo de la tesis.

Asimismo, hago llegar especial gratitud al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), por el financiamiento del proyecto “Identificación y validación de especies de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) nativos eficientes como BIOPROTECTORES y BIOFERTILIZANTES en los cultivos de café (*Coffea arabica* L.) y sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Región de San Martín”, del cual el presente trabajo formó parte.

Al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad de San Martín, por brindarme los ambientes, equipos e insumos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	CULTIVO DE SACHA INCHI	4
2.1.1.	Origen y distribución geográfica.....	4
2.1.2.	Clasificación botánica	5
2.1.3.	Morfología general.....	5
2.1.4.	Fenología.....	6
2.1.5.	Manejo agronómico.....	7
2.2.	MICORRIZA.....	9
2.2.1.	Tipos de micorriza.....	10
2.2.2.	Influencia de la especie hospedante y edad de las plantaciones sobre la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares.....	15
2.2.3.	Importancia del estudio del ADN en la clasificación de hongos micorrícicos	17
2.2.4.	ARN ribosomal 28S	17
2.3.	MARCADORES MOLECULARES.....	18
2.3.1.	Marcadores bioquímicos	18
2.3.2.	Marcadores de ADN.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1.	ÁREA DE ESTUDIO.....	24
3.2.	MUESTREO DE SUELOS Y RAÍCES	25
3.2.1.	Obtención de material biológico	25
3.3.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	26
3.4.	ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO.....	27
3.5.	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN DE HMA A LA RAÍZ.....	27
3.6.	PROCEDIMIENTOS BASADOS EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	28
3.6.1.	Extracción de ADN	28
3.6.2.	Amplificación en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa	29
3.6.3.	Electroforesis en gel de agarosa	29
3.6.4.	Mezcla equimolar y purificación del producto PCR.....	30
3.6.5.	Ligación y transformación bacteriana	30

3.6.6.	Selección de colonias positivas	31
3.6.7.	PCR de confirmación de clones con Taq KOD y cebadores FLR3 y NDL2231	
3.6.8.	Extracción de ADN plasmídico y secuenciamiento	32
3.6.9.	Análisis bioinformático	32
3.6.10.	Procedimientos basados en T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism).....	34
3.7.	ANÁLISIS DE RIQUEZA	38
3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
4.1.	ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LOS SUELOS.....	40
4.1.1.	Características generales	40
4.1.2.	Comparación de medias de las variables fisicoquímicas	42
4.2.	DETERMINACIÓN DE UNIDADES TAXONÓMICAS (OTU´s).....	43
4.2.1.	Biblioteca de secuencias.....	43
4.2.2.	Determinación de OTU'S.....	43
4.3.	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE HMA ASOCIADOS AL CULTIVO DE SACHA INCHI EN LAS PARCELAS MUESTREADAS	46
4.3.1.	Alineamiento de los filotipos	46
4.3.2.	Distribución y riqueza de OTU´s de HMA	48
4.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
4.2.1.	Análisis de Componentes Principales (ACP).....	51
4.2.2.	Análisis de correlación múltiple.....	59
4.2.3.	Análisis de conglomerados o clusters	64
V.	CONCLUSIONES	69
VI.	RECOMENDACIONES	70
VII.	BIBLIOGRAFÍA	71
VIII.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación espacial de las parcelas de sachá inchi muestreadas en la región de San Martín	24
Tabla 2. Edad de plantaciones de sachá inchi ubicadas en ocho parcelas en cuatro localidades de la región San Martín	26
Tabla 3. Análisis de suelo y comparación de medias de los parámetros fisicoquímicos del suelo de plantaciones productoras de sachá inchi de dos rangos de edad en cuatro localidades de la región San Martín	42
Tabla 4. Denominación de las OTU's representativas preliminares y las secuencias que agrupa al 97 % de similaridad	45
Tabla 5. Correspondencia de OTU's representativos pertenecientes ADN de HMA asociados a raíces de plantaciones de sachá inchi de dos rangos de edad en cuatro localidades de la región San Martín y secuencias de la base de datos GenBank	47
Tabla 6. Presencia y ausencia de los diferentes OTU's de HMA asociadas a raíces de cada planta de sachá inchi según rango de edad y localidad en la región San Martín	48
Tabla 7. Riqueza de HMA's registrados en raíces de plantas de sachá inchi según la edad en cuatro localidades de la región de San Martín	49
Tabla 8. Riqueza y OTU's reportadas según edad de parcela de producción de sachá inchi en cuatro localidades en la región de San Martín	50
Tabla 9. Porcentaje de variabilidad que explica cada variable en los dos primeros componentes principales	53
Tabla 10. Riqueza de OTU's en ocho parcelas de sachá inchi en cuatro localidades de la región San Martín	54
Tabla 11. Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables fisicoquímicas del suelo, los valores de riqueza de OTU's y grado de colonización micorrítica.....	59
Tabla 12. OTU's de HMA comunes entre plantas de sachá inchi de dos edades diferentes en cuatro localidades de la región San Martín sin mostrar especificidad por localidad o rango de edad	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las parcelas muestreadas de sachá inchi en cuatro provincias de la región San Martín (Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática - Censos Nacionales de Población y Vivienda).....	25
Figura 2. Agrupamiento al 97% de similitud entre 63 secuencias pertenecientes a ADN de HMA asociados a raíces de sachá inchi de dos rangos de edad diferentes de cuatro localidades de la región San Martín	44
Figura 3. Red filogenética y agrupamiento general bajo el enfoque de clados monofiléticos, en 13 unidades taxonómicas operativas (OTU's), a partir de las secuencias representativas de las 29 unidades taxonómicas preliminares	45
Figura 4. Curva de rarefacción de los 63 clones (eje X) y las 13 unidades taxonómicas (eje Y) obtenidas mediante el agrupamiento final.....	46
Figura 5. Agrupación de localidades en función a las variables fisicoquímicas del suelo, riqueza de OTU's y grado de colonización micorrízica.	51
Figura 6. ACP de las variables fisicoquímicas del suelo, porcentaje de colonización y riqueza y agrupamiento por localidades. Las flechas indican como dirigen cada variable la variabilidad de las parcelas. La longitud de cada flecha indica la fuerza con la cual dirige la variabilidad, por lo que se consideran más importantes para el estudio. Flechas cercanas entre sí, presentan una mayor relación.	52
Figura 7. Rangos de edad agrupadas en función a las variables fisicoquímicas del suelo, riqueza de OTU's y grado de colonización micorrízica. Las intersecciones, muestran características comunes. 1A= < a un año, 3A=>a tres años	55
Figura 8. ACP de las variables fisicoquímicas del suelo, porcentaje de colonización y riqueza y agrupamiento por rangos de edad. Las flechas indican como dirigen cada variable la variabilidad de las parcelas. La longitud de cada flecha indica la fuerza con la cual dirige la variabilidad, por lo que se consideran más importantes para el estudio. Flechas cercanas entre sí, presentan una mayor relación.	55
Figura 9. Gráfico de barras indicando la comparación de medias del grado de colonización micorrízica en plantas de sachá inchi en ocho parcelas de cuatro localidades de la región San Martín	57
Figura 10. Gráfico de puntos indicando la tendencia del número de OTU's (riqueza específica) de HMA en función a la edad de plantaciones de sachá inchi en cuatro localidades de la región San Martín	58

Figura 11. Agrupamiento de plantas en función de la composición de la comunidad de HMA. No se observa formación de grupos en función a la localidad de muestreo o al rango de edad. Cada rama de diferente color, comparte como mínimo cinco OTU's.	65
Figura 12. Presencia de OTU's en raíces de plantas de sachá inchi.....	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos generales de ocho parcelas de sachá inchi en la región San Martín .	91
Anexo 2. Protocolo para purificación de ADN con el kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification	92
Anexo 3. Protocolo para ligación del fragmento de ADN en el Vector PCR 2.1-TOPO	94
Anexo 4. Protocolo para transformación bacteriana en Células E. coli TOP 10 químicamente competentes por shock térmico.....	95
Anexo 5. Protocolo del QIAprep Spin Miniprep Kit	96
Anexo 6. Protocolo para purificación de ADN de 40 pb a 50 kb a partir de soluciones acuosas.....	97
Anexo 7. Análisis fisicoquímico del suelo en parcelas de sachá inchi de cuatro localidades de la región San Martín	98
Anexo 8. Árbol filogenético y clustering al 97 % de secuencias de clones de HMA en asociación con raíces de sachá inchi.....	100

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses benéficos asociados a diversas especies de plantas en distintos hábitats. En la región San Martín el sachá inchi es un cultivo que estaría en interacción con comunidades de HMA, sin embargo su composición aún es desconocida. Por ello, se plantearon los siguientes objetivos: 1) identificar HMA mediante T-RFLP, 2) comparar la composición de las comunidades de HMA presentes en raíces de plantas de sachá inchi, según la localidad y edad de la planta y 3) determinar la correlación entre las características fisicoquímicas del suelo con el grado de colonización y riqueza de HMA. Por esta razón, se realizaron muestreos de raíces en cuatro localidades de la región San Martín: Lamas, El Dorado, Picota y Bellavista; en dos parcelas por localidad, una con plantaciones menores a uno y otra, mayores a tres años de edad. La identificación molecular de HMA, se realizó mediante la técnica T-RFLP. Los datos fueron analizados utilizando herramientas de correlación, análisis multivariado ACP y de conglomerados. Se identificaron un total de 13 unidades taxonómicas (OTU), tres, a nivel de especie: *Glomus trimurales*, *Oehlia diaphana* y *Acaulospora tuberculata*; siete y tres como género y familia, respectivamente. No hubo diferencias en la composición de comunidades de HMA, entre las localidades, ni entre rangos de edades. El grado de colonización, mostró una correlación positiva con la C.E., pH, contenido de CaCO₃, Mg en el suelo y porcentaje de saturación de bases; y negativa con la altitud de la parcela. La riqueza de HMA mostró una correlación positiva con la concentración de Ca en el suelo, suma total de cationes y CIC; y negativa con el contenido de K total y disponible. Estos resultados serán importantes, debido a que servirán como base para estudios posteriores relacionados al manejo sustentable del cultivo de sachá inchi.

Palabras clave: Identificación molecular, Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), sachá inchi, Unidad Taxonómica Operativa (OTU), T-RFLP.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are symbionts associated with a large number of plants in different hábitats, benefitiating each other. In the San Martín region, sachá inchi is a crop that would interact with AMF communities, however its composition is still unknown. Based on this, the aims of present work are: 1) identify AMF using T-RFLP, 2) compare the composition of the AMF communities in roots of sachá inchi plants, according to location and age of the crop and 3) determine the relationship between physicochemical characteristics of soil with the degree of colonization and richness of AMF. Therefore, root samples were taken in four locations in the San Martín region: Lamas, El Dorado, Picota and Bellavista; in two plots per locality, one with plantations smaller than one and another, older than three years of age. The T-RFLP technique was used to identify, based on cut sizes in DNA sequences. Data were analyzed using correlation tools, multivariate analysis of PCA and clustering. 13 Operative Taxonomic Units (OTU) were identified, three at the species level: *Glomus trimurales*, *Oehlia diaphana* and *Acaulospora tuberculata*; seven and three as genus and family, respectively. No differences were found in the composition of AMF communities, between the four locations or the two age ranges. On the other hand, the degree of mycorrhizal colonization was positively correlated with C.E., pH, CaCO₃ and Mg content, of the soil and base saturation percentage, and negatively with the altitude of the plot. The richness of HMA was positively correlated with content of Ca, total sum of cations and CIC, and negatively with the total and available K content. These results will be important, since they will serve as a basis for further studies related to the sustainable management of sachá inchi cultivation.

Keywords: Molecular identification, Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), sachá inchi, Operative Taxonomic Units (OTU), T-RFLP.

I. INTRODUCCIÓN

La región San Martín está ubicada en la selva norte del Perú. Tiene una superficie agrícola de 498 mil hectáreas, de las cuales 95 mil (19%) son empleadas para cultivos transitorios y 191 mil (38%), para cultivos permanentes (INEI, 2012).

Una de las especies que se cultiva de forma transitoria es el sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), el cual ha ido adquiriendo una sustancial importancia en los últimos años, debido al alto valor nutricional de sus semillas, las cuales contienen 48.6% de lípidos polinsaturados esenciales (linoleico y linolénico), 29% de proteína (Arévalo, 1999), omega 9, vitamina E (tocoferoles y tocotrioles) y antioxidantes (Gutiérrez *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2013; Srichamnong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018); atributos que lo han convertido en un cultivo con un gran potencial para el mercado externo. Esta especie pertenece al género *Plukenetia*, y familia Euforbiácea, es de origen amazónico y tiene una distribución pantropical (Molano *et al.*, 2016). Su distribución en América, abarca principalmente los países de Perú, Bolivia, Surinam, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil; donde se desarrolla en las zonas que presentan las características ideales para su crecimiento como: altitud comprendida entre 30 y 2000 m.s.n.m., clima tropical o sub-tropical y temperaturas que oscilan entre 10 a 26°C. En el Perú se cultiva de forma tradicional principalmente en los departamentos de San Martín, Ucayali, Madre de Dios y Loreto (Márquez *et al.*, 2007); con una superficie sembrada de 1569 ha. La producción de este cultivo es de 2255 t, alcanza un rendimiento de 1.4 t/ha y un precio promedio de 7.17 S/./kg en chacra a nivel nacional (Albújar, 2018).

Sin embargo, para instalar este y otros cultivos en la selva, los agricultores generalmente realizan la labor del rozado y quema. Esta actividad está ocasionando el empobrecimiento y erosión de los suelos debido a la deforestación y a la alteración de la microbiota del suelo. Asimismo, rompe el equilibrio y ciclaje de nutrientes de forma natural, lo que se traduce en mermas de la producción y finalmente en el abandono de tierras (MINAM -SINIA, 2009). Ante este escenario, la estabilidad de estos ecosistemas está influenciada por la composición y la actividad de la microbiota. Parte de la riqueza de estos organismos está constituido

por los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), definidas como asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre hongos del suelo y plantas. Probablemente se trata del tipo de simbiosis más importante, ya que casi todas las plantas de hábitats templados y tropicales pueden asociarse con los hongos formadores de micorrizas (Smith & Read, 2008; Brandán de Weht *et al.*, 2013). Los beneficios que estos proporcionan a la planta hospedante son diversos. Adquieren un rol importante en la nutrición de la planta, debido a que el hongo contribuye con la absorción de nutrientes minerales del suelo (nitrógeno y fósforo) e iones poco móviles (fosfato, amoníaco, zinc, cobre), a través de un sistema de hifas (Castro, 2009). Además, permite a la planta absorber y asimilar más agua, favoreciendo de esta manera el balance hídrico (Barrera, 2009). En respuesta a lo mencionado, la planta cede al hongo compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis (Berruti *et al.*, 2015). Por otro lado, contribuyen a la protección de las mismas frente a patógenos del suelo, brindan una mayor tolerancia frente a estreses abióticos (salino, hídrico) y a metales pesados en suelos moderadamente contaminados (Van Tichelen *et al.* 2001; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Ruiz-Lozano 2003; Sánchez *et al.*, 2017).

Por lo mencionado anteriormente, los HMA han llegado a considerarse casi como una relación obligada para el crecimiento de las plantas, en condiciones naturales y en sistemas agrícolas que se encuentran degradadas, gracias a que intervienen en la regeneración de estos sistemas y mantienen el equilibrio del ecosistema, lo cual viene promoviendo diversos estudios que permitan conocer sus posibles aplicaciones como inoculantes (León, 2006; Guerra, 2008). Sin embargo, los HMA poseen una gran diversidad y su funcionalidad puede depender incluso del género o especie. Asimismo, pueden mostrar un nivel considerable de selectividad al asociarse con diferentes especies o grupos ecológicos de plantas, incluso a diferentes edades (Daniell *et al.*, 2001; Santos-González *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2007; Öpik *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 2011). Por esta razón, es necesario realizar estudios básicos de identificación en determinados cultivos y en condiciones naturales para que en función a ellos, se realicen posteriores estudios aplicativos tanto para la agricultura como para desarrollar técnicas de conservación de suelos. Asimismo, determinar si existe influencia de la edad de la planta sobre la composición de estos organismos, para observar su adaptabilidad a lo largo del tiempo.

En este sentido, el presente trabajo busca determinar la influencia de la edad del cultivo y la localidad sobre la composición de los HMA en el cultivo de sachá inchi, por lo cual se

plantearon los siguientes objetivos: 1) identificar Hongos Micorríticos Arbusculares mediante T-RFLP en el cultivo de sachá inchi, 2) Determinar la influencia de la edad del cultivo de sachá inchi sobre el grado de colonización, la riqueza y la composición de la comunidad de HMA asociadas al cultivo, 3) Determinar la influencia de las variables físicoquímicas del suelo de plantaciones de sachá inchi sobre el grado de colonización, la riqueza y la composición de la comunidad de HMA asociadas al cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.CULTIVO DE SACHA INCHI

2.1.1. Origen y distribución geográfica

El sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una especie de origen amazónico. Pertenece al género *Plukenetia*, el cual se originó en dos posibles lugares: en la selva amazónica o atlántica de Brasil durante el Oligoceno (28.7 millones de años) y se dispersó entre estas regiones, América Central y México en todo el Mioceno (Cardinal *et al.*, 2019). Este género comprende plantas tropicales de la familia Euphorbiaceae y contiene 19 especies, de las cuales entre siete a doce han sido reportadas en América Tropical (Stanley & Steyemark, 1949; Hutchinson, 1969; Axtell & Fairman, 1992).

La distribución del género *Plukenetia* es pantropical. Según Cardinal *et al.* (2019), se dispersó desde el Amazonas hasta África y de África a Madagascar y al Sudeste Asiático. Por otro lado, en América del Sur, la especie *Plukenetia volubilis* L., ha sido registrada en la selva amazónica de Perú, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Antillas menores, Surinam y Venezuela (Macbride, 1951; Correa & Bernal, 1992). En nuestro país se ha encontrado de forma silvestre y está distribuido en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Amazonas, Ucayali, Loreto, Junín, Pasco, Cusco y alrededores de Iquitos (Brako & Zarucchi, 1993). En la región San Martín se encuentra a lo largo de la cuenca del Huallaga hasta Yurimaguas, en el Alto Mayo, Bajo Mayo, subcuenca del Cumbaza y en áreas del sector Lamas Shanusi. y Pongo de Cainarachi (Correa & Bernal, 1992). A nivel de la región, su cultivo generalmente está determinado bajo un sistema de monocultivo, es decir no se encuentra asociado a otros cultivos o especies forestales.

2.1.2. Clasificación botánica

La clasificación botánica (Martínez *et al.*, 2002; Diaz, 2014; Vasquez & Rojas, 2016), es la siguiente:

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Acalyphoideae

Tribu: Plukenetieae

Subtribu: Plukenetiinae

Género: *Plukenetia*

Especie: *Plukenetia volubilis* L.

Los nombres comunes utilizados para referirse a esta especie varían de acuerdo al idioma o lugar, entre ellos destacan los siguientes: sacha inchi, sacha inchic, sacha maní, maní del monte y maní del inca (Arévalo, 1999).

2.1.3. Morfología general

Es una planta trepadora, semileñosa y perenne que alcanza una altura de 2 m aproximadamente. Sus hojas son alternas y simples; la forma de la lámina foliar es acorazonada, de base truncada y puntiaguda y posee márgenes aserrados; el tamaño de estas varía entre 6 a 13 cm de largo y de 4 a 10 cm de ancho, con peciolo de 2 a 6 cm de largo. Las nervaduras nacen en la base de la hoja, la central se orienta hacia el ápice (Macbride, 1938; Valles, 1990; Dostert *et al.*, 2009). Pueden presentar una estípula, en la base de la hoja (Arévalo, 1999).

La inflorescencia es racemosa y monoica; generalmente su longitud varía entre 5 a 18 cm de largo. A lo largo de esta se encuentran las flores masculinas, se caracterizan por ser pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos. En la base del racimo y lateralmente, se encuentran de una a dos flores femeninas (Manco, 2006).

El fruto es una cápsula de 3 a 5 cm de diámetro, de color verde; una vez maduros son de color marrón negruzco y dehiscente. Usualmente están formados por cuatro lóbulos aristados. En otros casos, los frutos pueden presentar de cinco, a siete lóbulos (Manco, 2006).

La semilla se encuentra dentro de cada lóbulo; es de forma ovalada, de 1.5 a 2 cm de diámetro, ligeramente abultada en el centro y aplastadas hacia los bordes, con un hilum bien diferenciado; el color es marrón oscuro; posee nervaduras notorias y su peso varía entre de 48 a 100 g. Al abrirlas encontramos los cotiledones a manera de almendras y cubiertos de una película blanquecina (Valles, 1990; Arévalo, 1999).

2.1.4. Fenología

La fase de la germinación, tiene una duración de aproximadamente dos semanas, dependiendo del tipo de siembra. En condiciones de almácigo, dura aproximadamente entre 11 a 14 días después de la siembra (d.d.s.); mientras que, si se siembra de forma directa, dura entre 14 a 16 días (Arévalo, 1999; Manco, 2008).

La fase de emisión de guías, dura entre 48 a 50 días d.d.s., cuando la siembra fue directa. Por otro lado, si la siembra fue indirecta, esta fase durará entre 20 a 41 días después del trasplante (d.d.t.) (Manco, 2008).

La primera floración, inicia a los tres meses d.d.s. Posteriormente se emitirán más flores, a partir de los 88 a 135 d.d.s, en siembra directa y de 86 a 139 d.d.t., en siembra indirecta. Inicialmente aparecen los primordios florales masculinos e inmediatamente después los femeninos. Las flores completan su diferenciación floral en un período de 7 a 19 días (Arévalo, 1999; Manco, 2008).

El inicio de fructificación, empieza a partir de los 122 a 168 d.d.s o 119 a 182 d.d.t. Posteriormente, los frutos completan su desarrollo aproximadamente cuatro meses de la floración. Al final de esta fase, los frutos cambiarán del color verde a un color marrón oscuro. En este punto, el fruto está listo para ser cosechado. La cosecha, inicia a partir de los 180 a 220 d.d.s., en siembra directa y de 202 a 249 d.d.t., en siembra indirecta, a partir de esta fase, la fructificación se dará de forma continua (Arévalo, 1999; Manco, 2008).

2.1.5. Manejo agronómico

En la selva peruana, el cultivo de sacha inchi se desarrolla mayormente en monocultivo, pero también se puede encontrar sistemas agroforestales o asociado a otros cultivos anuales o perennes como el café o cacao, siempre y cuando no generen sombra que afecte el desarrollo de estos. Su establecimiento se da principalmente en bosques secundarios, posteriores a cultivos de subsistencia como maíz o plátano o en tierras abandonadas (Manco, 2008; IIAP, 2009).

Las labores culturales inician con la preparación del terreno, para ello se empieza con el macheteo para remover los restos del cultivo anterior o bosque secundario, ya que generalmente, este cultivo se instala en tierras abandonadas o después de cultivos de subsistencia. Posteriormente se troza y se distribuyen uniformemente en todo el terreno. Previo a la siembra, es importante trazar los caminos y el sistema de drenaje (Arévalo, 1999).

La siembra se determina en base a la época lluviosa, entre los meses de diciembre a marzo, debido a que este cultivo se establece de forma tradicional, bajo condiciones de secano. Mientras que, para cultivos bajo un sistema de riego, se puede sembrar en cualquier época del año. Esta labor se realiza de dos formas: directa, cuando la semilla se coloca directamente en el suelo e indirecta, cuando la semilla se germina en almácigo. Cuando la siembra se realiza de forma directa, se puede utilizar la semilla sin ser escarificada, siempre y cuando está fresca. La cantidad de semilla a usar varía entre 1 a 4.5 kg/ha; el distanciamiento entre golpes es de 3 m y la profundidad de siembra de 2-3 cm. Cuando la siembra es de forma indirecta, el almacigado se debe realizar de 1 a 4.5 meses antes del trasplante, en almacigueras con arena de río y tierra negra de bosque como sustrato o bolsas de polipropileno, a una profundidad de 1.5 a 2 cm. El trasplante se realiza antes de la aparición de guías. Ambas formas de siembra, se deben realizar de 45 a 60 días antes del inicio de lluvias (Manco, 2008).

Por ser una especie trepadora, necesita de un tutor para poder desarrollarse, en este sentido existen dos tipos de tutores generalmente utilizados:

- a. Tutor vivo. - se utiliza ramas maduras de especies como *Erythrina* sp., caracterizada por su crecimiento rápido. Ésta debe ser sembrada a una profundidad de 30 a 50 cm y al mismo distanciamiento que el sacha inchi (Manco, 2008; PBD, 2009).

- b. Tutor muerto. - se utiliza postes secos de madera, con una longitud de 3 a 3.5 m, estos serán enterrados a una profundidad de 0.7 a 0.8 m cada 3 m x 6 m. En ellos se tiempla dos filas de alambres que servirán como tutor; a este sistema se le llama sistema de espalderas (Manco, 2008; PBD, 2009).

Para ambos casos, la planta de sachá inchi, debe estar separada a una distancia de 20 cm con respecto al tutor.

La densidad de siembra, puede variar entre 1111 y 1333 plantas/ha. Para ello, el distanciamiento entre plantas será de 3 x 3 m y 3 x 2.5 m en un diseño de plantación tipo tresbolillo respectivamente. Esto dependerá del tamaño de semilla que se tiene y de la productividad que se espera (Arévalo, 1999; Manco, 2008).

Si bien es cierto, esta especie posee cierta adaptación a las diferentes condiciones de suelo, pero se podría realizar adicionalmente aplicaciones de NPK al suelo, en base a un análisis de suelo. También se recomienda aplicar entre 2 a 3 t/ha/año de humus de lombriz (Manco, 2008).

Para obtener plantas bien conformadas, incrementar la producción y facilitar la cosecha, se realiza la poda. Esta labor se realiza con tijeras de mano debidamente desinfectadas. Normalmente se practican dos tipos de poda (Arévalo, 1999):

- a. De formación: Para eliminar ramas o guías, esta puede ser a 0.5 cm de altura cuando el sistema de tutoraje es el vivo y de 0.3 a 0.7 cm cuando el sistema es con tutores muertos (Manco, 2008)
- b. De producción: Para eliminar ramas secas o enfermas. Normalmente se realiza en la etapa productiva cada 30 días. Cuando se está utilizando tutores vivos, es importante realizar la poda del mismo (Manco, 2008)

Los principales problemas fitosanitarios que se han reportado en este cultivo son diversos. Uno de los más importantes son los ataques de *Meloidogyne* spp. y *Aphelenchus* sp., ya que dañan el sistema radicular, lo cual provoca una atrofia y por ende un menor crecimiento de la planta. Por otro lado, el daño, favorece el ingreso de hongos como *Fusarium* sp, ocasionando una pudrición de la raíz hasta puede ocasionar muerte de plantas (Arévalo, 1999). Las plagas que afectan este cultivo son los insectos comedores de hojas, entre ellos se pueden mencionar a las hormigas *Atta cephalotes*, grillos *Grillotalpa* sp. y larvas de

lepidópteros. También pueden ocasionar daños en frutos en su estado lechoso (Arévalo, 1999; Manco, 2008; IIAP, 2009).

La limpieza y control de malezas es una actividad clave, para evitar la competencia de la planta por nutrientes y agua y mantener el cultivo con menor presión de plagas y enfermedades. Esta actividad se realiza con machetes y equipos mecánicos (PBD, 2009).

Finalmente, la cosecha se realiza cuando el fruto ya ha adquirido un color marrón oscuro y está seco. Generalmente, a partir de los seis a siete meses y medio después de la siembra, si esta fue de forma directa y de ocho a diez meses después del almacenado en siembra indirecta. Esta labor se realiza de forma manual, con una frecuencia de cada 15 a 30 días (Manco, 2008).

El rendimiento varía durante los tres primeros años de cultivo, según MINAGRI, (2009), se reportaron los siguientes valores:

- Primer año: 1000 kg de capsula/ha
- Segundo año: 4000 kg de capsula/ha
- Tercer año: 5000 kg de capsula/ha

La cápsula contiene entre 54% a 50% de semilla y entre 46% al 50% de cáscara.

2.2.MICORRIZA

En 1885, las asociaciones simbióticas entre raíces vegetales y hongos precedentes del suelo, fueron denominadas por el patólogo alemán A. B. Frank, como “micorriza”, que traducida del griego significa raíz fungal. Estas, hoy en día se consideran como raíces nutricias normales de la mayoría de las plantas como cereales, hortalizas, plantas de ornato y árboles (Agrios, 2002). Tal es así que, algunos autores la consideran como el tipo de simbiosis más importante en el planeta, ya que más del 80% de plantas de hábitats templados y tropicales, pueden asociarse a los hongos micorríticos (Smith y Read, 2008; Brandán de Weht *et al.*, 2013).

2.2.1. Tipos de micorriza

La clasificación general de las micorrizas, fueron establecidas en función de características morfológicas, anatómicas, atributos fisiológicos de los hongos y de las plantas y el grupo taxonómico (Lynch, 1990; Smith & Read, 1997; Brundrett, 2002). Aunque, existe discrepancias en la determinación de esta clasificación, la más práctica es la que proponen Smith & Read, (1997), quienes reconocieron siete diferentes tipos de micorrizas, las que se mencionan a continuación:

- Micorriza arbuscular
- Ectomicorriza
- Micorriza monoproide
- Micorriza arbutoide
- Ectendomicorriza
- Micorriza ericoide
- Micorriza de orquídeas o endomicorriza orquideoide

El presente estudio, enfocó su estudio en las micorrizas arbusculares, las que se describen a continuación:

Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

a. Características:

Este tipo de micorriza, se distingue por formar una estructura característica denominada arbusculo. Inicialmente, fue clasificada como endomicorriza, posteriormente, como micorriza vesículo-arbuscular.

Esta asociación es obligada para los hongos que la forman, pero no para las plantas que colonizan. No tienen un estado sexual conocido. No forman la red de Hartig ni el manto. Las hifas penetran la raíz, se introducen en las células y pueden formar dos tipos de estructuras únicas: Arbusculos y vesículas.

Los arbuscúlos, son las estructuras características de este tipo de micorriza. Se forman dentro de las células de la corteza de la raíz, cerca del cilindro vascular de la planta, mediante numerosas ramificaciones dicotómicas sucesivas a partir de una hifa inicial. Normalmente, esto ocurre dos días después de la penetración en la raíz. Su función es básicamente, ser el sitio de transferencia de nutrientes entre la planta y el hongo (Brundrett *et al.*, 1985; Andrade 2010; Luginbuehl & Oldroyd, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018).

Las vesículas, son estructuras que pueden estar o no presentes. Se forman dentro o entre las células de la corteza de la raíz, a manera de bolsas ovaladas o esféricas, producto de la inflamación de las hifas. Su formación inicia poco después de la formación de los primeros arbuscúlos y permanecen desarrollándose hasta que la planta envejezca. Su función es almacenar lípidos y citoplasma. Además pueden funcionar como estructuras de propagación, cuando están aisladas de la raíz; ya que a menudo poseen paredes con múltiples capas similar a las esporas (Biermann & Linderman, 1983; Andrade, 2010).

Por otro lado, las estructuras de propagación, almacenamiento y reposo de los hongos micorrícicos arbusculares son las esporas, ya que contienen lípidos, citoplasma y muchos núcleos. Son producidas en presencia de una planta hospedante, en los micelios intra o extraradiculares o agregados en estructuras llamadas esporocarpos. Las esporas difieren en forma, estructura, contenido citoplasmático, color, tamaño, número de paredes, vía de germinación, morfología de esporas secundarias y presencia o ausencia de esporocarpo. Estas características son el resultado de procesos de desarrollo completamente diferentes. De esta manera, la espora es considerada autónoma en forma y función por algunos investigadores y que un individuo fungal es representado por una sola espora identificable la cual consiste de una sola célula multinucleada (Gerdemann & Trappe, 1974; Mosse *et al.*, 1981; Morton, 1990; Morton, 1993; Brundrett, 2008 Andrade, 2010).

Respecto a la clasificación taxonómica de este tipo de micorriza, inicialmente estuvo considerado dentro del *phylum* Zygomycota. Posteriormente se agruparon en un nuevo *phylum*, los Glomeromycota. Esta nueva clasificación, se realizó en base a los estudios de biología molecular, siendo los principales objetos de estudio la estructura y secuenciamiento de ADN de las esporas. Asimismo, este *phylum* está compuesto por cinco órdenes y 14 familias (Oehl *et al.*, 2011b):

- Archaeosporales: Archaesporaceae, Geosiphonaceae y Ambisporaceae
- Paraglomerales: Paraglomeraceae
- Diversisporales: Diversisporaceae, Acaulosporaceae, Sacculosporaceae y Pacisporaceae
- Gigasporales: Scutellosporaceae, Gigasporaceae, Dentiscutataceae y Racocetraceae
- Glomerales: Glomeraceae y Entrophosporaceae

Actualmente, se ha inventariado una cantidad de secuencias de ADN de los HMA, en bases de datos como GenBank. Sin embargo, gran parte de la diversidad de los HMA aún no ha sido registrada, tal es así que hasta el momento solo 315 especies de HMA son descritas (www.amf-phylogeny.com) dentro de éste *phylum* (Brundrett, 2008; Montaña *et al.*, 2008).

b. Ciclo de vida:

La germinación de la spora es un proceso que depende de ciertos factores químicos, físicos y biológicos; como el periodo de vernalización de las esporas, concentraciones de CO₂, exudados radiculares y la microfauna del suelo. Sin embargo, es independiente de la planta hospedante (Hepper, 1981; Azcón-Aguilar *et al.*, 1986; Azcón-Aguilar, 1987; Becard & Piché, 1989; Hildebrandt *et al.*, 2002).

La simbiosis inicia, cuando la planta estimula al hongo a través de los exudados radiculares y señales, de manera que los HMA, reconozcan la presencia del hospedante (Nagahashi & Douds, 2003). Los hongos estimulados emiten sus hifas, a partir de las esporas, hifas o raíces micorrizadas, las cuales, al entrar en contacto con la raíz forman una estructura llamada apresorio, a través de la cual se fija, antes de iniciar la colonización. Después de este proceso, inicia la colonización. La hifa penetra la corteza y forma diferentes estructuras morfológicamente diferentes y especializadas: hifas intra e intercelulares, arbusculos y vesículas. Algunos investigadores consideran que los arbusculos son la interfase principal para la toma de azúcares por parte del hongo y la transferencia de iones desde el hongo a las células corticales de las raíces, aunque existen

evidencias de la separación espacial de las funciones de transferencia de carbono y fósforo entre una interfase hifal y arbuscular (Smith & Read, 1997).

Simultáneo a la colonización, el micelio del hongo crece fuera de la raíz, explorando el suelo en busca de nutrientes minerales y colonizando también raíces de otras plantas. De esta manera, el micelio extraradicular tiene un papel importante en la adquisición de nutrientes y forma una fuente de colonización secundaria a lo largo de la raíz y entre raíces (Harley & Smith, 1983; Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

El ciclo se completa cuando a partir del micelio externo, se forman las esporas asexuales (Smith & Read, 1997; Requena & Breuninger, 2004)

Por ello según Eckardt, (2005), la planta hospedante juega un rol importante en el proceso de colonización, debido a que los procesos requieren comunicación molecular e intercambio y percepción de señales entre ambos organismos (Bucher, 2007). Por otro lado, el proceso y la tasa de colonización determinan la efectividad de un HMA o una asociación micorrizal.

c. Importancia

Actualmente, se está optando por utilizar HMA, para el mejoramiento agronómico de los cultivos. Según algunos autores, estos organismos tienen efecto sobre el incremento de la producción, favorecen la resistencia al estrés hídrico (Al-Karaki *et al.*, 2004; Cardoso & Kuyper, 2006), incrementan la producción de clorofila (Ekanayake *et al.*, 2004) y ejercen influencia sobre la resistencia de las plantas y sobre su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas (Purakayastha & Chhonkar, 2005; Karandashov & Bucher, 2005). Por lo que su estudio ha adquirido gran importancia (Azcón & Barea, 1992; Medina *et al.*, 2000; Baar, 2008).

Los efectos benéficos que los HMA brindan a la planta, son producto de diversos mecanismos, siendo el principal, el desarrollo del micelio, lo que permite una mayor extensión de la superficie radicular. A continuación, se detallan los beneficios que proporciona esta interacción (Muchovej, 2004).

- **Nutricional:** El hongo desarrolla un extenso sistema de micelios, a través de los cuales, explora el suelo y adquiere macronutrientes inorgánicos como nitrógeno, fósforo y potasio, micronutrientes como cobre, hierro y zinc y de cierto modo

nitrógeno y fósforo orgánico, que posteriormente son transferidos a la planta (Smith & Read, 1997; Leake *et al.*, 2004).

El fósforo en el suelo es un elemento inmóvil, incluso si se agrega al suelo en forma soluble se inmoviliza como fósforo orgánico, fosfatos de calcio u otras formas fijas (Wetterauer & Killorn, 1996; Bucher, 2007). Los HMA, mejoran la adquisición de fosfato del suelo, dado que, al agotarse este elemento en la zona de alcance de la raíz, el desarrollo micelial, permite explorar los lugares a los que a la planta le es difícil y alcanzar zonas donde el fosfato es soluble (Marschner, 1995; Smith & Read, 1997; Roose & Fowler, 2004). Este proceso, inicia cuando el fósforo inorgánico es asimilado en la interfaz hifal-suelo por transportadores fúngicos de alta afinidad (Harrison & van Buuren, 1995; Maldonado *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005), posteriormente dentro del hongo, este elemento es translocado como polifosfato hacia las estructuras intraradiculares y antes de ser liberado hacia los arbusculos, se despolimeriza en fósforo inorgánico, el cual es adquirido por la planta mediante transportadores de fosfato, inducidos durante el desarrollo de la simbiosis (Harrison *et al.*, 2002; Paszkowski *et al.*, 2002; Glassop *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005; Bucher, 2007; Javot *et al.*, 2007; Pumplin & Harrison, 2009).

El nitrógeno es otro elemento muy importante para el desarrollo de las plantas y su disponibilidad, puede limitar el crecimiento de estas. Los HMA pueden absorber u transferir cantidades considerables de nitrógeno inorgánico, ya sea como NH_4 o NO_3 , del suelo a la planta o incluso entre plantas. Las hifas extraradiculares, pueden tomar y asimilar NH_4 , NO_3 y aminoácidos del suelo alrededor, siendo el principal el NH_4 . Por otro lado, algunos autores consideran que el nitrógeno inorgánico es tomado por el micelio extraradicular, es incorporado y almacenado dentro del hongo principalmente como arginina, asimilado a través del ciclo GS / GOGAT, asparagina sintasa y el ciclo de la urea. La arginina almacenada, puede ser cotransportada con PolyP del micelio extraradicular al intraradicular y viceversa. Finalmente, el nitrógeno es liberado de la arginina como NH_4 y es transferido de esta forma a la planta, a través de los arbusculos (Hawkins *et al.*, 2000; He *et al.*, 2003; Toussaint *et al.*, 2004; Govindarajulu *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005).

Asimismo, la colonización de HMA estimula la absorción de micronutrientes, lo que conduce a una mayor producción de fotosintatos y por ende, una mayor acumulación

de biomasa, incluso en condiciones inadecuadas para el desarrollo de la planta (Chen *et al.*, 2017; Mitra *et al.*, 2019). El hongo en respuesta al beneficio recibido de la planta, proporciona también nutrientes como K, Ca, Zn y S. Este efecto, ha sido comprobado por Balliu *et al.* (2015), quien luego de realizar estudios de inoculación en plantas de tomate con HMA, obtuvo un incremento en el área de hojas y de los contenidos de macro y micronutrientes (Begum *et al.*, 2019).

- Disminución del estrés salino: Los HMA, juegan un rol importante en el aumento de la tasa de intercambio de dióxido de carbono, la transpiración y la conductancia estomática. De esta manera mejora el desequilibrio iónico, protege la actividad enzimática, facilita la absorción del agua y ajusta el equilibrio osmótico de forma favorable (Feng *et al.*, 2002; Ruiz-Lozano, 2003; Giri & Mukerji, 2004; Zandavalli *et al.*, 2004; Rabie & Almadini, 2005; Colla *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008). Asimismo, permite que la planta produzca en estas condiciones, debido a su papel en la absorción de nutrientes.
- Protección frente a patógenos: Existen diversos estudios, en los cuales se reporta que la interacción entre la planta y los HMA, aumenta la tolerancia del huésped al ataque de los nemátodos *Meloidogyne* sp. e insectos herbívoros. La protección está mediada por una serie de mecanismos, incluyendo la regulación ascendente y descendente de genes específicos, que dan como resultado respuestas localizadas y sistémicas por parte del hospedante. Estas respuestas incluyen la síntesis de nuevas isoformas de quitinasas y glucanasas y el engrosamiento de las paredes celulares (Tahiri-Alaoui & Antoniwi, 1996; Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Pozo *et al.*, 2002). Asimismo, frente al ataque de hongos patógenos del suelo, las plantas micorrizadas son menos afectadas, ya que los HMA atenúan el efecto perjudicial que les puedan causar (Jaizme-Vega *et al.*, 1998; Abdalla & Abdel-Fattah, 2000).

2.2.2. Influencia de la especie hospedante y edad de las plantaciones sobre la diversidad de hongos micorríticos arbusculares

Existen diversos estudios que afirman que la planta hospedante puede influenciar o dirigir una comunidad de HMA. Según, Torrecillas *et al.* (2012), una mayor diversidad de HMA se encuentran colonizando especies herbáceas (entre 13 y 20 filotipos), mientras que en una especie perenne la diversidad disminuye. Asimismo indican que ciertos filotipos se

encuentran exclusivamente en raíces de *Hieracium vulgare* y *Anagallis arvensis*. Sin embargo, este efecto podría estar influenciado por las propiedades del suelo. Asimismo, en un estudio realizado por Rask *et al.* (2019); en el cual inocularon diversas especies de plantas con consorcios de HMA, reportaron que plantas de *Hordeum vulgare* L. presentan mayor grado de colonización en comparación con *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. y *Matricaria recutita* L.; y que *Sinapis alba* L. y *Dianthus deltoides* L. casi no presentaron estructuras micorrízicas, lo cual evidenció que los HMA tienen afinidad al momento de infectar las raíces de diferentes especies de plantas o a nivel de familia. Otros autores, sugieren que esta especificidad no necesariamente está influenciada por la especie del huésped sino por grupos ecológicos de plantas, de manera que las plantas generalistas tienden a asociarse con especies de HMA generalistas (Santos-González *et al.*, 2007; Öpik *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 2011).

Aunque el mecanismo es especulativo, esta afinidad podría estar relacionada con los rasgos morfofuncionales de las plantas hospedantes. Las plantas anuales poseen tasas rápidas de alargamiento de la raíz, altas tasas de crecimiento relativo y mayor capacidad de absorción de nutrientes, mientras que las plantas perennes generalmente se asocian con rasgos que sugieren una estrategia más conservadora como una mayor densidad de tejido radicular, un diámetro mayor y un menor contenido de nutrientes en la raíz (Roumet *et al.* 2006).

Otro factor podría ser la asignación preferencial de fotosintatos por las plantas huésped a los HMA que más las benefician (Bever *et al.*, 2009). Asimismo, existe cierta influencia de la planta sobre la germinación de los HMA, a través de los exudados radiculares (Smith & Read, 1997), de manera que, las raíces emiten una señal volátil reguladora que estimula el crecimiento direccional del hongo hacia ellas (Koske, 1982). Dentro de estas señales, se puede mencionar al CO₂, que puede estimular la extensión hifal de algunos hongos en condiciones *in vitro* y que combinado con los exudados radiculares provocan un aumento de la respuesta de crecimiento positiva de los hongos (Beard & Piche, 1989). Este efecto incluso ha conllevado a denominar a algunas plantas como micotróficas por tener la capacidad de inducir ramificación de hifas. Otros autores sugieren la existencia de señales quimiotácticas emitidas por las plantas (Parniske, 2004). Contrario a ello, también existen plantas que contienen compuestos inhibitorios, por lo que se les denomina no micotróficas como *Brasica* spp. o *Lupinus* spp. que no estimulan la germinación (Giovannetti *et al.*, 1993).

Por otro lado, la edad de los cultivos también puede influir en la colonización de los HMA (Andrade *et al.*, 2009; Debnath *et al.*, 2014; Kil *et al.*, 2014; Chakraborty *et al.*, 2016). Una hipótesis que podría explicar este comportamiento, es que la comunidad de HMA que colonizan las raíces se vuelve más uniformes conforme la edad del cultivo se incrementa, debido a los cambios de preferencias de los HMA. Asimismo, Eom *et al.* (2000) y Daniell *et al.* (2001) plantean que las especies dominantes de HMA responden de manera diferente a los diversos cambios en el entorno abiótico a lo largo del tiempo. Asimismo, este efecto puede ser influenciado por la fenología de la planta huésped.

2.2.3. Importancia del estudio del ADN en la clasificación de hongos micorrízicos

Existen básicamente dos formas de identificar las comunidades de HMA. Una de ellas es la morfológica, cuyo objeto de estudio son las esporas o propágulos presentes en el suelo. Sin embargo, su estudio es limitado, debido a que existe variación en las características físicas incluso en individuos de la misma especie, asimismo, existen especies de HMA que se pueden reproducir vegetativamente sin necesidad de producir esporas y la presencia de estas últimas pueden no reflejar una comunidad de organismos simbióticamente activa (Walker & Vestberg, 1998; Helgason *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2009). Por tal motivo, muchos autores tienen discrepancias respecto a la determinación de un morfotipo y su pertenencia a una especie o género (Peña *et al.*, 2006).

Por otro lado, existen otras técnicas complementarias como la biología molecular, que ofrecen la posibilidad de realizar estos estudios de manera rápida, sensible y confiable. Asimismo, esta técnica posibilita estudiar aquellas especies que están estableciendo simbiosis con las plantas independientemente del criterio morfológico y permite establecer su filogenia (Lee *et al.*, 2008). De esta manera, actualmente se vienen realizando estudios a nivel molecular de los propágulos y del micelio extra e intraradicular, a partir de muy pequeñas cantidades de ADN fungal, que finalmente permite diferenciar estos organismos, incluso si son muy próximos entre sí. Por ello se ha convertido en un método crucial para superar las limitaciones de la identificación morfológica (Llorens *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 2009).

2.2.4. ARN ribosomal 28S

El ARN ribosomal 28S o 28S ARNr, es un componente de la subunidad mayor (60S) del ARN ribosómico, que se encuentra formando parte de la estructura de los ribosomas

citoplasmáticos de todas las células eucariotas. Esta región del ARN está codificada por el gen 28S ADNr, la cual posee regiones caracterizadas por ser altamente polimórficas e informativas, debido a la variabilidad en su longitud y secuencias. Esta característica ha conllevado a la generación de cebadores que permiten diferenciar taxones de Glomeromycota, a diferentes niveles de especificidad, incluso si existen sustituciones de 2 a 3 pares de bases. Asimismo, permite realizar estudios de diversidad en poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares que han colonizado sistemas radiculares y ofrecen la posibilidad de relacionar la variabilidad en función de los factores bióticos y abióticos (van Tuinen *et al.*, 1998; Markmann & Tautz, 2005).

2.3.MARCADORES MOLECULARES

En el ámbito de la genética, un marcador molecular es una biomolécula, como el ADN o una proteína. Una secuencia de ADN, que se utiliza como marcador, debe estar relacionado a una parte del genoma, con una ubicación conocida en el cromosoma, cuya expresión se puede detectar, cuantificar y observar. Este hecho facilita la investigación en disciplinas como la taxonomía, debido a que la variación de estas secuencias, permite establecer con un nivel confiable la identidad de los individuos, incluso a nivel de especies, por ser el genotipo el objeto de estudio, el cual no está influenciado por el medio ambiente. Asimismo, es objeto de estudio en otras áreas como la filogenia, la ecología, la genética y el fitomejoramiento. Por otro lado, las proteínas que son utilizadas como marcadores son las isoenzimas y los antígenos, cuya característica principal es la relación con un rasgo genético.

En base a estos dos tipos de materiales, se establece una clasificación general de marcadores moleculares: bioquímicos y de ADN (Solís *et al.*, 2005; Sharma, 2010).

2.3.1. Marcadores bioquímicos

Este tipo de marcadores, incluye el estudio de proteínas e isoenzimas, que representan rasgos bioquímicos que pueden ser analizados por electroforesis de proteínas, por lo cual es considerado como una técnica rápida, económica y directa. Sin embargo, por tratarse de productos de la transcripción y traducción génica, son vulnerables a ser influenciados por el medio ambiente; lo que limita la amplitud de su aplicación (Drinkwater y Hetzel, 1991; Yang *et al.*, 2013).

Por otro lado, la técnica básicamente consiste en realizar una electroforesis, para lo cual se coloca el material proteico en los pocillos de un papel de celulosa o geles, para luego ser migrados y separados por diferencia de tamaños y de cargas en un campo eléctrico durante varias horas. Posteriormente para ser observados, el gel se coloca en un colorante especial que permite visualizar las proteínas en forma de bandas de color. Finalmente, la diferencia que se observa en los tamaños de banda, es explicada por la diferencia en la secuencia de ADN que codificaron dichas proteínas (Solís *et al.*, 2005).

2.3.2. Marcadores de ADN

Este tipo de marcadores, permite realizar un estudio con un nivel mayor de precisión y rendimiento, comparado a los demás marcadores, debido a que el material que se utiliza como objeto de estudio es el ADN. Esta técnica tiene numerosas aplicaciones en la construcción de mapas genéticos, en el área de fitomejoramiento, para estudiar la biodiversidad genética de organismos y toma de huellas dactilares de los germoplasmas (Winter & Kahl, 1995; Gupta *et al.*, 2001; Duran *et al.*, 2009), debido a que este material genético es relativamente fácil de analizar y no está influenciado por el medio ambiente, ni el estado o etapa de desarrollo de la planta. Asimismo, cualquier variación que puede surgir en sus secuencias de nucleótidos, muchas veces no puede ser observada fenotípicamente, sin embargo, pueden ser altamente heredables, por cual lo cual se considera una técnica confiable para realizar dichos estudios.

Se cuenta con diversas técnicas para identificar estos marcadores y se agrupan en tres categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern (Solís *et al.*, 2005).

a. Hibridación tipo Southern

Es una técnica basada en la formación de una molécula de doble cadena a partir de la unión de bases complementarias de dos moléculas de una sola cadena. Permite medir la cantidad, detectar la presencia o ausencia y la variación en la longitud de un fragmento particular de ADN, asimismo permite estudiar su organización dentro un genoma (Solís *et al.*, 2005; Udriste & Radu, 2014). Para ello, se realiza inicialmente la digestión del ADN genómico con una o más enzimas de restricción, estos fragmentos son separados según el tamaño mediante electroforesis a través de un gel de agarosa estándar. El ADN se desnaturaliza *in*

situ y se transfiere del gel a un soporte sólido, generalmente de nylon o una membrana de nitrocelulosa. Finalmente, el ADN unido a la membrana se hibrida con una sonda u oligonucleótido marcada radiactivamente y se visualiza mediante un sistema de detección apropiado, por ejemplo, mediante autorradiografía (Hass *et al.*, 1972; Solís *et al.*, 2005). Dentro de esta técnica se encuentran los marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable) (Solís *et al.*, 2005).

b. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Es una técnica desarrollada por Kary Mullis en el año 1980, basada en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Básicamente consiste en multiplicar *in vitro*, fragmentos específicos de ADN, delimitados a partir de oligonucleótidos o cebadores que reconocen una secuencia complementaria determinada. Durante el proceso se sacan miles de copias del fragmento mediante ciclos repetitivos que involucran la desnaturalización del ADN molde, alineamiento de cebadores a la cadena molde y la extensión de los cebadores por la enzima ADN polimerasa. Asimismo, los productos sintetizados a partir de la extensión de los cebadores en un ciclo, pueden servir como molde para el siguiente ciclo. Por ello la cantidad resultante de copias de ADN objetivo se duplica en cada ciclo (Mas *et al.*, 2001; Solís *et al.*, 2005; Atawodi *et al.*, 2011). Dentro de esta metodología se encuentran los marcadores llamados RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con microsatélites (MP-PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), entre otros (Solís *et al.*, 2005).

• Componentes esenciales de reacción (PCR)

1. ADN molde: El ADN de plantilla contenido en una muestra de ADN genómico de la muestra, puede usarse en forma monocatenaria o bicatenaria. La PCR completa requiere solo una copia de la secuencia objetivo como plantilla (Metzker & Caskey, 2009).
2. Un par de cebadores u oligonucleótidos: Deben ser cortos, monocatenarios y complementarios a los fragmentos de interés. Las reacciones estándar contienen 0.1

- 0.5 μM de cada cebador, que es suficiente para 30 ciclos de amplificación de un segmento de ADN de 1 kb (Metzker & Caskey, 2009).
3. ADN polimerasa termoestable: Es esencial para catalizar la síntesis de ADN, Debe tener la capacidad de soportar las temperaturas de desnaturalización (94-95°C). Generalmente, se utiliza la *Taq* ADN polimerasa aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. Para una reacción estándar de 25-50 μl , se utilizan 0.5-0.25 unidades de esta enzima (Metzker & Caskey, 2009).
 4. Desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs): Generalmente se utilizan concentraciones equimolares de dCTP (trifosfato de desoxicitidina), Dttp (trifosfato de desoxitimidina), dATP (trifosfato de desoxiadenosina) y dGTP (trifosfato de desoxiaguanosina) (200-250 μM cada uno). Estos dNTP están disponibles comercialmente y se suministran como mezclas libres de pirofosfato (Metzker & Caskey, 2009).
 5. Cationes divalentes: Usado para la actividad de las polimerasas termoestables, el cual se une a los dNTPs y los oligonucleótidos. La concentración molar de catión debe exceder la concentración molar de grupos fosfato en los dNTP y los cebadores juntos. Se usa habitualmente una concentración de 1.5 mM de Mg^{+2} . Su exceso provoca la acumulación de productos de amplificación inespecíficos y su insuficiencia reduce el rendimiento (Rittié & Perbal, 2008)
 6. Solución tampón: Utilizado para mantener el pH de la mezcla de reacción (8.3 - 8.8).

- **Procedimiento**

Inicialmente, el ADN que se va a utilizar debe ser de buena calidad y encontrarse en buen estado. Por otro lado, la amplificación se logra mediante la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del ADN molde por acción del calor

2ª Hibridación de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3ª Extensión del cebador por la DNA polimerasa termoestable

En el primer paso (desnaturalización) la cadena de doble hélice de ADN se separa en dos hebras. La separación se realiza debido a la acción de altas temperaturas (93-97°C sobre la cadena. Posteriormente, se renaturalizará cuando la temperatura disminuya (Mas *et al.*, 2001).

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se alinean a las zonas 3' complementarias al fragmento que se va a amplificar. Para ello, se realiza una disminución de la temperatura que varía entre 50-65°C, dependiendo de las secuencias y el tamaño de los cebadores (Ehtisham *et al.*, 2016).

La tercera etapa (elongación), es catalizada por la enzima ADN polimerasa e inicia a partir de los cebadores. Una vez alineados los cebadores a la cadena molde, inicia la síntesis de la nueva cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3', mediante la incorporación de los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio (Mas *et al.*, 2001; Ehtisham *et al.*, 2016).

- **TRFLP (Polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción)**

Es un método de biología molecular que permite evaluar la composición y diversidad de las comunidades de microorganismos (Liu *et al.*, 1997). Según Dickie & FitzJohn, (2007), también se puede aplicar para estudiar la ecología de hongos micorrízicos. Esta técnica está basada en los polimorfismos de la longitud del fragmento terminal que existe entre diferentes secuencias de fragmentos de ADN, pertenecientes a la misma subunidad del ARN ribosomal. Consiste básicamente en aislar una muestra de ADN que codifica para una región de la subunidad pequeña del ARN ribosomal mediante la amplificación por PCR, utilizando un par de cebadores sintetizados a partir de una región conservada y marcados con un fluorescente. Posteriormente, el producto PCR se digiere con enzimas de restricción que permiten establecer diferencias entre las especies que componen la muestra de ADN. Finalmente, se realiza el análisis, mediante la fluorescencia que emiten los fragmentos que fueron alineados con los cebadores marcados, estos tamaños se comparan con un banco de datos que contienen las secuencias y tamaños teóricos de cada especie. Mediante este método se establece la riqueza de especies que están componiendo una muestra, aunque también se podría evaluar la abundancia mediante la intensidad de emisión de fluorescencia (Vengatesen *et al.*, 2019).

c. Metodologías combinadas

Finalmente, dentro de las metodologías que combinan la PCR y la hibridación tipo Southern, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites) (Solís *et al.*, 2005).

III. METODOLOGÍA

3.1.ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el departamento de San Martín, situado en la parte nororiental del territorio peruano. Limita con los departamentos de Loreto (Este), Amazonas (Norte), La Libertad (Oeste) y Huánuco (Sur). La región se encuentra ubicada en la selva alta, con coordenadas de 7°12' latitud sur 76°48' longitud oeste.

Las muestras se colectaron de cuatro diferentes provincias caracterizadas por presentar la mayor producción del cultivo de sacha inchi en la región San Martín (Figura 1). De cada provincia se escogió una localidad caracterizada por presentar dos parcelas contiguas, una con plantas menores a un año de edad y la otra con plantas mayores a tres años de edad. La información de las zonas muestreadas se detalla en la Tabla 1. De cada parcela se escogieron 4 plantas aleatoriamente que fueron rotuladas y codificadas. La codificación de cada planta se realizó en base al nombre de la provincia, localidad, rango de edad y número de planta.

Por otro lado, se generó una base de datos a partir de la información obtenida de la ubicación, especies alrededor y asociados al cultivo de sacha inchi, tutoraje y área de cada parcela (anexo 1).

Tabla 1. Ubicación espacial de las parcelas de sacha inchi muestreadas en la región de San Martín

Departamento	Provincia	Localidad	Georreferencia (UTM)		Altitud (m)
			Este	Norte	
San Martín	Lamas	Paucarpata	0331070	9287544	462
San Martín	El Dorado	Cashnahuasi	0294262	9286934	900
San Martín	Picota	San Antonio	0366448	9226536	250
San Martín	Bellavista	Nuevo Progreso	0348625	9207226	305

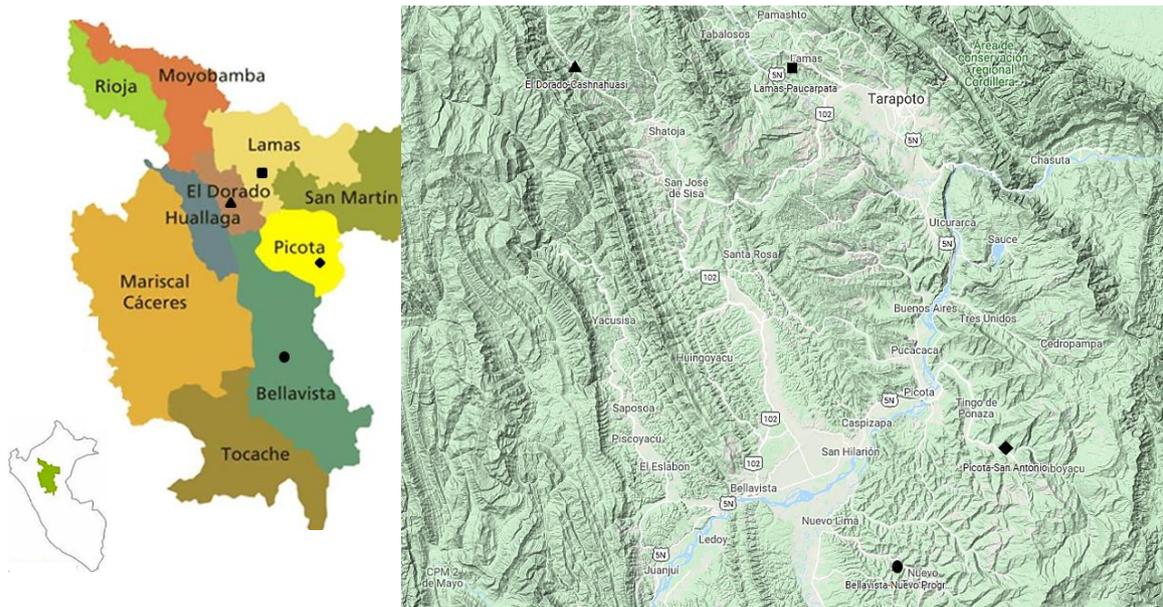


Figura 1. Ubicación de las parcelas muestreadas de sacha inchi en cuatro provincias de la región San Martín (Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática - Censos Nacionales de Población y Vivienda).

Por otro lado, el procesamiento de muestras y el trabajo de caracterización molecular se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) de la Universidad Nacional de San Martín, con coordenadas 6°29'05" latitud sur y 76°22'40" longitud oeste, en la ciudad de Tarapoto ubicada en la selva nororiental peruana.

3.2.MUESTREO DE SUELOS Y RAÍCES

3.2.1. Obtención de material biológico

La colección de muestras, se realizó en cuatro provincias. De cada provincia se eligieron dos parcelas de sacha inchi, diferenciadas por la edad del cultivo. Una con plantaciones menores a un año de edad y la otra con plantas mayores a tres años (Tabla 2). El criterio que se utilizó para elegir los predios se basó en la ubicación contigua de estas dos parcelas productoras de diferentes edades en cada localidad de muestreo. De cada parcela, se seleccionaron aleatoriamente cuatro plantas distanciadas 15 m aproximadamente, que fueron codificadas y georreferenciadas (anexo 1).

Tabla 2. Edad de plantaciones de sachu inchi ubicadas en ocho parcelas en cuatro localidades de la región San Martín

Provincia	Localidad	Parcela	Rango de edad (años)	Edad del cultivo (años)
Lamas	Paucarpata	1	A (menor a un año)	1
		2	B (mayor a tres años)	4
El Dorado	Cashnahuasi	3	A (menor a un año)	1
		4	B (mayor a tres años)	6
Picota	San Antonio	5	A (menor a un año)	0.5
		6	B (mayor a tres años)	3.5
Bellavista	Nuevo Progreso	7	A (menor a un año)	0.25
		8	B (mayor a tres años)	5

Una vez seleccionadas las plantas, se eligieron tres puntos de submuestreo ubicados horizontalmente a 15 cm del tallo principal. De cada planta se extrajeron aproximadamente 20 g de raíces (secundarias y raicillas), a una profundidad de 0 a 15 cm de y 2 kg de suelo rizosférico de 5 a 25 cm de profundidad (Modificado de Varela-Cervero et. al, 2016).

Posteriormente, cada muestra de suelo fue separada en una bolsa de polietileno y las de raíz en un sobre de papel debidamente codificado. Finalmente se transportaron al laboratorio en una caja con hielo para su posterior análisis. Una vez llegado al laboratorio, se almacenaron en un refrigerador a 4°C hasta tres días después de la extracción de la muestra.

3.3.PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras fueron inmediatamente procesadas en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad Nacional de San Martín (LBGM - UNSM). Las raíces finas se lavaron con agua de caño, se enjuagaron con agua destilada y fueron secadas con papel absorbente, luego se cortaron en segmentos de entre 0.5 y 1 cm y fueron homogeneizadas por cada planta. Las raíces de 1cm, se utilizaron para determinar el porcentaje de colonización (500 mg). Estas se conservaron en alcohol etílico al 70% hasta su procesamiento. Posteriormente, se seleccionaron las raíces más pequeñas, delgadas y mejor conservadas. A partir de estas, se pesaron de 2 a 3 alícuotas de 200 mg cada una (peso fresco) y se colocaron en un sobre de papel aluminio. Finalmente, se colocaron en un congelador a -80°C hasta la extracción de ADN (Modificado de Sánchez-Castro *et al.*, 2017).

Por otra parte, la muestra de suelo, fue tamizado con una apertura de malla de entre 2 a 5 mm, para eliminar raíces, piedras, etc. Posteriormente, el suelo tamizado fue secado a temperatura ambiente durante 48 horas.

3.4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO

El análisis se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (LASPAF – UNALM). Los parámetros que se determinaron fueron los siguientes: pH, conductividad eléctrica, contenido de fósforo, potasio, carbonatos de calcio, materia orgánica, textura, CIC, cationes cambiabiles y porcentaje de nitrógeno.

3.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN DE HMA A LA RAÍZ

Para realizar la tinción de raíces se utilizó la metodología propuesta por Phillips y Hayman (1970) modificada por Vierheilig *et al.*, (1998). Las raíces fueron colocadas en un tubo de ensayo; a estas se añadió hidróxido de potasio al 10% y se colocaron en baño María durante 45 minutos a 90°C. Posteriormente, se añadió peróxido de hidrógeno (30 vol) a cada tubo, se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente, se descartó la solución y se realizaron tres lavados.

Una vez lavadas las raíces, se vertió tinta Parker Quink (5.7%) en cada tubo, se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y otros 15 en baño María. Posteriormente, se descartó la tinta y se lavaron dos veces con lactoglicerol. Las raíces permanecieron una noche en lactoglicerol.

La evaluación de colonización micorrízica se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Brundrett *et al.* (1996). Inicialmente, se escogieron aleatoriamente por planta, 20 raíces de 1cm de longitud. Estas fueron montadas en una lámina portaobjetos.

Una vez montadas las muestras, se observó al microscopio con un aumento de 20x, estableciéndose 20 campos superiores, 20 medios y 20 inferiores, haciendo un total de 60 campos a observar. En cada campo se revisó la presencia o ausencia de estructuras micorrízicas como hifas, vesículas o arbusculos. Finalmente, se contaron las estructuras

presentes y se dividió entre el número total de observaciones, correspondientes a los 60 campos.

3.6.PROCEDIMIENTOS BASADOS EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.6.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN, se realizó mediante el método de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide.), siguiendo el protocolo propuesto por Doyle & Doyle (1987). Inicialmente, las alícuotas de raíces congeladas, fueron trituradas en un tubo con ayuda de un pilón en nitrógeno líquido. A partir de este producto, se pesaron 100 mg de tejido triturado y se colocaron en tubos de 2 ml. A cada tubo, se vertió 200 μ l del buffer CTAB a 60°C, se agregó 2 μ l de β -mercaptoetanol y se homogeneizó la mezcla haciendo uso de un pilón, hasta conseguir una consistencia pastosa, este procedimiento se realizó con el fin de romper las membranas de las células y evitar la actividad de nucleasas. Posteriormente, se agregó 10 μ l de proteinasa K (-20°C) a cada tubo, se mezcló y se colocó en baño María a 60°C durante toda la noche; con el fin de degradar las proteínas que estén adheridas al ADN y precipitar este último.

Al día siguiente, se añadió 1 ml de cloroformo a cada tubo, se mezcló suavemente por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, para eliminar las proteínas que se encuentran en la solución. Se retiraron 500 μ l de sobrenadante y se colocaron en tubos de 1.5 ml. Posteriormente, se adicionaron 750 μ l de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión durante 2 minutos y se congeló durante dos horas a -20°C, para precipitar el ADN. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y se desechó el líquido sin perder el pellet de ADN. Este último se lavó dos veces con 750 μ l de etanol frío al 70%, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet sedimentado, fue secado a temperatura ambiente durante 3 horas.

Finalmente, se resuspendió el pellet en 30 μ l de agua grado molecular y se colocó en la refrigeradora a 4°C durante dos horas. Cumplido el tiempo, se agitó suavemente y se almacenó a -20°C.

3.6.2. Amplificación en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

El ADN extraído, comprende una mezcla de ADN de todos los organismos que se encuentran en la raíz, incluyendo a la planta. Por ello, se realizó la amplificación de fragmentos de ADN de HMA, utilizando marcadores genéticos (cebadores) específicos, mediante la técnica de PCR anidado (dos reacciones).

PCR1: Se realizó para amplificar el ADN de organismos pertenecientes a la división Glomeromycota, a partir de una región parcial del ADN ribosómico de 1800 pb. Esta región fue amplificada usando 0.4 μM de los cebadores SSUmAr y LSUmAf (Krüger *et al.*, 2009), 0.02 U/ μl de la polimerasa Taq KOD, 1X de buffer para KOD DNA polymerase, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.4 mM de dNTPs y 0.375 ng/ μl de ADN, para un volumen final de 10 μl . Esta amplificación se realizó en un termociclador automático con gradiente (Mastercycler, Eppendorf), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 45 segundos y elongación 75°C durante 2 minutos; finalmente una elongación a 72°C durante 10 minutos.

PCR2: Se realizó para amplificar una región parcial de la subunidad grande del ADN ribosómico obtenido de la primera PCR, de un tamaño aproximado de 450 pb. Para amplificar esta región, se utilizaron 0.2 μM de los cebadores FLR3 y NDL22, el primero eucariótico y el segundo específico para HMA, de la región LSU (Van Tuinen, 1998; Lekberg, 2012); 0.5 μl de ADN producto del PCR inicial, 0.02 U/ μl de la polimerasa Taq PLATINUM, 1X de buffer PLATINUM Taq Hi Fi, 2mM de sulfato de magnesio, 0.2 mM de dNTPs, para un volumen final de 25 μl . Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 33 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 62°C durante 30 segundos y elongación 68°C durante 40 segundos; finalmente una elongación a 68°C durante 10 minutos.

3.6.3. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis para confirmar la presencia de los fragmentos de interés. La corrida se realizó en un gel al 1.2% de agarosa, buffer TAE 1X y con las siguientes condiciones: 100 V, 180 mA y durante 30 minutos. Para este fin, se tomaron 5 μl de producto PCR II, mezclado con 2 μl de diamond y 2 μl de azul de bromofenol. El reactivo diamond, es un tinte fluorescente que se adhiere al ADN, lo cual permite su observación con luz UV

o azul; mientras que el azul, sirve como buffer de carga del ADN. Posteriormente se confirmaron en un fotodocumentador.

3.6.4. Mezcla equimolar y purificación del producto PCR

La mezcla se realizó a partir de los 32 productos de PCR II. Se colocaron 4 µl de cada muestra en un solo tubo de 0.2 ml y se homogeneizó con ayuda de una micropipeta, obteniéndose de esta manera 128 µl de mezcla final.

Posteriormente se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa estéril al 1.2%, buffer TAE 1X y con las siguientes condiciones: 100 V, 180 mA y durante 60 minutos.

Una vez obtenidos los fragmentos se realizó la purificación de ADN a partir del gel de agarosa, utilizando el *KIT GFX PCR DNA and GEL BAND PURIFICATION* (GE Healthcare Life Sciences). Para ello, con la ayuda de un bisturí se extrajo la banda de interés, se colocó en un tubo y se pesó y se realizó el procedimiento según las instrucciones del fabricante (anexo 2). Este kit, posee unos filtros que retienen las moléculas de ADN, posibilitando la eliminación de los restos de agarosa y el lavado del mismo. Finalmente se reservó el producto obtenido, el cual fue almacenado a -20°C para usos posteriores.

3.6.5. Ligación y transformación bacteriana

La ligación, consiste en insertar el fragmento de interés en un vector o molécula transportadora. El producto ligado se introduce en la bacteria, la cual posteriormente se multiplica, replicando el plásmido insertado.

La reacción de ligación se realizó con el ADN purificado y el vector pCR 2.1 del kit de clonación *TA cloning* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para ello el ADN fue diluido a 5.8 ng/µl, ya que, según el manual del vector, esta cantidad se determina en base a la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng de producto PCR} = \frac{\text{Ypb de producto PCR} \times 50 \text{ ng de vector}}{\text{Tamaño en pb de PCR vector (3900)}} = \frac{450 \times 50}{3900} = 5.76$$

Posteriormente se preparó la reacción, siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 3).

Para realizar la transformación bacteriana, se utilizó 1 µl de reacción de ligación y las células químicamente competentes de *E. coli One Shot TOP10* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Esta reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 4). Posteriormente, para introducir el plásmido en la bacteria, se realizó un shock térmico, colocando el vial con bacterias 1 minuto en hielo, 30 segundos en baño María a 42°C y 30 segundos adicionales en hielo.

Finalmente se sembraron las bacterias en medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl y 15 g de agar en 950 ml de agua desionizada), conteniendo adicionalmente 25 µl de X-gal (50 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml). La incubación se llevó a cabo a 37°C y durante 16 horas.

3.6.6. Selección de colonias positivas

Para diferenciar las colonias positivas, se utilizó el antibiótico kanamicina (50 mg/ml) y el compuesto orgánico X-gal (40 mg/ml). El primero para seleccionar las bacterias que contengan el plásmido, ya que este último contiene un gen de resistencia al antibiótico. De este modo, solo crecerán aquellas bacterias que fueron transformadas. Sin embargo, dentro de las bacterias transformadas, se encuentran aquellas que contienen el vector solo y otras el vector ligado al fragmento de interés. Para distinguirlos, se utilizó el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido), el cual da una coloración azul a aquellas colonias que contienen solo el vector cerrado, ya que estos contienen el gen *lacZ*, el cual es un inductor de la enzima β-galactosidasa, que hidroliza al X-gal en dos compuestos, uno de ellos al oxidarse, genera una coloración azul en las colonias transformadas sin el inserto. Por otro lado, las colonias de color blanco, son las positivas, es decir que contienen el inserto de interés. De esta forma, se seleccionaron 101 las colonias blancas para continuar con los análisis posteriores.

3.6.7. PCR de confirmación de clones con Taq KOD y cebadores FLR3 y NDL22

Una vez seleccionadas las colonias positivas, se realizó una PCR de confirmación. Para ello se enumeraron y se realizó la suspensión bacteriana de una porción de cada colonia en 10 µl de agua ultrapura. La amplificación se llevó a cabo utilizando 0.5 µl de la suspensión, 0.02 U/µl de la polimerasa KOD, 1X de buffer, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de los cebadores FLR3 y NDL22 (Van Tuinen, 1998; Lekberg, 2012).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 33 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 62°C

durante 30 segundos y elongación 72°C durante 40 segundos; finalmente una elongación a 72°C durante 10 minutos.

Para confirmar la presencia de los amplicones, se realizó la corrida en un gel de agarosa. Para ello, se tomaron 5 µl de producto PCR de cada muestra, se mezcló independientemente con 2 µl de diamond y 2 µl de azul de bromofenol y se cargaron en geles preparados con agarosa al 1.2% y buffer TAE 1X. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100 V, 180 mA y durante 30 minutos. Posteriormente se observaron los resultados en un fotodocumentador y se discriminaron las bandas según su nitidez. Producto de esta evaluación, se escogieron 71 colonias, para continuar con los análisis posteriores.

3.6.8. Extracción de ADN plasmídico y secuenciamiento

La extracción de ADN plasmídico, se realizó a las 71 colonias seleccionadas. Para ello se utilizó el Kit de miniprep QIAPREP (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 5). Este ADN puro, fue enviado a corporación Macrogen Inc. Korea, para ser secuenciado.

3.6.9. Análisis bioinformático

a. Selección de clones y construcción de biblioteca de clones

Del total de clones secuenciados, se seleccionaron aquellos clones que presentaron buena calidad de secuenciamiento y se descartaron las que mostraron errores y mala calidad. La biblioteca, se elaboró a partir de los clones seleccionados.

b. Determinación de Unidades Taxonómicas Operativas (OTU'S)

Las 63 secuencias seleccionadas fueron agrupadas mediante dos enfoques, el primero según la similaridad al 97% (árbol filogenético) y el segundo según el ancestro común mediante grupos o clados monofiléticos (red filogenética). Esta última agrupación considera el grado de parentesco entre las secuencias y definió los OTU's o filotipos.

- **Elaboración del árbol filogenético**

Inicialmente, se alinearon las secuencias obtenidas a partir de los clones, juntamente con secuencias de otras especies de HMA disponibles en la base de datos de GenBank (NBCI), en el programa online MEGA X versión 10.0.5. (Tamura *et al.*, 2007),

eliminando las secuencias pertenecientes a los cebadores. Luego, se realizó un agrupamiento inicial al 97% de similitud (Lekberg *et al.* 2012), mediante el algoritmo de unión de vecinos cercanos, el parámetro Kimura-2 como modelo de sustitución y 1000 repeticiones como *bootstrap*.

- **Elaboración de la red filogenética**

Una vez determinadas las secuencias representativas por cada OTU, se elaboró la red filogenética en el programa SplitsTree versión 4.14.8. Este método permitió realizar un agrupamiento más general, bajo el enfoque de clados monofiléticos, que muestra la proximidad entre las ramas e involucra un agrupamiento en menos del 97% de similitud (Lekberg *et al.*, 2012). Asimismo, mejora la capacidad de comprender la ecología de los grupos de secuencias (Powell *et al.*, 2011). Posteriormente, se definieron los nuevos OTU's o filotipos, agrupando los clones representativos.

- c. Análisis de rarefacción**

Con el fin de determinar la cantidad óptima de clones secuenciados, se realizó la curva de rarefacción. Esta curva indica el porcentaje de cobertura de unidades taxonómicas que representa el número de clones. Un porcentaje mayor al 70%, indica que los clones secuenciados representan significativamente a la cantidad de unidades taxonómicas y que éstas son suficientes para continuar con el estudio. Dicho análisis se realizó con el programa R versión 3.5.3.

- d. Alineamiento de secuencias**

De cada filotipo, se seleccionó una secuencia representativa, estas secuencias fueron comparadas a otras pertenecientes a la región 28S del ARNr, mediante la opción BLAST del banco de datos GenBank. Finalmente, se renombraron en función a la familia a la que pertenecen según el alineamiento.

3.6.10. Procedimientos basados en T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism)

a. Selección de enzimas de restricción

Para el presente trabajo, se escogieron cuatro enzimas de restricción, con un sitio de reconocimiento diferente. Estas, fueron utilizadas en simultáneo para la digestión de cada muestra. Para ello se realizó una serie de corrida de datos. Inicialmente, se realizó un alineamiento con el programa online MAFFT versión 6.864. Para este fin se modificó el nombre de cada secuencia indicando el número de OTU y el nombre de la muestra respectiva. Estos nombres fueron editados en un bloc de notas y se guardó en formato FASTA.

Una vez alineadas las secuencias, se realizó la selección de las enzimas de restricción, mediante el programa online REPK versión 1.3 (Collins & Rocard, 2007). Este programa, dio a conocer la combinación ideal de cuatro enzimas y sus isómeros que permitieron diferenciar los OTU'S, mediante distintos patrones de corte.

Posteriormente, con el fin de determinar los tamaños de corte de cada enzima, se realizó una corrida de datos en el programa TriFle (Junier *et al.*, 2008), el cual simuló los cortes, en base a los cebadores con los que se está trabajando, las secuencias alineadas y las enzimas seleccionadas. Finalmente se seleccionaron las enzimas de restricción Hpy8I, BsdI, AaNI y TaiI.

b. Obtención de ADN de HMA puro

- **PCR de ADN extraído con CTAB**

Inicialmente, se realizó una PCR anidada, para obtener los amplicones deseados. La primera reacción se preparó utilizando 0.4 μM de los cebadores SSUmAr y LSUmAf (Krüger *et al.*, 2009), 0.02 U/ μl de la polimerasa Taq KOD, 1X de buffer para KOD DNA polymerase, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.4 mM de DNTPs y 0.375 ng/ μl de ADN, para un volumen final de 10 μl . Esta amplificación se realizó un termociclador automático con gradiente (Mastercycler, Eppendorf), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 45 segundos y elongación 75°C durante 2 minutos; finalmente una elongación a 72°C durante 10 minutos.

La segunda reacción, se realizó utilizando 1 μl de ADN producto del PCR inicial, 0.2 μM de los cebadores FLR3 y NDL22, 0.02 U/ μl de la polimerasa *Taq* PLATINUM, 1X de buffer PLATINUM *Taq* Hi Fi, 2mM de sulfato de magnesio, 0.2 mM de DNTPs, para un volumen final de 40 μl . Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 33 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 62°C durante 30 segundos y elongación 68°C durante 40 segundos; finalmente una elongación a 68°C durante 10 minutos.

- **Electroforesis en geles de agarosa**

La corrida se realizó en un gel al 1.2% de agarosa, buffer TAE 1X y con las siguientes condiciones: 100V, 180mA y durante 30 minutos. Para este fin, se tomaron 40 μl de producto PCR II, mezclado con 3 μl de diamond y 3 μl de azul de bromofenol y se sembró el total de mezcla obtenido, en cada pocillo. Posteriormente se confirmaron en un fotodocumentador.

- **Purificación del producto PCR**

Para realizar la purificación, se utilizó el *KIT GFX PCR DNA and GEL BAND PURIFICATION*. Para ello, con la ayuda de un bisturí se extrajo la banda de interés, se colocó en un tubo y se pesó y se realizó el procedimiento según las instrucciones del fabricante (anexo 2). El producto obtenido, fue almacenado a -20°C para un PCR posterior con los cebadores marcados.

- e. **Amplificación de ADN con cebadores marcados mediante PCR**

A partir del producto purificado, se realizaron cuatro PCR's independientes por muestra. Para cada una se tomaron 2 μl de ADN (10 ng/ μl) y se preparó la mezcla, utilizando 0.2 μM de los cebadores FLR3 (dos marcados con FAM y los otros dos con PET) y NDL22, 0.02 U/ μl de la polimerasa *Taq* PLATINUM, 1X de buffer PLATINUM *Taq* Hi Fi, 2 mM de sulfato de magnesio y 0.2 mM de DNTPs, para un volumen final de 20 μl . De este producto, se tomaron 5 μl para ser confirmados en gel de agarosa al 1.2%, con condiciones similares a la anteriormente descrita.

f. Proceso de digestión enzimática

Para iniciar con este procedimiento, inicialmente se seleccionaron dos tintes fluorescentes, los cuales marcaron al cebador FLR3. Uno de color azul y el otro de color rojo. Estos tintes, se utilizaron para conocer los tamaños de fragmentos obtenidos a partir de la digestión enzimática y que fueron sometidos al analizador de picos. Estos picos se observan en función a la coloración de dichos marcadores. Por otro lado, cada tinte se utilizó para marcar los productos digeridos con dos enzimas. El tinte FAM (azul) marcó a las digestiones con las enzimas Hpy8I y BsdI y PET (rojo), a las digestiones con las enzimas AaNI y TaiI.

La digestión enzimática, se realizó partir del producto obtenido de la última PCR. Para ello se realizó la siguiente mezcla:

- **Enzima Hpy8I + producto PCR marcado con FAM:**

En un tubo de 1.5 ml, se mezcló 15 µl de producto PCR, 18 µl de agua grado molecular, 2 µl de buffer TANGO y 2 µl de enzima Hpy8I. Se agitó suavemente e incubó a 37°C durante 16 horas. Finalmente se inactivó incubando a 80°C durante 20 minutos.

- **Enzima BsdI + producto PCR marcado con FAM:**

En un tubo de 1.5 ml, se mezcló 15 µl de producto PCR, 18 µl de agua grado molecular, 2 µl de buffer TANGO y 2 µl de enzima BsdI. Se agitó suavemente e incubó a 55°C durante 16 horas. Finalmente se inactivó incubando a 80°C durante 20 minutos.

- **Enzima AaNI + producto PCR marcado con PET**

En un tubo de 1.5 ml, se mezcló 15 µl de producto PCR, 18 µl de agua grado molecular, 2 µl de buffer TANGO y 2 µl de enzima AaNI. Se agitó suavemente e incubó a 37°C durante 16 horas. Finalmente se inactivó incubando a 65°C durante 20 minutos.

- **Enzima TaiI + producto PCR marcado con PET**

En un tubo de 1.5 ml, se mezcló 15 µl de producto PCR, 18 µl de agua grado molecular, 2 µl de buffer R y 2 µl de enzima TaiI. Se agitó suavemente e incubó a 65°C durante 16 horas. Finalmente se inactivó mediante la purificación de ADN.

g. Confirmación de la digestión enzimática en gel de agarosa al 1%

Para confirmar el éxito de las digestiones, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% y TAE 1X. Para ello se tomaron 5 µl de cada producto digerido y se mezcló independientemente con 2.5 µl de diamond y 2.5 µl de azul de bromofenol. Esta corrida se realizó bajo las siguientes condiciones: con las siguientes condiciones: 100 V, y durante 30 minutos.

h. Mezcla de productos digeridos y purificación

Una vez confirmada la digestión, se realizó la mezcla de productos digeridos. Por muestra, en un tubo se mezcló la digestión de Hpy8I marcado con FAM con la digestión de AaNI marcado con PET; en otro tubo, la digestión de BsdI marcado con FAM con la digestión de TaiI marcado con PET. Este patrón de mezcla se realizó para todas las muestras. Posteriormente, se realizó una purificación de estos productos, debido a que cada mezcla contiene el producto digerido por dos enzimas, enzimas y reactivos de digestión. Para realizar este procedimiento se utilizó el kit de purificación *QIAEX II Gel Extraction* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 6). Mediante este procedimiento, se retiraron todos los restos que están en solución juntamente con el ADN, mientras este último, quedó adherido a moléculas de sílice. Finalmente, se realizaron dos lavados que permitieron eliminar las moléculas de sílice, dejando en suspensión el ADN puro.

i. Análisis de fragmentos

Los productos purificados, fueron analizados en la corporación MacroGen Korea Inc, mediante el servicio Genescan. Posteriormente, los resultados fueron procesados, con el programa Peak Scanner versión 2.0.

3.7. ANÁLISIS DE RIQUEZA

3.7.1. Identificación de OTU's

Las secuencias representativas, fueron identificadas mediante la comparación con secuencias pertenecientes a la región del ARN ribosomal 28S de otras especies de HMA registradas en la base de datos de GenBank.

3.7.2. Determinación de filotipos

Para coincidir los tamaños de picos obtenidos por el programa Peak Scanner (Versión 3.5.3) y los tamaños teóricos de los clones (secuencias representativas), se utilizó el paquete TRAMPR (FitzJohn & Dickie 2007), de R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019), teniendo como nivel de umbral, tres pares de base. Asimismo, se eliminaron todos aquellos fragmentos menores a 65 y mayores a 460 pares de base, similares a los tamaños teóricos.

3.7.3. Análisis de riqueza de OTU's

Los datos obtenidos a partir de las comparaciones de tamaños de fragmento, fueron organizados en una matriz de presencia / ausencia de OTU's de cada muestra. A partir de este gráfico se calculó la riqueza (S) o número de OTU's presentes en cada muestra.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1. Comparación de medias de las características fisicoquímicas del suelo

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre las variables fisicoquímicas del suelo, de acuerdo a la localidad de muestreo y la edad de la plantación, se realizó un análisis de comparación de medias de cada variable cuantitativa mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Este análisis se realizó utilizando el *software* Yupana (Lozano-Isla *et al.*, 2018).

3.8.2. Análisis de componentes principales en función de las localidades de muestreo y edades de las parcelas

Inicialmente, se realizó un análisis exploratorio de datos, con el fin de seleccionar las variables que explican mejor la variabilidad de datos, en función a la localidad y edad de las parcelas. Para ello se elaboró un Análisis de Componentes Principales, para lo cual se

empleó el paquete estadístico *FactoMineR*, para la estandarización de los datos (Kassambara, 2017) del programa R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019). En este análisis se representaron todas las variables cuantitativas obtenidas del muestreo en campo como características fisicoquímicas del suelo y la altitud de la parcela. Asimismo, se representaron los valores obtenidos de la investigación como el porcentaje de colonización y la riqueza de OTU's de cada parcela. Para este análisis, se seleccionaron los dos primeros componentes que representan la mayor variabilidad de los datos (López-García *et al.*, 2013). Adicionalmente, se representaron algunos valores en gráficos de puntos y barras, para observar con mayor claridad los resultados.

3.8.3. Análisis de correlación múltiple de variables

Para determinar el grado de correlación entre las variables estudiadas, se realizó un análisis de correlación múltiple utilizando el paquete estadístico *corrplot* (Wei *et al.*, 2017) del programa R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019). Este análisis consideró todas las variables cuantitativas correspondientes a las características fisicoquímicas del suelo y la altura de la parcela y los datos obtenidos de la determinación del porcentaje de colonización y riqueza.

Por otro lado, se realizó un análisis de comparación de medias mediante la prueba de Tukey, para aquellas variables que presentaron una correlación significativa moderada, fuerte o muy fuerte ($r \geq 0.5$) en función al grado de colonización de HMA y la riqueza de OTU's (Martínez *et al.*, 2009; Arévalo, 2016; Arias & Chillo, 2017).

3.8.4. Análisis de conglomerados (clusters)

El análisis de conglomerados, es una técnica multivariante que agrupa variables en función a la máxima similitud. Este análisis se utilizó para comparar las comunidades de HMA presentes en las raíces de cada planta de sachá inchi y para observar las diferencias o similitudes entre ellas. Este agrupamiento se llevó a cabo con el paquete estadístico *factoextra* (Kassambara & Mundt, 2019) del programa R versión 3.5.3 (R Core Team, 2019), utilizando una matriz de distancias en base al índice de Jaccard (Jaccard, 1908) y el método jerárquico Ward (Ward, 1963; citado por Murtagh & Legendre, 2011).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LOS SUELOS

4.1.1. Características generales

Según Garrido, (1993) y Andrades & Martínez, (2014), el análisis de suelo realizado (anexo 7), se puede interpretar de la siguiente forma:

- **Localidad Paucarpata – Lamas:**

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango A (plantas de un año), se caracterizaron por ser básicos, no salinos, con una presencia alta de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, de baja a media cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango B (plantas de cuatro años), se caracterizaron por ser básicos, no salinos, con una presencia muy alta de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, baja cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

- **Localidad Cashnahuasi – El Dorado:**

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango A (plantas de un año), se caracterizaron por ser de pH neutro, no salinos, con una presencia media de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, de baja a media cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango B (plantas de seis años), se caracterizaron por ser de pH neutro, no salinos, con una presencia baja de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, baja cantidad de fósforo, alta capacidad

de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

- **Localidad San Antonio – Picota**

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango A (plantas de seis meses), se caracterizaron por ser básicos, no salinos, con una presencia alta de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, baja cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango B (plantas de tres años y seis meses), se caracterizaron por ser básicos, no salinos, con una presencia muy alta de carbonatos de calcio, porcentaje medio de materia orgánica, de baja cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura franco arcilloso.

- **Localidad Nuevo Progreso – Bellavista**

Los suelos de las plantas pertenecientes al rango A y rango B se caracterizaron por ser básicos, no salinos, con una presencia muy alta de carbonatos de calcio, alto porcentaje de materia orgánica, baja cantidad de fósforo, alta capacidad de intercambio catiónico, alta cantidad de potasio, alto porcentaje de nitrógeno y de textura arcilloso.

4.1.2. Comparación de medias de las variables fisicoquímicas

De forma general, la tabla 3 muestra las características promedio de los suelos de cada parcela y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las variables, que presentaron diferencias significativas en función de la localidad fueron: pH, conductividad eléctrica, contenido de carbonato de calcio, materia orgánica, fósforo y potasio; concentración de calcio, magnesio, potasio y sodio y porcentaje de saturación de bases. En función a la variable edad, solo se observó diferencia significativa en las variables pH y contenido de fósforo en la localidad de Cashnahuasi – El Dorado. Por otro lado, las demás variables son estadísticamente similares a nivel de localidad y edad.

Tabla 3. Análisis de suelo y comparación de medias de los parámetros fisicoquímicos del suelo de plantaciones productoras de sacha inchi de dos rangos de edad en cuatro localidades de la región San Martín

Localidad	Paucarpata - Lamas		Cashnahuasi - El Dorado		San Antonio – Picota		Nuevo Progreso – Bellavista	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Rango de edad								
pH	7.7 ab	7.7 a	7.3 b	6.8 c	7.8 a	7.9 a	7.8 a	7.8 a
C.E. (dS/m)	0.4 abc	0.4 abc	0.3 bc	0.3 c	0.5 ab	0.4 abc	0.4 abc	0.5 a
CaCO₃ (%)	14.5 c	17.7 bc	2.3 d	0.2 d	12.1 c	16.2 bc	23.2 ab	30.9 a
M.O. (%)	4.8 b	4.6 b	8.1 ab	9.7 a	4.9 b	3.4 b	5.3 ab	4.7 b
P (ppm)	8.9 ab	4.6 bc	11.9 a	6.5 bc	6.6 abc	4.3 bc	3.6 c	3.8 bc
K (ppm)	353.3 b	256.8 b	459.8 b	421.8 b	889.5 a	858 a	439.3 b	492 b
Arena (%)	32.5 a	35.5 a	28.5 a	30 a	27 a	28.5 a	27.5 a	25 a
Textura								
Limo (%)	28 a	34 a	35.5 a	32 a	34 a	33.5 a	31.5 a	34 a
Arcilla (%)	39.5 a	30.5 a	36 a	38 a	39 a	38 a	41 a	41 a
CIC (meq/100g)	34.4 a	28.2 a	35.4 a	35.1 a	28.8 a	26 a	33.2 a	28.6 a
Ca+2	30.3 a	24.9 ab	27.1 ab	26.1 ab	22.1 ab	19.8 b	27.8 ab	22.6 ab
Cationes								
mg+2	3.2 abc	2.5 c	2.6 bc	2.6 c	4.7 a	4 abc	4.4 ab	4.8 a
cambiables								
K+	0.8 b	0.7 b	1.1 b	0.9 b	1.9 a	2.0 a	0.9 b	1 b
Na+	0.1 ab	0.1 ab	0.1 b	0.1 ab	0.1 ab	0.2 ab	0.1 ab	0.2 a
Suma de Cationes	34.4 a	28.2 a	31 a	29.7 a	28.8 a	26 a	33.2 a	28.6 a
Suma de Bases	34.4 a	28.2 a	31 a	29.7 a	28.8 a	26 a	33.2 a	28.6 a
% Sat. De Bases	100 a	100 a	88.1 b	84.7 b	100 a	100 a	100 a	100 a
N (%)	0.3 a	0.3 a	0.4 a	0.4 a	0.3 a	0.3 a	0.4 a	0.4 a

A = Plantas menores de 1 año, B = Plantas mayores de 3 años

4.2.DETERMINACIÓN DE UNIDADES TAXONÓMICAS (OTU´s)

4.2.1. Biblioteca de secuencias

A partir del secuenciamiento de los clones, se obtuvieron un total de 72 secuencias, de las cuales se seleccionaron 63 (87.5%), correspondientes al phylum Glomeromycota; las restantes pertenecieron a otros organismos o mostraron errores de secuenciamiento.

4.2.2. Determinación de OTU'S

a. Agrupamiento al 97% de similitud

Este enfoque considera agrupar las muestras que tienen 97% de similitud entre sus secuencias. Se representa gráficamente en un árbol filogenético anexado al presente informe, por tener un tamaño grande (anexo 8). Para resumir esta figura, se realizó un árbol, considerando solo las secuencias del estudio (Figura 2). El número de unidades taxonómicas inicialmente identificadas mediante este enfoque fueron 29. Cada secuencia fue nombrada según el número de clon (SACHA1 – SACHA 72) (Lekberg *et al.*, 2014).

b. Agrupamiento general por clados monofiléticos

Mediante el enfoque de clados monofiléticos, se definieron el número final de filotipos o unidades taxonómicas (OTU'S), dando como resultado 13 unidades, que representaron la riqueza total de las cuatro parcelas muestreadas (Figura 3). Este gráfico, muestra el agrupamiento en base a un antecesor común, considerándose las ramas más cercanas como un filotipo. Asimismo, las ramas que se encuentran más separadas, están menos relacionadas filogenéticamente. La nueva denominación de las muestras posterior al agrupamiento se muestra en la tabla 4 (Lekberg *et al.*, 2014).

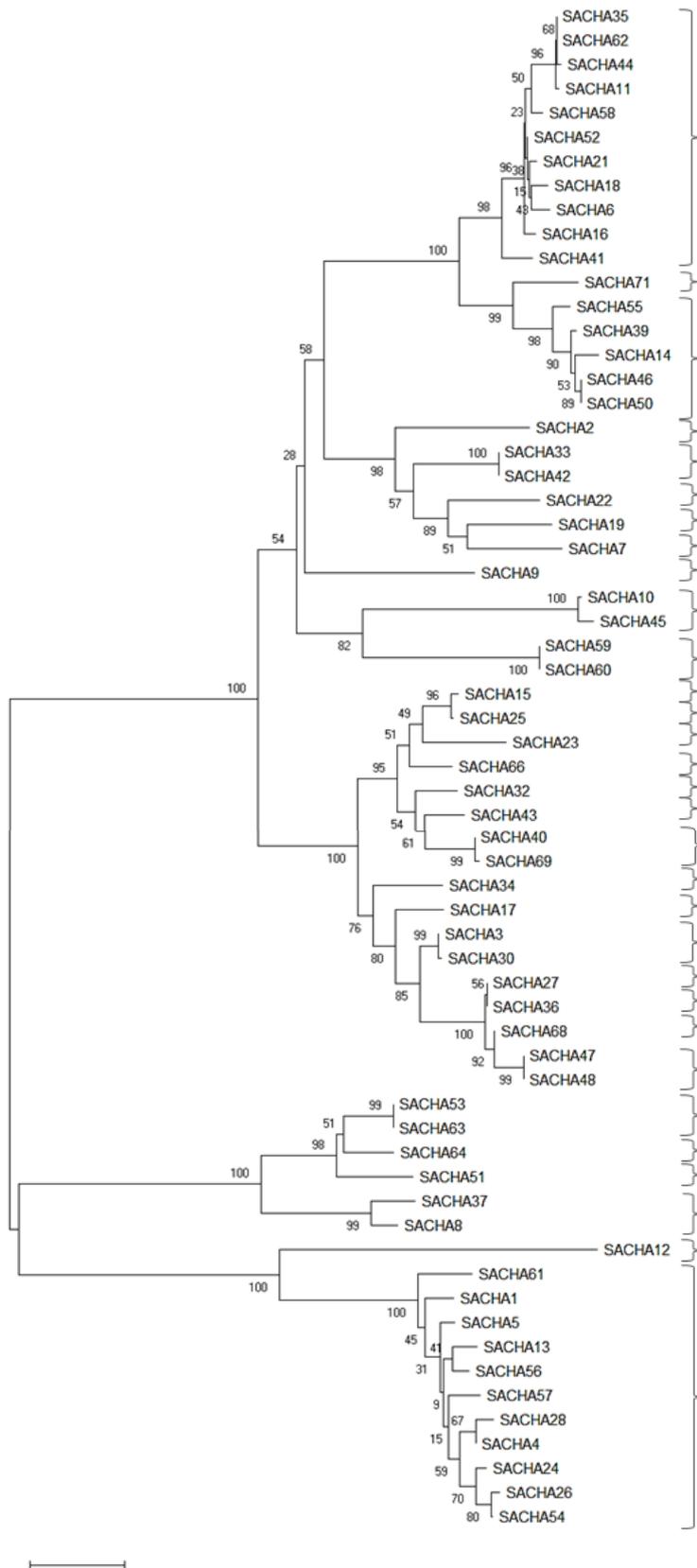


Figura 2. Agrupamiento al 97% de similitud entre 63 secuencias pertenecientes a ADN de HMA asociados a raíces de sachá inchi de dos rangos de edad diferentes de cuatro localidades de la región San Martín

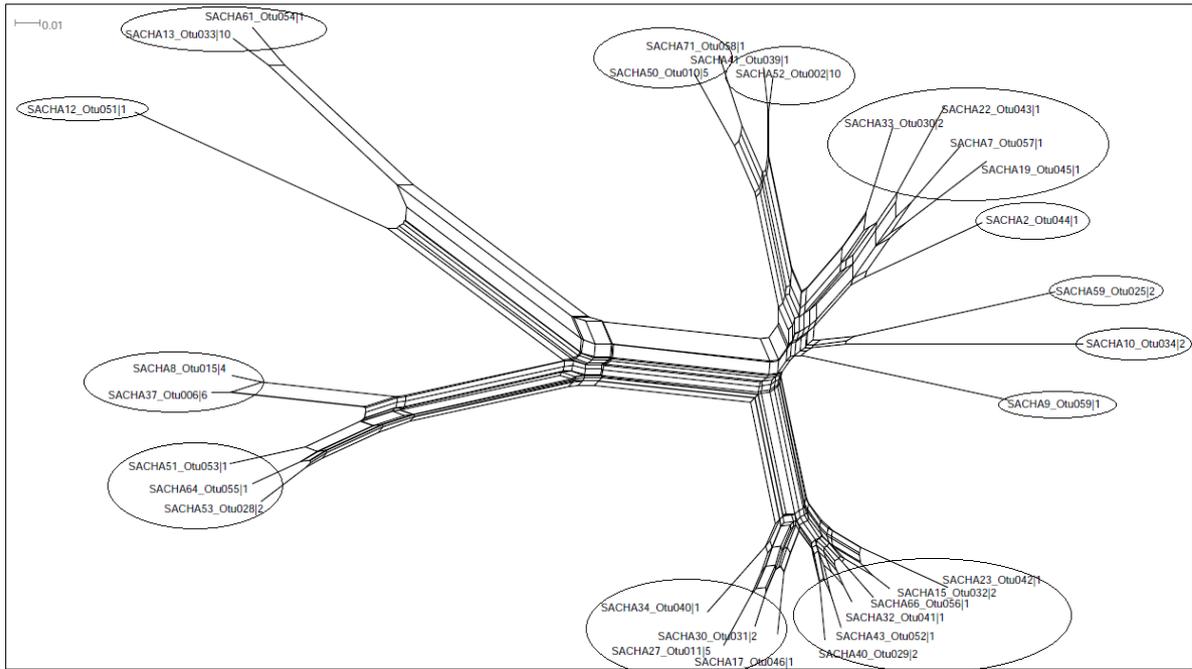


Figura 3. Red filogenética y agrupamiento general bajo el enfoque de clados monofiléticos, en 13 unidades taxonómicas operativas (OTU's), a partir de las secuencias representativas de las 29 unidades taxonómicas preliminares

Tabla 4. Denominación de las OTU's representativas preliminares y las secuencias que agrupa al 97 % de similitud

OTU preliminar	Secuencia representativa (1° agrupamiento)	Número de secuencias	OTU preliminar	Secuencia representativa (1° agrupamiento)	Número de secuencias
OTU 1	SACHA13	11	OTU 8	SACHA2	1
	SACHA61		OTU 9	SACHA10	2
OTU 2	SACHA12	1	OTU 10	SACHA59	2
	SACHA51		SACHA15		
OTU 3	SACHA53	4	SACHA23		
	SACHA64		OTU 11	SACHA32	8
OTU 4	SACHA50	6	SACHA40		
	SACHA71		SACHA43		
OTU 5	SACHA41	11	SACHA66		
	SACHA52		SACHA17		
OTU 6	SACHA9	1	OTU 12	SACHA27	9
	SACHA7		SACHA30		
OTU 7	SACHA19	5	SACHA34		
	SACHA22		SACHA8	2	
	SACHA33		SACHA37		

c. Representatividad de muestras

Este análisis fue realizado mediante la elaboración de una curva de rarefacción. La curva indica el porcentaje de cobertura de unidades taxonómicas que representa el número de clones. El resultado predijo un total de 16 filotipos que representan el 100% de OTU's presentes en la mezcla de ADN, por lo que los 13 filotipos obtenidos representaron el 81%, este valor se consideró como suficiente para considerar a la muestra representativa, lo que fue determinante para continuar con el estudio (figura 4).

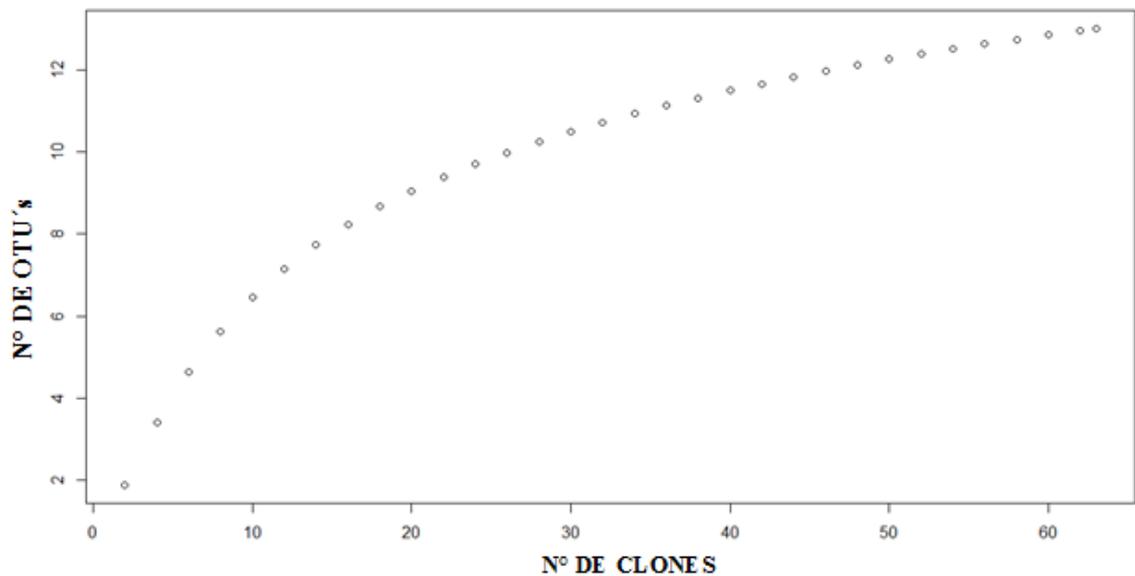


Figura 4. Curva de rarefacción de los 63 clones (eje X) y las 13 unidades taxonómicas (eje Y) obtenidas mediante el agrupamiento final

4.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE HMA ASOCIADOS AL CULTIVO DE SACHA INCHI EN LAS PARCELAS MUESTREADAS

4.3.1. Alineamiento de los filotipos

Las 13 secuencias representativas, fueron identificadas mediante comparación con la base de datos del phylum Glomeromycota, de la región 28S, registrados en el GenBank (Tabla 5). Las secuencias que se llegaron a identificar como especie fueron: *Glomus trimurales* (OTU2), *Oehlia diaphana* (OTU6) y *Acaulospora tuberculata* (OTU13); a nivel de género: *Diversispora* (OTU1), *Glomus* (OTU4, OTU5 y OTU10), *Rhizophagus* (OTU 7 y OTU8) y *Funneliformis* (OTU11) y las tres secuencias restantes (OTU3, OTU9 y OTU12), son OTU's no reportados pertenecientes al orden Glomerales (OTU9) o al phylum Glomeromycota

(OTU3 y OTU12). El término uncultured hace referencia a aquellos hongos que no han sido aislados y solo fueron identificados como especies ambientales, presentes en una mezcla de ADN. Para diferenciar con mayor claridad los OTU's, se renombraron en base a la familia a la que pertenecen.

Tabla 5. Correspondencia de OTU's representativos pertenecientes ADN de HMA asociados a raíces de plantaciones de sacha inchi de dos rangos de edad en cuatro localidades de la región San Martín y secuencias de la base de datos GenBank

OTU	Nombre de OTU	Familia	Secuencia más cercana (n° de accesión)	Cobertura	Homología
OTU1	Div1	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> * (LC416144.1)	95%	95.56%
OTU2	Glo2	Glomeraceae	<i>Glomus trimurales</i> (FJ461854.1)	89%	95.05%
OTU3	Aca3	Acaulosporaceae	<i>Glomeromycota</i> * (KY114635.1)	100%	94.68%
OTU4	Glo4	Glomeraceae	<i>Glomus</i> * (JQ218218.1)	100%	95.67%
OTU5	Glo5	Glomeraceae	<i>Glomus</i> * (KF849703.1)	100%	94.44%
OTU6	Glo6	Glomeraceae	<i>Oehlia diaphana</i> (MG836662.1)	100%	88.83%
OTU7	Glo7	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i> * (LC416196.1)	95%	92.43%
OTU8	Glo8	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i> * (LC416198.1)	95%	89.41%
OTU9	Glo9	Glomeraceae	<i>Glomerales</i> * (KC411100.1)	91%	97.35%
OTU10	Glo10	Glomeraceae	<i>Glomus</i> * (FM992381.1)	100%	96.81%
OTU11	Glo11	Glomeraceae	<i>Funneliformis</i> * (LC416202.1)	95%	97.18%
OTU12	Glo12	Glomeraceae	<i>Glomeromycota</i> * (JX276910.1)	100%	95.37%
OTU13	Aca13	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora tuberculata</i> (AF378437.1)	100%	98.64%

*Uncultured

4.3.2. Distribución y riqueza de OTU's de HMA

Una vez definidas las denominaciones de las unidades taxonómicas, se determinó su presencia o ausencia en cada planta muestreada, representada mediante una matriz (Tabla 6); obtenida mediante el análisis de picos (fragmentos). En la matriz, se observan las 32 plantas estudiadas y los OTU's que están presentes o ausentes. Asimismo, se muestra el número de OTU's o riqueza y el resumen de OTU's reportados en cada parcela (Tabla 7 y 8).

Tabla 6. Presencia y ausencia de los diferentes OTU's de HMA asociadas a raíces de cada planta de sachu inchi según rango de edad y localidad en la región San Martín

Localidad	Rango de edad	Edad	PLANTA	Div1	Glo2	Aca3	Glo4	Glo5	Glo6	Glo7	Glo8	Glo9	Glo10	Glo11	Glo12	Aca13	
Paucarpata – Lamas	A (< 1 año)	1 año	LAPAAP1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			LAPAAP3	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			LAPAAP4	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
			LAPAAP5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	B (> 3 años)	4 años	LAPABP1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	
			LAPABP2	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
			LAPABP3	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			LAPABP4	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	
Cashnahuasi - El Dorado	A (< 1 año)	1 año	DOCAAP1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
			DOCAAP2	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
			DOCAAP3	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
			DOCAAP4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	B (> 3 años)	6 años	DOCABP2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
			DOCABP3	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
			DOCABP4	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
			DOCABP5	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	
San Antonio – Picota	A (< 1 año)	0.5 años	PISAAP1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	
			PISAAP2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			PISAAP3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	
			PISAAP5	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	
	B (> 3 años)	3.5 años	PISABP1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			PISABP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
			PISABP3	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	
			PISABP4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Nuevo Progreso – Bellavista	A (< 1 año)	0.25 años	BEPOAP1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
			BEPOAP2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
			BEPOAP3	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
	B (> 3 años)	5 años	BEPOAP4	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
			BEPOBP1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	
B (> 3 años)	5 años	BEPOBP3	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0		
		BEPOBP4	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0		
		BEPOBP5	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0		

Tabla 7. Riqueza de HMA's registrados en raíces de plantas de sachá inchi según la edad en cuatro localidades de la región de San Martín

Localidad	Edad	Planta	Riqueza (S)		
Paucarpata – Lamas	1 año	LA_PA_A_P1	9		
		LA_PA_A_P3	7		
		LA_PA_A_P4	9		
		LA_PA_A_P5	11		
		LA_PA_B_P1	6		
	4 años	LA_PA_B_P2	10		
		LA_PA_B_P3	8		
		LA_PA_B_P4	7		
		Cashnahuasi - El Dorado	1 año	DO_CA_A_P1	9
				DO_CA_A_P2	9
DO_CA_A_P3	9				
DO_CA_A_P4	12				
DO_CA_B_P2	2				
6 años	DO_CA_B_P3		9		
	DO_CA_B_P4		8		
	DO_CA_B_P5		7		
	San Antonio – Picota		0.5 años	PI_SA_A_P1	6
				PI_SA_A_P2	7
PI_SA_A_P3		5			
PI_SA_A_P5		6			
PI_SA_B_P1		7			
3.5 años		PI_SA_B_P2	3		
		PI_SA_B_P3	7		
		PI_SA_B_P4	5		
		Nuevo Progreso – Bellavista	0.25 años	BE_PO_A_P1	8
				BE_PO_A_P2	8
BE_PO_A_P3	7				
BE_PO_A_P4	8				
BE_PO_B_P1	7				
5 años	BE_PO_B_P3		9		
	BE_PO_B_P4		8		
	BE_PO_B_P5		8		

Tabla 8. Riqueza y OTU's reportadas según edad de parcela de producción de sachá inchi en cuatro localidades en la región de San Martín

Localidad	Rango de Edad	OTU's reportados	Riqueza de OTU's
Paucarpata – Lamas	A	<i>Glomus trimurales</i> , <i>Oehlia diaphana</i> , <i>Acaulospora tuberculata</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>); Glo4, Glo5, Glo10 (<i>Glomus</i>); Glo7, Glo8 (<i>Rhizophagus</i>); Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Aca3, Glo9 y Glo12	13
	B	<i>Oehlia diaphana</i> , <i>Acaulospora tuberculata</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>), Glo4, Glo5, Glo10 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Glo9 y Glo12	10
Cashnahuasi - El Dorado	A	<i>Glomus trimurales</i> , <i>Oehlia diaphana</i> , <i>Acaulospora tuberculata</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>), Glo4, Glo5, Glo10 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Aca3, Glo9 y Glo12	12
	B	<i>Oehlia diaphana</i> , <i>Acaulospora tuberculata</i> , Glo4, Glo5 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Aca3, Glo9 y Glo12	9
San Antonio – Picota	A	<i>Oehlia diaphana</i> , Glo4, Glo5 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Glo9 y Glo12	7
	B	<i>Glomus trimurales</i> , <i>Oehlia diaphana</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>), Glo4, Glo5 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Glo9 y Glo12	9
Nuevo Progreso – Bellavista	A	<i>Oehlia diaphana</i> , <i>Acaulospora tuberculata</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>), Glo4, Glo5, Glo10 (<i>Glomus</i>); Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Glo9 y Glo12	10
	B	<i>Oehlia diaphana</i> , Div1 (<i>Diversispora</i>), Glo4, Glo5, Glo10 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Aca3, Glo9 y Glo12	10

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.2.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Fue elaborado a partir de las siguientes variables fisicoquímicas del suelo: pH, conductividad eléctrica (C.E.), porcentaje de carbonatos de calcio (CaCO₃), porcentaje de materia orgánica (M.O.), concentración de fósforo (P), potasio cambiante y disponible (K1 y K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), aluminio (Al), capacidad de intercambio catiónico (CIC), cationes, porcentaje de saturación de bases, nitrógeno (N) y cantidad de arena, limo y arcilla. Asimismo, también fueron incluidos las variables respuesta: grado de colonización micorrízica y la riqueza de OTU's.

a. Análisis de componentes principales en función de las localidades de muestreo

El análisis en ACP (Figura 5), mostró que, la localidad de San Antonio (Picota) difiere totalmente de Cashnahuasi (El Dorado) y Paucarpata (Lamas) en función de las variables estudiadas. Por otra parte, comparte ciertos atributos con la localidad de Nuevo Progreso (Bellavista). Asimismo, se puede observar que la localidad de Paucarpata, comparte ciertas características con Nuevo Progreso y Cashnahuasi. Por otra parte, la localidad de Nuevo Progreso, difiere totalmente de Cashnahuasi, pero comparte características con San Antonio y Paucarpata. Respecto a la localidad de Cashnahuasi, se puede observar que no compartió características con las localidades de Nuevo Progreso y San Antonio.

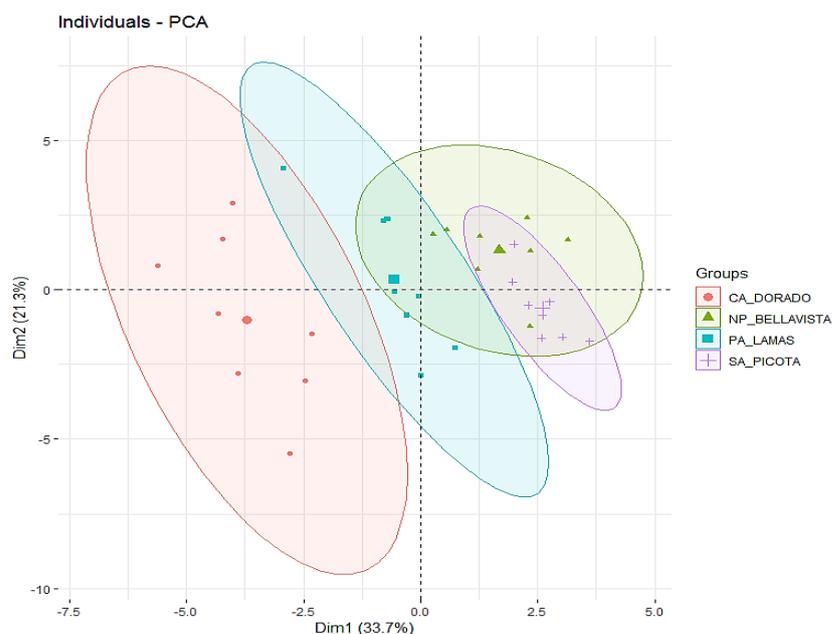


Figura 5. Agrupación de localidades en función a las variables fisicoquímicas del suelo, riqueza de OTU's y grado de colonización micorrízica.

Asimismo, la figura 6, muestra las variables que están influenciando sobre la variabilidad de las parcelas. La importancia de cada variable, está representada por el tamaño de un vector, de esta manera, se observa que las variables que están influenciando en mayor grado son: Altitud, CIC, calcio, suma de cationes, conductividad eléctrica, porcentaje de colonización, magnesio, pH, saturación de bases, CaCO₃ y limo. Asimismo, esta información se corrobora en la tabla 9.

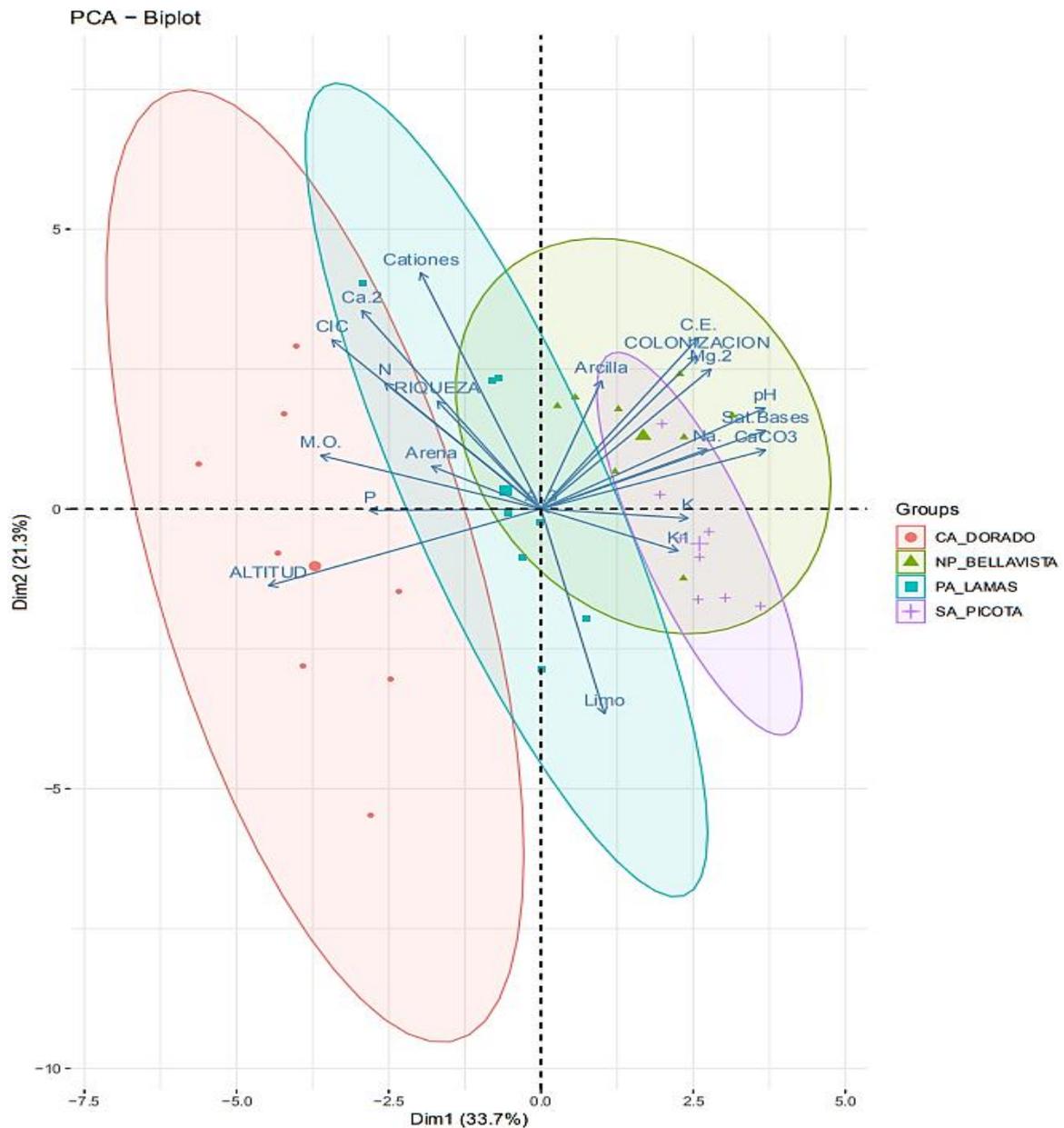


Figura 6. ACP de las variables fisicoquímicas del suelo, porcentaje de colonización y riqueza y agrupamiento por localidades. Las flechas indican como dirigen cada variable la variabilidad de las parcelas. La longitud de cada flecha indica la fuerza con la cual dirige la variabilidad, por lo que se consideran más importantes para el estudio. Flechas cercanas entre sí, presentan una mayor relación.

Tabla 9. Porcentaje de variabilidad que explica cada variable en los dos primeros componentes principales

Variable	Dim 1	Dim 2
Suma de Cationes	2.4379	17.5631
Ca+2 (meq/100g)	5.3970	12.4012
CIC (meq/100g)	7.3652	9.0139
Altitud (msnm)	12.4796	1.8527
Limo (%)	0.6774	13.1920
C.E. (dS/m)	4.1648	9.2186
pH	8.4398	3.2173
Colonización (%)	4.0968	7.3611
mg+2 (meq/100g)	4.8472	6.1468
Sat.Bases (%)	8.4959	1.9319
CaCO3 (%)	8.4885	1.0898
N (%)	4.1028	4.9916
M.O. (%)	8.1721	0.9031
Arcilla (%)	0.6152	5.1657
Na + (meq/100g)	4.6478	1.1272
Riqueza	1.8078	3.6658
P (ppm)	4.9541	0.0008
K+ (meq/100g)	3.1644	0.5550
K (ppm)	3.6319	0.0271
Arena (%)	2.0139	0.5754
Al+3 (meq/100g)	0.0000	0.0000

- **Colonización micorrízica**

Otra información que muestra la figura 6 es la correlación general que existe entre las variables. El grado de colonización (%) varía en forma inversa a la altitud de la parcela, de manera que mientras más alta se encuentra la parcela, menor será el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de sachá inchi. Por otro lado, esta variable posee estrecha correlación de forma directa con la conductividad eléctrica y el contenido de magnesio disponible en el suelo. Asimismo, varía de forma directa con el pH, saturación de bases, sodio, carbonatos de calcio y contenido de arcilla. En base a estas características, las parcelas que mostraron un mayor valor de colonización fueron Nuevo Progreso (Bellavista) y San Antonio (Picota).

- **Riqueza de OTU's**

La riqueza de OTU's, a diferencia del porcentaje de colonización, mostró una relación directa principalmente con la capacidad de intercambio catiónico del suelo y el contenido de calcio disponible en el suelo. De igual forma con el porcentaje de materia orgánica, suma de cationes y contenido de arena presente en el suelo. Respecto al contenido de potasio libre en el suelo, mostró una relación inversa, de manera que cuanto más alta fue la cantidad de potasio, menor fue la riqueza de hongos micorrízicos arbusculares dentro de la raíz. En base a estas características, se observa que las localidades que presentaron mayor riqueza de OTU's fueron Cashnahuasi (El Dorado) y Paucarpata (Lamas). Para corroborar este resultado, la tabla 10 muestra los valores obtenidos en función a la riqueza.

Tabla 10. Riqueza de OTU's en ocho parcelas de sachá inchi en cuatro localidades de la región San Martín

Localidad	Rango de Edad	N° total de OTU's
Paucarpata - Lamas	A	13
	B	10
Cashnahuasi - El Dorado	A	12
	B	9
San Antonio - Picota	A	7
	B	9
Nuevo Progreso - Bellavista	A	10
	B	10

b. Análisis de componentes principales en función de las edades del cultivo

A nivel de rango de edad, las plantas menores a un año y mayores a tres años no mostraron diferencias en función a las variables estudiadas anteriormente. La figura 7, muestra que no hay conformaciones según rango de edad, ya que todas se ubican dentro de un mismo conjunto, excepto una planta del rango de plantas mayores a tres años. No se observa variabilidad a nivel general, sin embargo, cada grupo presenta una tendencia a dirigirse de manera opuesta ente ellas.

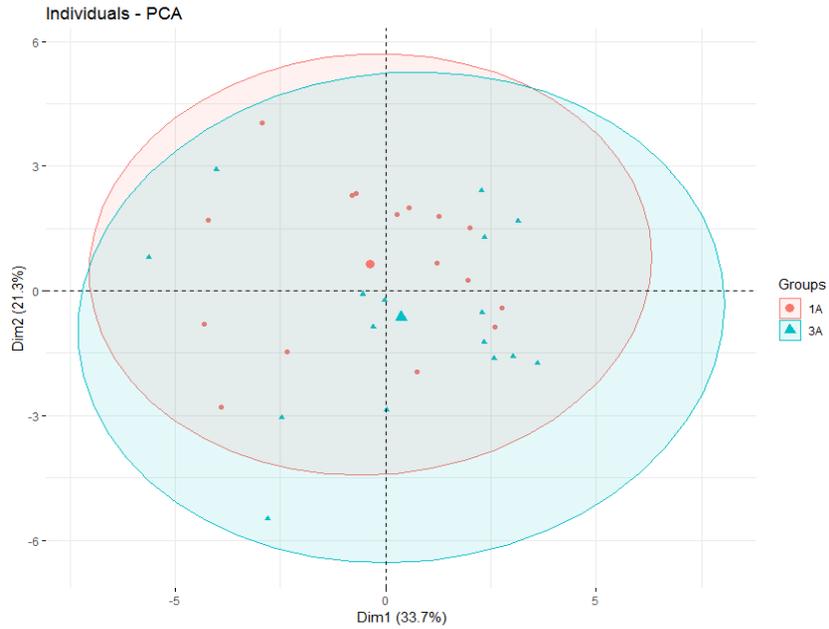


Figura 7. Rangos de edad agrupadas en función a las variables fisicoquímicas del suelo, riqueza de OTU's y grado de colonización micorrítica. Las intersecciones, muestran características comunes. 1A= < a un año, 3A=> a tres años

Asimismo, la figura 8, muestra la influencia de cada variable sobre la edad del cultivo.

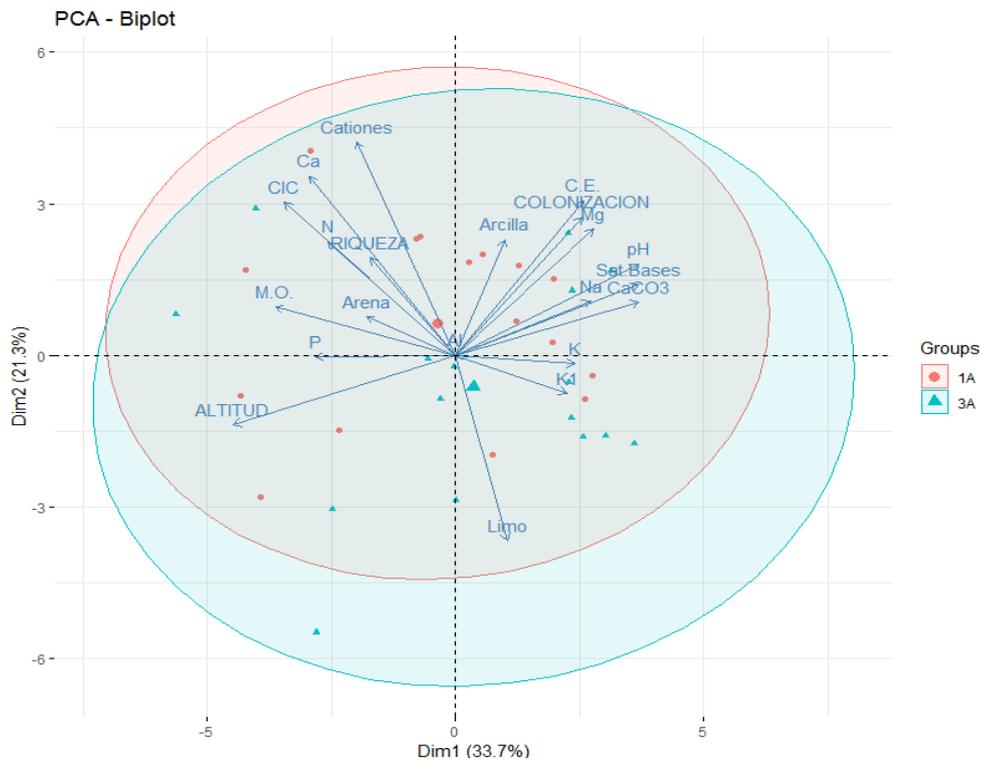


Figura 8. ACP de las variables fisicoquímicas del suelo, porcentaje de colonización y riqueza y agrupamiento por rangos de edad. Las lechas indican como dirigen cada variable la variabilidad de las parcelas. La longitud de cada flecha indica la fuerza con la cual dirige la variabilidad, por lo que se consideran más importantes para el estudio. Flechas cercanas entre sí, presentan una mayor relación.

- **Colonización micorrízica**

El grado de colonización micorrízica no mostró alguna tendencia según el rango de edad. El comportamiento de esta variable según la figura 8 está explicado en su mayoría por la conductividad eléctrica, el contenido de magnesio disponible en el suelo, pH, saturación de bases, sodio, carbonatos de calcio y contenido de arcilla; estas variables influyen de forma directa. Por otro lado, mostró una relación inversa respecto a la altitud de la parcela, por lo que las plantas ubicadas a mayor altitud, mostraron una tendencia a presentar menor grado de colonización.

Para complementar este resultado, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), representada en la figura 9. Se puede observar que existe diferencia significativa entre el grado de colonización de la parcela del rango de edad A, localizada en la localidad de San Antonio (Picota) en comparación con los dos rangos de edad de Cashnahuasi (El Dorado). Asimismo, la parcela correspondiente al rango A localizada en Cashnahuasi (El Dorado), se mostró significativamente diferente a la del rango B de Nuevo Progreso (Bellavista). Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre rangos de edad dentro de ninguna localidad, lo cual podría indicar que el factor edad no determinó el grado de colonización.

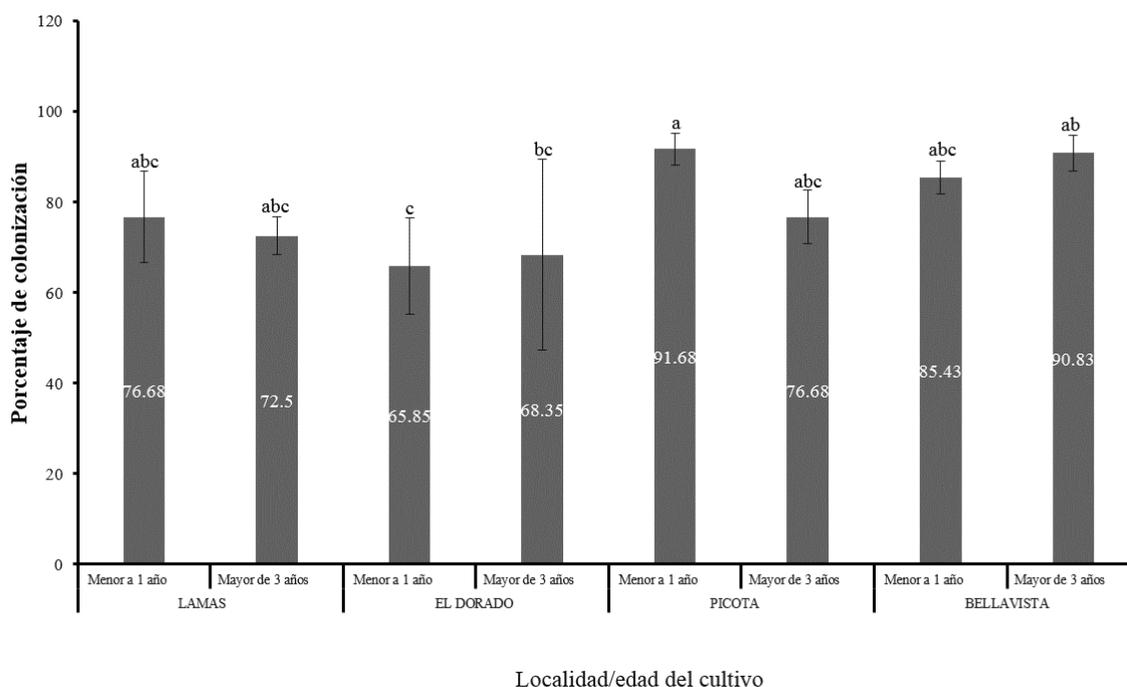


Figura 9. Gráfico de barras indicando la comparación de medias del grado de colonización micorrízica en plantas de sachu inchi en ocho parcelas de cuatro localidades de la región San Martín

En el presente estudio, no se observó influencia de la edad de la plantación sobre el grado de colonización. Sin embargo, diversos estudios en cultivos semiperennes o perennes, muestran lo contrario (Husband *et al.*, 2002). Según Chakraborty *et al.* (2016), el grado de colonización de HMA (presencia de arbusculos, vesículas e hifas) en raíces de plantas de caucho, es mayor en plantas jóvenes y va disminuyendo conforme la edad del cultivo aumenta. Cabe resaltar que los estudios se realizaron en plantas de 5 a 30 años de edad, cuyo rango es muy amplio. Asimismo, Bolaños *et al.* (2000), señala que la presencia y la cantidad de HMA, está relacionada con la edad de la plantación. Este efecto podría estar explicado por las características morfofuncionales de la raíz según el estado de desarrollo en el que se encuentren la planta (Roumet *et al.* 2006).

- **Riqueza específica**

La riqueza de las OTU's de HMA presentes en plantas menores a un año de edad, mostraron una tendencia a presentar un mayor valor respecto a las mayores de tres años de edad. Si bien es cierto puede estar relacionado a la edad de la plantación, éste comportamiento puede además estar influenciado por otras variables como capacidad de intercambio catiónico, el contenido de calcio disponible en el suelo, porcentaje de materia orgánica, suma de cationes, contenido de arena y en menor grado con la cantidad

total de fósforo presente en el suelo. Asimismo, en la figura 10, se representa la tendencia de los datos de forma complementaria.

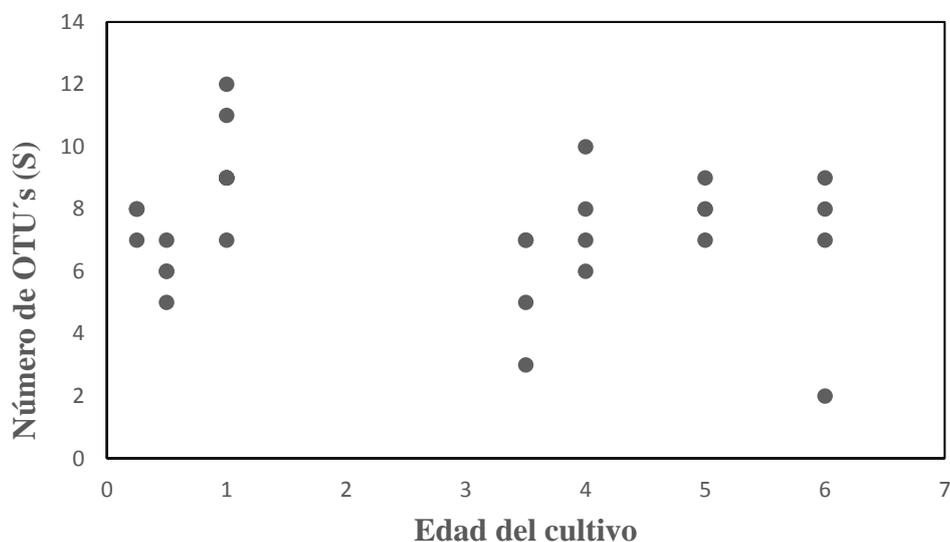


Figura 10. Gráfico de puntos indicando la tendencia del número de OTU's (riqueza específica) de HMA en función a la edad de plantaciones de sacha inchi en cuatro localidades de la región San Martín

En el presente estudio, las diferencias entre la riqueza de HMA según edad no son muy notorias. Este hecho puede atribuirse a que la diferencia etárea no es muy marcada. Estudios realizados por Chakraborty *et al.* (2016) evidencian que la diversidad de HMA disminuye ligeramente en función de la edad, en plantaciones de caucho de 5, 10 y 30 años. Asimismo, comparó sus resultados con los obtenidos por Debnath *et al.* (2014), quien obtuvo resultados similares, al encontrar una menor diversidad de especies en plantaciones adultas. Por otro lado, Kil *et al.* (2014), realizó un estudio en plantaciones de ginseng, concluyendo que, la diversidad de especies de HMA disminuyó en plantaciones de 5 años de edad. Una hipótesis que planteó para explicar este comportamiento, fue que la comunidad de HMA que coloniza las raíces se vuelven más uniformes cuando la edad del cultivo aumenta, debido a los cambios de preferencias de las HMA en función a la edad del cultivo. Daniell *et al.* (2001) y Eom *et al.* (2000), plantean otra posible explicación. Estos autores mencionan que las especies dominantes de HMA responden de manera diferente a los diversos cambios en el entorno abiótico a lo largo del tiempo. Asimismo, este efecto, puede ser influenciado por la fenología de la planta huésped.

4.2.2. Análisis de correlación múltiple

La tabla 11, muestra el grado de correlación que tienen las variables cuantitativas. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson indican el grado en el que están relacionadas las variables, siendo los valores mayores a 0.5 de medio a alto grado. Las variables respuesta son la riqueza específica y el grado de colonización micorrízica en las raíces de sacha inchi y las variables independientes son las características fisicoquímicas del suelo y la altitud de la parcela.

Tabla 11. Valores del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables fisicoquímicas del suelo, los valores de riqueza de OTU's y grado de colonización micorrízica

	Cationes	Ca	RIQUEZA	CIC	N	Arena	M.O.	P	ALTITUD	Limo	KI	K	CaCO3	Sat.Bases	Na	pH	Mg	COLONIZACION	C.E.	Arcilla
Cationes	1.00	0.94	0.43	0.88	0.52	0.25	0.40	0.31	0.10	-0.73	-0.22	-0.14	-0.16	-0.02	-0.11	0.03	0.22	0.19	0.29	0.36
Ca	0.94	1.00	0.53	0.89	0.52	0.31	0.48	0.35	0.31	-0.66	-0.44	-0.39	-0.27	-0.15	-0.24	-0.12	-0.10	0.02	0.09	0.23
RIQUEZA	0.43	0.53	1.00	0.40	0.27	0.05	0.20	0.08	0.27	-0.19	-0.49	-0.49	-0.03	-0.05	-0.06	0.09	-0.22	0.00	0.04	0.10
CIC	0.88	0.89	0.40	1.00	0.57	0.19	0.61	0.49	0.47	-0.62	-0.23	-0.18	-0.48	-0.49	-0.27	-0.39	-0.02	-0.07	0.04	0.32
N	0.52	0.52	0.27	0.57	1.00	0.33	0.82	0.25	0.42	-0.25	-0.28	-0.22	-0.24	-0.24	-0.07	-0.26	0.07	0.21	0.04	-0.13
Arena	0.25	0.31	0.05	0.19	0.33	1.00	0.30	0.07	0.16	-0.45	-0.34	-0.35	-0.19	0.02	-0.31	-0.02	-0.10	-0.14	-0.14	-0.66
M.O.	0.40	0.48	0.20	0.61	0.82	0.30	1.00	0.34	0.67	-0.15	-0.26	-0.25	-0.53	-0.54	-0.22	-0.56	-0.21	-0.01	-0.30	-0.19
P	0.31	0.35	0.08	0.49	0.25	0.07	0.34	1.00	0.52	-0.04	0.09	0.02	-0.57	-0.43	-0.51	-0.40	-0.22	-0.35	-0.16	-0.04
ALTITUD	0.10	0.31	0.27	0.47	0.42	0.16	0.67	0.52	1.00	0.06	-0.36	-0.41	-0.77	-0.82	-0.49	-0.81	-0.67	-0.63	-0.63	-0.21
Limo	-0.73	-0.66	-0.19	-0.62	-0.25	-0.45	-0.15	-0.04	0.06	1.00	0.20	0.08	0.13	0.00	-0.04	-0.07	-0.30	-0.12	-0.34	-0.37
KI	-0.22	-0.44	-0.49	-0.23	-0.28	-0.34	-0.26	0.09	-0.36	0.20	1.00	0.94	-0.07	0.11	0.14	0.16	0.37	0.11	0.33	0.19
K	-0.14	-0.39	-0.49	-0.18	-0.22	-0.35	-0.25	0.02	-0.41	0.08	0.94	1.00	-0.05	0.15	0.20	0.20	0.54	0.19	0.37	0.30
CaCO3	-0.16	-0.27	-0.03	-0.48	-0.24	-0.19	-0.53	-0.57	-0.77	0.13	-0.07	-0.05	1.00	0.73	0.46	0.73	0.45	0.56	0.45	0.09
Sat.Bases	-0.02	-0.15	-0.05	-0.49	-0.24	0.02	-0.54	-0.43	-0.82	0.00	0.11	0.15	0.73	1.00	0.38	0.91	0.45	0.53	0.47	-0.02
Na	-0.11	-0.24	-0.06	-0.27	-0.07	-0.31	-0.22	-0.51	-0.49	-0.04	0.14	0.20	0.46	0.38	1.00	0.33	0.41	0.41	0.34	0.36
pH	0.03	-0.12	0.09	-0.39	-0.26	-0.02	-0.56	-0.40	-0.81	-0.07	0.16	0.20	0.73	0.91	0.33	1.00	0.48	0.57	0.57	0.09
Mg	0.22	-0.10	-0.22	-0.02	0.07	-0.10	-0.21	-0.22	-0.67	-0.30	0.37	0.54	0.45	0.45	0.41	0.48	1.00	0.56	0.58	0.36
COLONIZACION	0.19	0.02	0.00	-0.07	0.21	-0.14	-0.01	-0.35	-0.63	-0.12	0.11	0.19	0.56	0.53	0.41	0.57	0.56	1.00	0.64	0.25
C.E.	0.29	0.09	0.04	0.04	0.04	-0.14	-0.30	-0.16	-0.63	-0.34	0.33	0.37	0.45	0.47	0.34	0.57	0.58	0.64	1.00	0.43
Arcilla	0.36	0.23	0.10	0.32	-0.13	-0.66	-0.19	-0.04	-0.21	-0.37	0.19	0.30	0.09	-0.02	0.36	0.09	0.36	0.25	0.43	1.00

- **Grado de colonización (%)**

El grado de colonización micorrízica, presenta una correlación moderada positiva con las variables conductividad eléctrica, pH, CaCO₃, cantidad de magnesio y porcentaje de saturación de bases ($r = 0.64$, $r = 0.57$, $r = 0.56$, $r = 0.56$ y $r = 0.53$). Por otro lado, muestra una correlación moderada negativa con la altitud de la parcela, lo cual significa que, a mayor altitud de la parcela, las raíces de sacha inchi, mostrarán una menor presencia de estructuras micorrízicas ($r = -0.63$). Es importante resaltar que, la altitud de la parcela

está correlacionada fuertemente con el pH del suelo de forma negativa ($r = -0.81$), lo cual puede explicar la correlación inversa entre esta variable y la colonización.

La conductividad eléctrica, mide la salinidad del suelo y en el presente estudio, sus valores oscilan entre 0.3 y 0.5 a nivel de localidad. Si bien es cierto, todos los suelos en el presente estudio son no salinos, el suelo de El Dorado, se caracterizó por presentar el menor valor promedio (C.E = 0.3). Asimismo, en esta localidad, el grado de colonización fue menor comparado a las demás localidades. Según estudios realizados por Scharnagl *et al.* (2018), determinaron el efecto de la salinidad sobre el porcentaje de colonización de HMA en plantas de *Galactia smallii*, llegando a la conclusión que las plantas tratadas con sales, mostraron un mayor porcentaje de colonización con HMA que las plantas no tratadas (Scharnagl *et al.*, 2017). Este comportamiento, se explica debido a que los hongos del suelo en general tienen una mayor tolerancia a la salinidad en comparación con las plantas, de manera que cuando se impone un factor estresante como la sal, la planta invierte menos en la biomasa radicular y aumenta la asociación con HMA. A medida que las plantas invierten más en este tipo de asociaciones y menos en biomasa de raíces, los HMA reemplazan el papel de las raíces en el suelo, absorbiendo agua y nutrientes esenciales para las plantas. Por lo cual esta variable podría estar influenciando en el grado de colonización.

Respecto al pH del suelo, se observó que la parcela de El Dorado, mostró el menor valor ($\text{pH} = 7$), comparado con las demás parcelas ($\text{pH} > 7.7$). Este parámetro, mostró una correlación directa con el grado de colonización. El pH no solo afecta el desarrollo de las plantas, sino también la abundancia y actividad de organismos del suelo (de microorganismos a artrópodos) responsables de las transformaciones de nutrientes (De Boer & Kowalchuk 2001; Nicol *et al.*, 2008). Algunos autores afirman que los cambios en el pH del suelo, tienen un efecto notable sobre el grado de colonización de las especies de HMA en las raíces de los cultivos, mostrando su mejor actividad en suelos neutros. Por otro lado, valores muy altos o bajos (4.5 y 8), reducen drásticamente la tasa de colonización y formación de arbusculos y vesículas de los HMA. Abbott & Robson (1985) reportaron que el desarrollo de algunas especies de *Glomus*, se ven afectadas cuando el pH es menor a 5.3, debido a la incapacidad de las hifas de crecer en este medio. Asimismo, influencia sobre la actividad enzimática de las HMA en el micelio extraradicular y altera la composición comunitaria de los HMA, lo cual conlleva a una

disminución en la actividad micorrízica y por ende una reducción de la absorción de nutrientes y la eficiencia del uso de agua en las plantas (Coughlan *et al.*, 2000; Van Aarle *et al.*, 2002; Soti *et al.*, 2015)

Otra variable que presenta una correlación directa con la colonización micorrízica es el porcentaje de carbonatos de calcio. Esta variable, mostró un valor muy bajo en los suelos de la localidad de El Dorado y su máximo valor en la localidad de Bellavista, con valores de 1.3 y 27% respectivamente. Estos valores obtenidos, mostraron que la cantidad de CaCO₃ favorece la colonización micorrízica. Es importante tener en cuenta que este compuesto, afecta directamente al pH del suelo, lo cual podría explicar esta correlación. Por otra parte, algunos autores mencionan que la colonización micorrízica permanece en presencia de altas concentraciones de CaCO₃ en el medio. Sin embargo, existe cierta influencia de niveles altos sobre el crecimiento de hifas extraradicales y la germinación de esporas, mas no las inhibe (McMillen *et al.*, 1998), además de reducir el número de arbusculos (Hirrel, 1981; Pfeiffer & Bloss, 1988; Labidi *et al.*, 2011).

De igual forma el grado de colonización varió directamente proporcional al contenido de magnesio. Su valor resultó ser menor en la localidad de El Dorado y mayor en la localidad de Bellavista. Según Khanpour *et al.* (2015), existe una correlación entre el aumento de la concentración de iones de mg en el suelo y el aumento de la colonización micorrízica, cuando su concentración es de baja a media; mientras que cuando es alta, este efecto se invierte, debido a que el magnesio induce la senescencia prematura de la raíz e interrumpe el desarrollo de las estructuras micorrízicas (Azcón *et al.*, 2003). Asimismo, en un experimento realizado por Gryndler *et al.* (1992), concluye que los iones de magnesio tienen un efecto positivo pronunciado en el desarrollo de estructuras de *Glomus* sp. dentro de raíces del maíz.

Respecto al porcentaje de saturación de bases, de igual forma, está correlacionado de forma directa con el pH del suelo e indica que los coloides del suelo, están ocupados por los cationes básicos. No se han reportado estudios que prueben su efecto en el grado de colonización. Sin embargo, se puede mencionar el estudio realizado por St Clair & Lynch (2005), que consistió en observar los efectos de las enmiendas con cationes básicos sobre la micorrización. Los resultados de este estudio, indicaron que estas enmiendas estimulan la colonización de raíces, debido a que los cationes base mejoran las condiciones ácidas del suelo y, por lo tanto, conducen a la estimulación de las asociaciones micorrízicas.

Por otro lado, la única variable que mostró una correlación inversa con el grado de colonización fue la altitud de la parcela. Esta variable, presenta una alta correlación inversa con el pH del suelo, lo cual explica la relación negativa con la formación de estructura micorrízicas, ya que, en el presente estudio, estas estructuras se ven favorecidas cuando el pH es mayor. Cabe destacar que el mayor valor de pH obtenido fue el de la parcela de Bellavista y Picota, y el menor el de las parcelas de El Dorado.

Todos estos factores, explican el comportamiento de la colonización micorrízica, el cual fue menor en la localidad de El Dorado

- **Riqueza específica**

La riqueza, presenta una correlación moderada positiva con la concentración de calcio en el suelo ($r = 0.53$). Asimismo, presenta correlación positiva moderada con la suma total de cationes ($r = 0.43$), capacidad e intercambio catiónico ($r = 0.4$). Por otro lado, presenta una correlación inversa moderada con la concentración de potasio cambiante y disponible en el suelo ($r = -0.49$). Cabe resaltar que no existe correlación entre la riqueza de OTU's presentes en las raíces y el grado de colonización micorrízica ($r = 0$).

La riqueza o número de OTU's, registrada en cada parcela, resultó ser variable a nivel de localidad. Esta variabilidad, se explica en su mayoría por las variables del suelo, ya que estos parámetros influyen sobre la distribución de las HMA (Coutinho *et al.*, 2015). Las principales variables correlacionadas directamente con este parámetro en el presente estudio, fueron el contenido de calcio disponible, la suma total de cationes y la capacidad de intercambio catiónico del suelo. Cabe resaltar que estas variables, mostraron un grado de correlación fuerte entre ellas y que la suma total de cationes, está compuesta en su mayoría por el Ca. El efecto de estas tres variables sobre la diversidad de los HMA, no ha sido muy estudiado, ya que, en la mayoría de casos, explican el grado de colonización, pero no la riqueza de especies. Sin embargo, en este estudio, se observa una correlación positiva entre el contenido del calcio del suelo y la riqueza específica encontrada en la raíz. Lo cual permite concluir que los niveles de calcio han posibilitado de alguna forma la colonización de una mayor cantidad de especies de HMA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un alto contenido de calcio en el suelo, puede inhibir la actividad de la poligalacturonasa, enzima involucrada en la colonización de las raíces. Asimismo, puede

incrementar rigidez de las células radiculares, lo cual dificultaría la colonización radicular (Hepper & O'Shea, 1984).

Según Hepper & O'Shea, (1984), el estado nutricional de la planta hospedante, puede influenciar sobre la porción, densidad y anatomía de la infección en la raíz. En suelos ácidos, los cationes base mejoran las condiciones de disponibilidad de nutrientes, lo cual permite mejorar los desequilibrios de nutrientes en las hojas, de manera que la planta realizará una mayor producción de fotosintatos y estimulará las asociaciones micorrízicas (St. Clair y Lynch, 2005).

Por otro lado, se observó que la cantidad cambiante y disponible de potasio, se correlacionaron de forma negativa con la riqueza. Según Beauchamp *et al.* (2006), el potasio intercambiable tiene influencia sobre la composición de la comunidad de HMA. Asimismo, Coutinho *et al.* (2015), señalaron que en general, la disponibilidad de los nutrientes potasio y fósforo, propician una menor colonización de HMA en raíces de plantas y una menor densidad de esporas en el suelo; cuando se encuentran en altas concentraciones. Sin embargo, las concentraciones adecuadas del ion potasio en el suelo, favorecen la infección de estos hongos (Khanpour, 2015).

- **Características fisicoquímicas del suelo**

Para las variables de suelo, se consideraron los valores de $r \geq 0.5$. De esta manera, se puede observar que las variables que poseen correlación positiva o directa son.

- La suma de cationes, con la concentración de calcio, capacidad de intercambio catiónico, porcentaje de nitrógeno.
- La capacidad de intercambio catiónico con la concentración de calcio, porcentaje de nitrógeno, cantidad de materia orgánica.
- La cantidad de materia orgánica con el porcentaje de nitrógeno y la altitud de la parcela.
- El contenido de fósforo, con la altitud de la parcela.
- La concentración de potasio disponible con el contenido de potasio cambiante y la concentración de magnesio.
- El pH, con el contenido de carbonatos de calcio, el porcentaje de saturación de bases y la conductividad eléctrica.

- El contenido de carbonatos de calcio con el porcentaje de saturación de bases.
- La concentración de magnesio con el contenido de potasio cambiante y con la conductividad eléctrica.

Por otro lado, se puede observar que las variables que poseen correlación negativa o inversa son:

- La cantidad de limo, con la suma de cationes, concentración de calcio y capacidad de intercambio catiónico.
- La cantidad de arena con la cantidad de arcilla.
- La cantidad de materia orgánica con el contenido de carbonatos de calcio, porcentaje de saturación de bases y pH.
- El contenido de fósforo con la cantidad de carbonatos de calcio y sodio.
- El contenido de carbonatos de calcio y el porcentaje de saturación de bases, el pH, la concentración de magnesio y la conductividad eléctrica, con la altitud de la parcela.

4.2.3. Análisis de conglomerados o clusters

El análisis de conglomerados, permite observar un agrupamiento en base a la similitud de la composición de comunidades de HMA entre plantas (Jaccard, 1908) (Figura 12). En esta figura, se observan siete grupos conformados por plantas con OTU's comunes entre sí, bajo una altura de 0.4. Estos grupos comparten 5 OTU's como mínimo y poseen una composición parecida. Por otro lado, los clusters que se observan más separados, son los que se diferencian en mayor grado. Las plantas que se agrupan a la altura de cero ($h = 0$), son plantas que tienen exactamente la misma composición, mientras que las que se agrupan una altura de uno ($h = 1$), no se agruparon debido a diferencias en la composición de OTU's. La composición de cada grupo, se describe en la tabla 12.

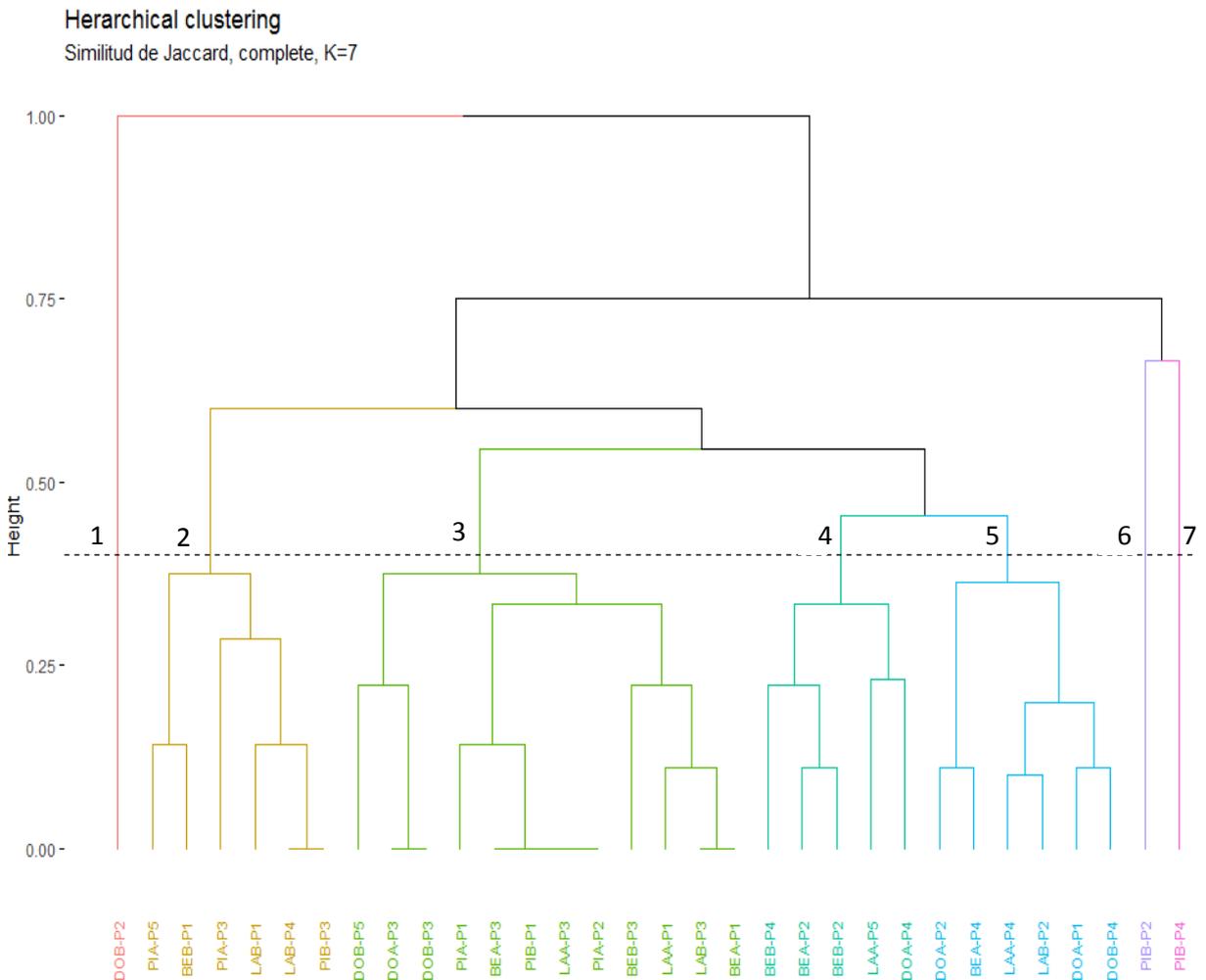


Figura 11. Agrupamiento de plantas en función de la composición de la comunidad de HMA. No se observa formación de grupos en función a la localidad de muestreo o al rango de edad. Cada rama de diferente color, comparte como mínimo cinco OTU's.

Los resultados muestran que, no se observa diferencia a nivel de composición de comunidades de HMA, entre localidades ni edades. Muchas plantas comparten los mismos OTU's reportados, lo cual podría estar explicado por los diversos factores fisicoquímicos del suelo y su variabilidad entre plantas. Por otro lado, Janos & Sahley (1995) mencionan que existen pequeños mamíferos que podrían estar dispersando las esporas de los hongos. Asimismo, Mangan & Adler (1999) señalan que, luego de haber investigado la micofagia, demostró que las esporas consumidas por estos animales, pertenecen a especies de *Glomus*, lo cual además explicaría el dominio de estas especies en el presente estudio.

Tabla 12. OTU's de HMA comunes entre plantas de sachu inchi de dos edades diferentes en cuatro localidades de la región San Martín sin mostrar especificidad por localidad o rango de edad

Grupo	Provincia	Localidad	Rango de Edad	Planta	OTU's Compartidos
1	El Dorado	Cashnahuasi	> 3 años	DOB-P2	
	Lamas	Paucarpata	> 3 años	LAB-P1	
	Lamas	Paucarpata	> 3 años	LAB-P4	
2	Picota	San Antonio	< 1 Año	PIA-P5	Glo4, Glo5 (<i>Glomus</i>), <i>Oehlia diaphana</i> , Glo11 (<i>Funneliformis</i>) y Glo12
	Picota	San Antonio	< 1 Año	PIA-P3	
	Picota	San Antonio	> 3 años	PIB-P3	
	Bellavista	Nuevo Progreso	> 3 años	BEB-P1	
	Lamas	Paucarpata	< 1 Año	LAA-P1	
	Lamas	Paucarpata	< 1 Año	LAA-P3	
	Lamas	Paucarpata	> 3 años	LAB-P3	
3	El Dorado	Cashnahuasi	> 3 años	DOB-P5	
	El Dorado	Cashnahuasi	< 1 Año	DOA-P3	Glo4 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo9, Glo11 (<i>Funneliformis</i>) y Glo12
	El Dorado	Cashnahuasi	> 3 años	DOB-P3	
	Picota	San Antonio	< 1 Año	PI-A-P1	
	Picota	San Antonio	< 1 Año	PIA-P2	
	Picota	San Antonio	> 3 años	PIB-P1	
	Bellavista	Nuevo Progreso	< 1 Año	BEA-P1	
	Bellavista	Nuevo Progreso	< 1 Año	BEA-P3	
	Bellavista	Nuevo Progreso	> 3 años	BEB-P4	
	Lamas	Paucarpata	< 1 Año	LAA-P5	
El Dorado	Cashnahuasi	< 1 Año	DOA-P4		
4	Bellavista	Nuevo Progreso	< 1 Año	BEA-P2	Glo4 (<i>Glomus</i>), <i>Oehlia</i> <i>diaphana</i> , Glo7 (<i>Rhizophagus</i>) Glo9, Glo10 (<i>Glomus</i>) Glo11 (<i>Funneliformis</i>) y Glo12
	Bellavista	Nuevo Progreso	> 3 años	BEB-P3	
	Bellavista	Nuevo Progreso	> 3 años	BEB-P5	
	Lamas	Paucarpata	< 1 Año	LAA-P4	
	Lamas	Paucarpata	> 3 años	LAB-P2	
5	El Dorado	Cashnahuasi	< 1 Año	DOA-P1	Glo4 y Glo5 (<i>Glomus</i>), Glo7 (<i>Rhizophagus</i>), Glo9, Glo11 (<i>Funneliformis</i>), Glo12 y <i>Acaulospora tuberculata</i>
	El Dorado	Cashnahuasi	< 1 Año	DOA-P2	
	El Dorado	Cashnahuasi	> 3 años	DOB-P4	
	Bellavista	Nuevo Progreso	< 1 Año	BEA-P4	
6	Picota	San Antonio	> 3 años	PIB-P2	
7	Picota	San Antonio	> 3 años	PIB-P4	

Los OTU's más abundantes fueron Glo5 (*Glomus*), Glo11 (*Funneliformis*) y Glo12 (Glomeraceae) (Figura 13). Estos tres OTU's estuvieron presentes en 31 plantas (97%), lo cual indica que están muy distribuidas a nivel de la región y poseen un amplio rango de condiciones para su adaptación y colonización. Estos tres, pertenecen a la familia glomeraceae y al orden glomerales. Este orden, domina las comunidades de HMA en

diversos entornos ecológicos. Asimismo, las especies del género *Glomus*, han sido ampliamente reportadas en cultivos agrícolas, como en hábitats no alterados, debido a su alta capacidad de esporulación y colonización a partir de fragmentos de hifas, por lo que se le considera más competitiva (Klironomos y Hart, 2002; Oehl *et al.*, 2003; Alguacil *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2014; Casazza *et al.*, 2017).

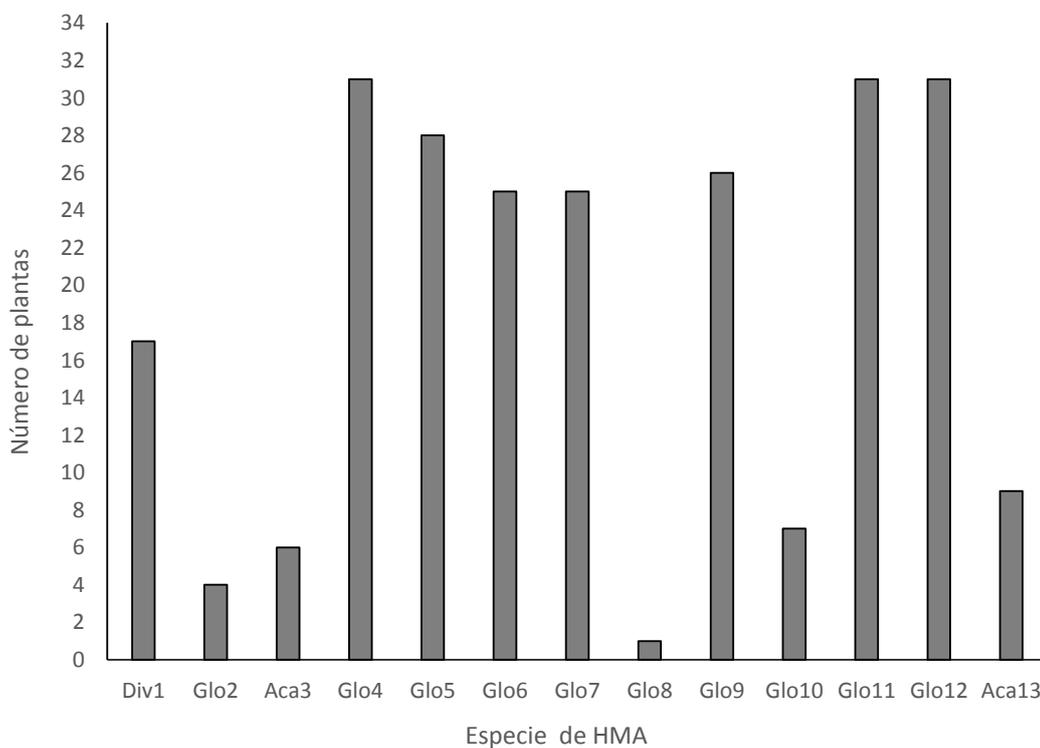


Figura 12. Presencia de OTU's en raíces de plantas de sachá inchi

El OTU Div1 (*Diversispora*) no estuvo presente en las localidades de El dorado rango B y Picota rango A. Sin embargo, se observó su presencia en más del 50% de plantas, lo cual indica, que no es un OTU dominante, pero se encuentra distribuida en casi todas las localidades. Los miembros del género *Diversispora* parecen existir en todo el mundo, con registros basados en secuencias de ADN en Europa, América del Norte, América Central, África, Asia, Hawái y Oriente Medio (Schüßler *et al.*, 2011). Asimismo, posee un amplio rango de huéspedes y hábitats, pudiendo encontrarse en ecosistemas tropicales naturales y alterados.

Los OTU's pertenecientes al género *Acaulospora*, mostraron una menor presencia en el total de las plantas. Asimismo, fueron reportadas en las localidades de El Dorado, Bellavista y Lamas, pero no en la localidad de Picota. Esta última localidad, fue la que se ubicó a una

menor altitud y presentó el mayor valor promedio de pH. Por otro lado, el 67% del OTU Aca3, se encontró en la localidad de El Dorado. De la misma forma, el 67% de las especies *Acaulospora tuberculata*, fueron encontradas en la misma localidad. Esto indica que las especies reportadas para el género *Acaulospora*, en su gran mayoría se encontraron en la localidad de El Dorado. Las dos parcelas pertenecientes a esta localidad, presentaron el menor valor promedio de pH, asimismo, se ubicaron a una mayor altitud. Según Clark (1997), el género *Acaulospora*, se encuentra ampliamente distribuido en suelo ácidos, ya que sus esporas son más tolerantes a dichas condiciones ($\text{pH} < 5$). Asimismo, este género, está ampliamente distribuido en regiones tropicales (Cuenca & Meneses, 1996; Siqueira *et al.*, 1989). Incluso, es posible no detectar algunas especies, en suelos calcáreos $\text{pH} > 7$, pero si en suelos con $\text{pH} < 7$ (Oehl *et al.*, 2011a)

Finalmente, el OTU Glo8 (*Rhizophagus*), fue reportado solo en una planta perteneciente a la localidad de Paucarpata-Lamas del rango A, mientras que Glo7 (*Rhizophagus*), estuvo presente en casi el 81% de las plantas. Esta única planta, se diferenció del resto en el contenido de calcio, y la suma total de cationes, lo cual podría estar influenciando la presencia de esta especie.

V. CONCLUSIONES

- 1) En el presente trabajo, se lograron identificar 13 unidades taxonómicas operativas (OTU's) de hongos micorrízicos arbusculares. Tres de ellas a nivel de especie: *Glomus trimurales*, *Oehlia diaphana* y *Acaulospora tuberculata*; siete, a nivel de género: 1, 3, 2 y 1 de *Diversispora*, *Glomus*, *Rhizophagus* y *Funneliformis*; y tres a nivel de familia: 1 y 2 de Acaulosporaceae y Glomeraceae respectivamente. Los OTU's que se encontraron presentes en el 97% de las plantas fueron pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Funneliformis* de la familia Glomeraceae,
- 2) La edad del cultivo de sachá inchi, no mostró influencia significativa sobre la composición de la comunidad de HMA. Asimismo, no influyó de forma significativa sobre el grado de colonización de los HMA. Sin embargo, sí mostró cierta influencia sobre la riqueza de HMA, la cual mostró una correlación positiva con el contenido de calcio disponible. Por otro lado, presentó una correlación negativa con la concentración de potasio cambiante y disponible en el suelo.
- 3) La localidad, influenciada principalmente por las variables fisicoquímicas del suelo y la altitud de la parcela, no mostró influencia significativa sobre la composición de comunidad de HMA. Sin embargo, sí influyó sobre el grado de colonización micorrízica, la cual presentó una correlación positiva con las variables: conductividad eléctrica, pH, contenido de carbonato de calcio (CaCO₃) y magnesio y porcentaje de saturación de bases.

Finalmente, influyó sobre la riqueza de HMA, la cual presentó una correlación positiva con la concentración de calcio en el suelo, suma total de cationes, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de materia orgánica. Este hecho evidenciaría que en el presente estudio, la riqueza de los HMA fue mayor en los suelos más fértiles.

VI. RECOMENDACIONES

- Los géneros *Glomus* y *Funneliformis* fueron los mejores adaptados en las condiciones de los suelos estudiados, en especial las unidades taxonómicas Glo4, Glo11 y Glo12 (Glomeraceae). Por ello, sería interesante realizar la identificación de la espora (propágulo), para que posteriormente se estudien los efectos benéficos que proporcionan a las plantas de sachá inchi y otros cultivos. Una vez determinados estos efectos, se podrían producir masivamente y utilizarlos como inoculantes.
- Complementar este estudio con la diversidad morfológica de esporas en el suelo circundante para identificar los OTU's hasta el grado de especie.
- Evaluar el efecto de los ecotipos de sachá inchi sobre la diversidad de HMA, ya que este factor, no se consideró en el presente estudio.
- Realizar un estudio similar en plantaciones silvestres de sachá inchi, cuya diferencia de edad sea más marcada. Asimismo, abarcar otros departamentos productores del cultivo, incluyendo las otras posibles especies de sachá inchi que se puedan encontrar uno de ellos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, M.E. & Abdel-Fattah, G.M. (2000). Influence of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the development of peanut pod rot disease in Egypt, *Mycorrhiza*, 10, 29–35. doi: 10.1007/s005720050284
- Abbott, L.K. & Robson, A.D. (1985). The effect of soil pH on the formation of VA mycorrhizas by two species of *Glomus*. *Australian Journal of Soil Research*, 23(2), 253- 261. doi:10.1071/sr9850253
- Agrios, G. (2002). Fitopatología (2° ed.). México: Limusa.
- Albújar, E. (2018). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2017. Recuperado de <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/anuario-estadistico-produccion-agricola-2017>
- Alguacil, M.M.; Lumini, E.; Roldán A.; Salinas-Garcia, J.R.; Bonfante, P. & Bianciotto V. (2008) The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecological applications*, 18, 527-536. doi: 10.1890/07-0521.1.
- Al-Karaki, G.; McMichael, B. & Zak, J. (2004). Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, 14(4), 263-269. doi: 10.1007/s00572-003-0265-2
- Andrade-Torres, A. (2010). Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Revista Ciencia*, p. 84-90.
- Andrade, S.; Mazzafera, P.; Schiavinato, M. & Silveira, A. (2009). Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *The Journal of Agricultural Science*, 147 (2), 105-115. doi:10.1017/S0021859608008344
- Andrades, M. & Martínez, M. (2014). *Fertilidad del suelo y parámetros que la definen*. (3° ed.). Logroño, España: Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones.
- Arévalo, G. (1999). El Cultivo de “sacha inchi” (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología (PRONARGEB). Estación Experimental El Porvenir. Tarapoto.

- Arévalo, C. (2016). *Prospección de la densidad de esporas y colonización de micorrizas en cacao silvestre de Ucayali y Madre de Dios* (Tesis Titulación). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía.
- Arias, V. (2017). Changes in plant functional diversity and decomposition rate under different silvopastoral use intensities in northwest Patagonia, Argentina. *Ecologia Austral*, 27, 29-38.
- Atawodi, S.E.; Atawodi, J.C. & Dzikwi, A.A. (2011). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. *Sahel Medical Journal*, 13(2). doi: 10.4314/smj2.v13i2.64834
- Axtell, B. & Fairman, M. (1992). Minor Oil Crops. Boletín Food and Agriculture Organization (FAO). Recuperado de <http://www.fao.org/3/X5043E/x5043E00.htm>
- Azcón, R. (1987). Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* in vitro: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 417-419. doi: 10.1016/0038-0717(87)90032-0
- Azcón, R. & Barea, J.M. (1992). Nodulation, N₂ fixation and nutrition relationships in mycorrhizal or phosphate-amended alfalfa plants. *Symbiosis*, 12, 33-41.
- Azcón, R.; Ambrosano, E. & Charest, C. (2003). Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Science*, 165(5), 1137–1145. doi:10.1016/s0168-9452(03)00322-4
- Azcón-Aguilar, C.; Díaz-Rodríguez, R.M. & Barea, J.M. (1986). Effect of free-living fungi on the germination of *G. mosseae* on soil extract. En Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S (Eds.). *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris, Francia.
- Azcón-Aguilar, C.; Jaizme-Vega, M.C. & Calvet, C. (2002). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. En Gianinazzi, S.; Schuepp, H.; Barea, J.M. & Haselwandter, K. (Eds.). *Mycorrhizal technology in agriculture*. Basel, Switzerland.
- Baar, J. (2008). From Production to Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. En A. Varma. (Ed.), *Agricultural Systems: Requirements and Needs* (pp. 361-373). Berlin, Heidelberg: Springer
- Barrera, S. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1), 123-132. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>

- Beauchamp, V.B.; Stromberg, J.C. & Stutz, J.C. (2006), Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus–Salix* stands in a semiarid riparian ecosystem. *New Phytologist*, 170: 369-380. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01668.x
- Becard, G. & Piché, Y. (1989). Fungal growth-stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2320-2325. doi: 10.1128/AEM.55.9.2320-2325.1989
- Benedetto, A.; Magurno, F.; Bonfante, P. & Lanfranco, L. (2005). Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 15, 620–627. doi: 10.1007/s00572-005-0006-9
- Berruti, A.; Lumini, E.; Balestrini, R. & Bianciotto, V. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1559. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559
- Bever, J.D.; Richardson, S.C.; Lawrence, B.M.; Holmes, J. & Watson M. (2009). Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 12(1),13-21. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01254.x
- Begum, N.; Qin, C.; Abass, M.; Raza, S.; Khan, M.; Ashraf, M.; Ahmed, N. & Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068.
- Biermann, B. & Lindermann, R.G. (1983). Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol*, 95,97-105. doi: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x
- Bolaños, M.; Rivillas, C. & Suárez, S. (2000). Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera Colombiana. *Cenicafé*, 51(4), 245-264. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc051%2804%29245-262.pdf>
- Brako, L. & Zarucchi, L. (1993). Catalogue of the Flowering Plants and Giosperms of Perú. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 45(1-11), 1-1286.
- Brandán de Weht, C.; Amigo, J. & Weht, S. (2013). Simbiosis bi y tripartitas: los microorganismos del suelo. *Huayllu-Bios*, (7), 29. Recuperado de <http://www.exactas.unca.edu.ar/HUAYLLUBIOS /num-7/3.pdf>
- Brundrett, M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275–304. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x

- Brundrett M.C. (2008). *Mycorrhizal Associations: The Web Resource* (en línea, sitio web). Recuperado de <https://mycorrhizas.info/info.html>
- Brundrett, M.C.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T. & Malajczuk, N. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Canberra, Australia: Australian Center for International Agriculture Research.
- Brundrett, M.C. & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220, 1108-1115. doi: 10.1111/nph.14976
- Brundrett, M.C.; Piché, Y. & Peterson, R.L. (1985). A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*, 63, 184-194. doi: 10.1139/b85-021
- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173, 11–26. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x
- Cardinal-McTeague, W.M.; Wurdack, K.J.; Sigel, E.M. & Gillespie, L.J. (2019). Seed size evolution and biogeography of *Plukenetia* (Euphorbiaceae), a pantropical genus with traditionally cultivated oilseed species. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 29. doi: 10.1186/s12862-018-1308-9
- Cardoso, M. & Kuyper, T. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 116 (1), 72-84. doi: 10.1016/j.agee.2006.03.011.
- Castro, I. (2009). *Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas asociados a plantas de interés ecológico en ambientes mediterráneos* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada, España. Recuperada de <https://hera.ugr.es/tesisugr/18131360.pdf>
- Casazza, G.; Lumini, E.; Ercole, E.; Dovana, F.; Guerrina, M.; Arnulfo, A.;... Mucciarelli, M. (2017). The abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi are linked to the soil chemistry of screes and to slope in the Alpic paleo-endemic *Berardia subacaulis*. *Plos One*, 12(2), e0171866. doi: /10.1371/journal.pone.0171866
- Chakraborty, K.; Sinha, S.; Debnath, A.R.; Das, A.; Saha, A.K. & Das, P. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal colonization in three different age groups of rubber plantations in Tripura, North-East India. *Plant Pathology and Quarantine*, 6(2), 122–131: doi: 10.5943/ppq/6/2/2
- Chirinos, R.; Zuloeta, G.; Pedreschi, R.; Mignolet, E.; Larondelle, Y. & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141, 1732–1739.

- Clark, R. (1997). Adaptación micorrízica arbuscular, germinación de esporas, colonización de raíces y crecimiento de plantas huésped y adquisición de minerales a pH bajo. *Plant and Soil*, 192, 15–22. doi: 10.1023 / A: 1004218915413
- Colla, G.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Tullio, M.; Rivera, C.M. & Rea, E. (2008). Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhiza in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology Fertility of Soils*, 44,501–509. doi: 10.1007/s00374-007-0232-8
- Collins, R.E. & Rocap, G. (2007). REPK: an analytical web server to select restriction endonucleases for terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(2), W58–62. doi: 10.1093/nar/gkm384
- Correa, J. & Bernal, H. (1992). *Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello*. Tomo VII. p. 577-596. Bogotá, Colombia.
- Coughlan, A. P.; Dalpé, Y.; Lapointe, L. & Piché, Y. (2000). Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(10), 1543–1554. doi:10.1139/x00-090
- Coutinho, E. S.; Fernandes, G. W.; Berbara, R. L. L.; Valério, H. M. & Goto, B. T. (2015). Variation of arbuscular mycorrhizal fungal communities along an altitudinal gradient in rupestrian grasslands in Brazil. *Mycorrhiza*, 25(8), 627–638. doi:10.1007/s00572-015-0636-5
- Cuenca, G. & Meneses, E. (1996). Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. *Plant and Soil*, 183, 315-322. doi: 10.1007/BF00011447
- Daniell, T.J.; Husband, R.; Fitter, A.H. & Young, J.P.W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 36(2-3), 203-209. doi: 10.1016/S0168-6496(01)00134-9
- Debnath, A.; Sinha, S.; Saha, A.K. & Das P. (2014). Arbuscular mycorrhiza fungal diversity in the open land adjacent to rubber plantation in Tripura, Northeast India. *Mycorrhiza News*, 26, 4–9. Recuperado de http://bookstore.teri.res.in/e_issue_text_1.php?oj_id=285§or=678
- Davison, J.; Öpik, M.; Daniell, T.J.; Moora, M. & Zobel, M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *Federation of*

- European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 78, 103–115. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01103.x.
- De Boer, W. & Kowalchuk, G. (2001). Nitrification in acid soils: microorganisms and mechanisms. *Soil Biology Biochemical*, 33 (7-8), 853–866. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00247-9
- Diaz, A. (2014). *Monografía sobre los conocimientos botánicos de la familia Euphorbiaceae y la especie Croton lechleri*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. doi: 10.13140/RG.2.1.4714.5123
- Dickie, I. & FitzJohn, R. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: A methods review. *Mycorrhiza*, 17, 259-70. doi: 10.1007/s00572-007-0129-2
- Dostert, N.; Roque, J.; Brokamp, G.; Cano, A.; La Torre, M. & Eigend, M. (2009). *Factsheet: Datos botánicos de sacha inchi. Plukenetia volubilis* L. Lima, Perú.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Drinkwater, R.D. & Hetzel, D.J.S. (Abril de 1991). Application of molecular biology to understanding genotype-environment interactions in livestock production. En an International Symposium on Nuclear Techniques in Animal Production and Health. Food and Agriculture Organization (FAO). IAEA, Vienna, 23,437–452.
- Duran, C.; Appleby, N.; Edwards, D. & Batley, J. (2009). Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualization. *Current Bioinformatics*, 4(1), 16-27. doi: 10.2174/157489309787158198
- Eckardt, N.A. (2005). Insights into plant cellular mechanisms: of phosphate transporters and arbuscular mycorrhizal infection. *Plant Cell*, 17, 3213–3216. doi: 10.1105/tpc.105.039297
- Ehtisham, M.; Wani, F.; Wani, I.; Kaur, P. & Nissar, S. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4, 30-35. doi: 10.5958/2320-5962.2016.00030.9
- Ekanayake, I.J.; Oyetunji, O.J.; Osonubi, O. & Lyasse, O. (2004). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and water stress on leaf chlorophyll production of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 190-196.
- Eom, A.H.; Hartnett, D.C. & Wilson G.W.T. (2000). Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122, 435–444. doi: 10.1007/s004420050050

- Feng, G.; Zhang, F. S.; Li, X. L.; Tian, C. Y.; Tang, C. & Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*, 12(4), 185–190. doi: 10.1007/s00572-002-0170-0.
- Fitzjohn, R. & Dickie, I. (2007). TRAMPR: An R package for analysis and matching of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) profiles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 583-587. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01744.x
- Garrido, M. (1993). *Interpretación de análisis de suelos: Guía práctica para muestrear los suelos e interpretar sus análisis. Hojas divulgadoras*. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1993_05.pdf
- Gerdemann, J. W. & Trappe, J. M. (1974). *The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Bronx*, New York, EE.UU. New York Botanical Garden in collaboration with the Mycological Society of America.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernes AS, Logi C. (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*, 125 (3), 587–593. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03907.x
- Giri, B. & Mukerji, K.J. (2004). Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: Evidence for reduced and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, 14, 307–312. doi: 10.1007/s00572-003-0274-1
- Glassop, D.; Smith, S.E. & Smith, F.W. (2005). Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta*, 222, 688–698. doi: 10.1007/s00425-005-0015-0
- Govindarajulu, M.; Pfeffer, P.E.; Jin, H.; Abubaker, J.; Douds, D.D.; Allen, J.W.;... y Shachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435,819–823. doi: 10.1038/nature03610
- Gryndler, M.; Vejsadová, H. & Vančura, V. (1992). The effect of magnesium ions on the vesicular arbuscular mycorrhizal infection of maize roots. *New Phytologist*, 122, 455-460. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb00073.x
- Guerra, B. E. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, 21(1),191-201. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/264005242_Micorriza_arbuscularRecurso_Microbiologico_en_la_agricultura_sostenible

- Gupta, P.K.; Roy, J.K. & Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA poly-morphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, 80(4), 524-535. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/24104242>
- Gutiérrez, L.; Rosada, L.; & Jiménez, A. (2011). Composición química de las semillas de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y características de su fracción lipídica. *Grasas y Aceites*, 62(1): 76-83.
- Harley, J.L. & Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press.
- Harrison, M.J.; Dewbre, G.R. & Liu, J.Y. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14, 2413–2429. doi: 10.1105/tpc.004861
- Harrison, M.J. & van Buuren, M.L. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 378, 626–629. doi: 10.1038/378626a0
- Haas, M.; Vogt, M. & Dulbecco, R. (1972). Loss of simian virus 40 DNA-RNA hybrids from nitrocellulose membranes: Implications for the study of virus-host DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2160-2164. doi: 10.1073/pnas.69.8.2160
- Hawkins, H.J.; Johansen, A. & George, E. (2000). Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 226, 275–285. doi: 10.1023/A:1026500810385
- He, X.H.; Critchley, C. & Bledsoe, C. (2003). Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plants Sciences*, 22, 531–567. doi: 10.1080/713608315
- Helgason, T.; Merryweather, J.W.; Denison, J.; Wilson, P.; Young, J.P. & Fitter A.H. (2002). Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, 90, 371–384. doi: 10.1046/j.1365-2745.2001.00674.x
- Hepper, C.M. (1981). Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist*, 88, 641-647. doi: 10.1111/j.1469-8137.1981.tb01740.x
- Hepper, C.M. & O'Shea, J. (1984). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in lettuce (*Lactuca sativa*) in relation to calcium supply. *Plant Soil*, 82, 61–67. doi:10.1007/BF02220770

- Hildebrandt, U.; Janetta, K. & Bothe, H. (2002). Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1919-1924. doi: 10.1128/AEM.68.4.1919-1924.2002
- Hirrel, M.C (1981). The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 73:610–617. doi: 10.1080/00275514.1981.12021388
- Husband, R.; Herre, E. & Young, J.P. (2002). Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 42, 131-136. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb01002.x.
- Hutchinson, J. (1969). Tribulism in the family Euphorbiaceae. *American Journal of Botany*, 56, 38-758. doi: 10.2307/2440594
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). (2009). *Estudio de viabilidad económica del cultivo de Plukenetia volubilis Linneo, Sacha inchi, en el Departamento de San Martín*. Recuperado de http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/193/2/Alvarez_documentotecnico_3_2009.pdf
- Instituto Nacional de Estadística e Informática del Perú (INEI). (2012). Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario: Anexo estadístico. Lima Perú. 63 pp.
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44, 223-270.
- Jaizme-Vega, M.C.; Sosa, B. & Hernández, J.M. (1998). Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and the soil pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on the first stages of micropropagated Grande Naine banana. *Acta Horticulturae*, 490, 285–295. doi: 10.17660/ActaHortic.1998.490.28
- Janos, D.P. & Sahley, C. (1995) Dispersión de roedores de hongos micorrícicos vesicular-arbusculares en el Perú amazónico. *Ecología*, 76, 1852-1858.
- Javot, H.; Penmesta, R. V.; Terzaghi, N.; Cook, D. R. & Harrison M. J. (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1720-1725. doi: 10.1073/pnas.0608136104
- Jin, H.; Pfeffer, P.E.; Douds, D.D.; Piotrowski, E.; Lammers, P.J. & Shachar-Hill, Y. (2005). The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis, *New Phytol*, 168, 687–696. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01536.x

- Junier, P.; Junier, T. & Witzel, K.P. (2008). TRiFLe, a program for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis with user-defined sequence sets. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6452–6456. doi: 10.1128/AEM.01394-08
- Karandashov, V. & Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science*, 10 (1), 22-29. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.003
- Kassambara, A. (2017). Practical Guide to Principal Component Methods in R. Recuperado de <https://www.datanovia.com/en/wp-content/uploads/dn-tutorials/book-preview/principal-component-methods-in-r-preview.pdf>
- Kassambara, A & Mundt, F. (2019). Package ‘factoextra’. <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/factoextra.pdf>
- Khanpour-Ardestani, N.; Zare-Maivan, H. & Faeze G. (2015). Effect of different concentrations of potassium and magnesium on mycorrhizal colonization of maize in pot culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(73), 16548-16550. doi: 10.5897/AJB11.556
- Kil, Y. J.; Eo, J. K.; Lee, E. H. & Eom, A. H. (2014). Root age-dependent changes in arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing roots of *Panax Ginseng*. *Mycobiology*, 42(4), 416–421. doi:10.5941/MYCO.2014.42.4.416
- Klironomos, J.N. & Hart, M.M. (2002). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12: 181–184. doi: 10.1007/s00572-002-0169-6
- Koske, RE. (1982). Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*, 79: 305–310. doi: 10.1016/S0007-1536(82)80118-6
- Krüger, M.; Stockinger, H.; Krüger, C. & Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183, 212– 223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Labidi, S.; Ben Jeddi, F.; Tisserant, B.; Debiane, D.; Rezgui, S.; Grandmougin-Ferjani, A. & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2011). Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza*, 22(5), 337–345. doi:10.1007/s00572-011-0405-z
- Leake, J.; Johnson, D.; Donnely, D.; Muckle, G.; Boddy, L. & Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant

- communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal Botany*, 82, 1016–1045. doi: 10.1139/b04-060
- Lee, J.; Lee, S. & Young, J.P. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 65(2), 339–349. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x
- Lekberg, Y.; Gibbons, S. & Rosendahl, S. (2014). Will different OTU delineation methods change interpretation of arbuscular mycorrhizal fungal community patterns?. *The New phytologist*, 202(4). doi: 10.1111/nph.12758.
- Lekberg, Y.; Schnoor, T.; Kjølner, R.; Gibbons, S.M.; Hansen, L.H.;... Rosendahl, S. (2012). 454-Sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal Ecology*, 100: 1–10. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01894.x
- León, D. (2006). *Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (Manihot esculenta) en dos regiones de la Amazonía colombiana* (Tesis Lic.) Universidad Pontificia Javeriana, Bogotá. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis296.pdf>
- Liu, W.T.; Marsh, T.; Cheng, H. & Forney, L. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 4516–4522. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/13869286_Characterization_of_Microbial_Diversity_by_Determining_Terminal_Restriction_Fragment_Length_Polymorphisms_of_Genes_Encoding_16S_rRNA
- Llorens, V.; Martín, M. P. & Hidalgo, E. (1997). PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. *Revista Catalana de Micología*, 20:187-198. Recuperado de http://www.micocat.org/UNCINULA09/rcmPdf/RCM20_1997/187-197_PCR_una_nueva_herramienta_hongos_ectomicorricicos.pdf
- López-García, A.; Hempel, S.; Miranda, J.; Rillig, M.; Barea, J. & Azcon-Aguilar, C. (2013). The influence of environmental degradation processes on the arbuscular mycorrhizal fungal community associated with yew (*Taxus baccata* L.), an endangered tree species from Mediterranean ecosystems of Southeast Spain. *Plant and Soil*, 370, 355-366. doi: 10.1007/s11104-013-1625-0.

- Lozano-Isla, F.; Gomez-Carrion, J.; Benites-Alfaro, O. & De Mendiburu, F. (2018). *Yupana: Herramienta web interactiva para el análisis de datos en la investigación agropecuario e industrial*. Quipo. Recuperado de www.quipolab.com
- Luginbuehl, L.H. & Oldroyd, G. (2017). Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Current Biology*, 27(17), R952-R963. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.042
- Lynch, J.M. (1990). *The Rhizosphere*. New York, USA: Chichester, West Sussex
- Macbride, J. F. (1938). *Flora of Perú*. Chicago, Illinois, USA. 13,115-116.
- Macbride, J.F. (1951). *Euphorbiaceae. in flora of Perú*. Recuperado de <https://www.biodiversitylibrary.org/item/19768#page/7/mode/1up>.
- Maldonado-Mendoza, I.E.; Dewbre, G.R. & Harrison, M.J. (2001). A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant Microbe Interactions Journal*, 14,1140–1148. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.10.1140
- Manco, E. (2006). *Ficha Técnica Sacha Inchi*. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA).
- Manco, E. (2008). *Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) cultivo promisorio para la amazonia peruana. San Martín, Perú*. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).
- Mangan, S.A. & Adler, G.H. (1999). Consumo de hongos micorrízicos arbusculares por ratas espinosas (*Proechimys semispinosus*) en ocho poblaciones aisladas. *Journal of Tropical Ecology*. 15, 779-790.
- Markmann, M. & Tautz, D. (2005). Reverse taxonomy: An approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*. 360. 1917-24. doi: 10.1098/rstb.2005.1723.
- Martínez, M.; Jiménez, J.; Cruz, R.; Juárez, E.; García, R. & Cervantes, A. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, 73(2),155-281. Recuperado de <http://www.ejournal.unam.mx/bot/073-02/BOT73205.pdf>
- Martínez, R.; Tuya, L.; Martínez, M.; Pérez, A. & Cánovas, A. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 8(2) Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2009000200017&lng=es&tlng=es.

- Márquez-Dávila, K.; Cayotopa, T.J.; Arévalo, G.E.; Vivanco, N.U. & Arévalo, Q.J. (2007). Diagnóstico y niveles de inóculo del nematodo que afecta a la raíz de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en el Perú. *Fitopatología*, 42(2), 52. Recuperado de http://www.geocities.ws/fitopatologiaalf/pdf/vol42/fitopatologiaN42-02_parte_uno.pdf
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (2° ed.). London, UK: Academic Press.
- Mas, E.; Poza, J.; Ciriza J.; Zaragoza, P.; Osta R. & Rodellar, C. (2011). *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Laboratorio de Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España). Recuperado de <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
- Mc Millen, B.G.; Juniper, S. & Abbott, L.K. (1998). Inhibition of hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus in soil containing sodium chloride limits the spread of infection from spores. *Soil Biology Biochemical*, 30,1639–1646. doi: 10.1016/S0038-0717(97)00204-6
- Metzker, M.L. & Caskey, C.T. (2009). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. doi: 10.1002/9780470015902.a0000998.pub2
- Medina, N.; Morejón, R.; Cuevas, F. & Díaz, G. (2000). Efecto de la biofertilización con hongos micorrizógenos (MA) en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Avances de La Habana*, 2(4), 1562-3297.
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2009). *Plan estratégico sectorial regional agrario 2009 – 2015. Tarapoto*. Recuperado de http://www.regionsanmartin.gob.pe:81/pagina/administracion/documentos_transparencia/doc_transparencia13.pdf
- Ministerio del Ambiente (MINAM); Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA). (2009). *Mapa de deforestación de la Amazonía peruana – 2000: Causas de la deforestación*. Capítulo 4. Perú. Q & P Impresores. 108 p.
- Molano, A.; Ramiro, N. & López, G. (2016). *Proyecto final producción y comercialización del aceite sacha inchi cultivado en Colombia con fines de exportación a Alemania*. Recuperado de <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/4564/1/MolanoSterlingAnaBelly2016.pdf>
- Montaño, N.; Camargo, S.; Gracia, S. & Monroy, A. (2008). *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos* (1° Ed.) México. Mundi Prensa S.A. de C.V. 266 p.

- Morton, J. B. (1990). Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): Their role in macro and microevolutionary processes. *Mycotaxon*, 37, 493-515.
- Morton, J. B. (1993). Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematics biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza*, 2(3), 97-109. doi: 10.1007/BF00203855.
- Mosse, B.; Stribley, D. & Letacon, F. (1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Advances in Microbial Ecology*, 5, 137-210. doi: 10.1007/978-1-4615-8306-6_4
- Muchovej, R.M. (2004). *Importance of mycorrhizae for agricultural crops*. Recuperado de <https://www.parc01.com/text/mycorrhiza/IMPORTANCE%20OF%20MYCORRHIZAE%20FOR%20AGRICULTURAL%20CROPS.PDF>
- Murtagh, F. & Legendre, P. (2011). *Ward's Hierarchical Clustering Method: Clustering Criterion and Agglomerative Algorithm*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/51962445_Ward's_Hierarchical_Clustering_Method_Clustering_Criterion_andAgglomerative_Algorithm
- Nagahashi, G. & Jr-Douds, D.D. (2003). Action spectrum for the induction of hyphal branches of an arbuscular mycorrhizal fungus: exposure sites versus branching sites. *Mycological Research*, 107,1075-1082. doi: 10.1017/S0953756203008232
- Nagy, R.; Karandashov, V.; Chague, V.; Kalinkevich, K.; Tamasloukht, M.; ... & Bucher, M. (2005). The characterization of novel mycorrhizaspecific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal*, 42,236–250. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02364.x
- Nicol, G.W.; Leininger, S.; Schleper, C. & Prosser, J.I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental microbiology*, 10, 2966-2978. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x.
- Oehl, F.; Kolaříková, Z.; Blaszkowski, J.; Sanchez-Castro, I.; Coyne, D.; Tchabi, A.;... Silva, G. (2011a). *Acaulospora sieverdingii*, an ecologically diverse new fungus in the Glomeromycota, described from lowland temperate Europe and tropical West Africa. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84, 47-53. doi: 10.1371/journal.pone.0171866
- Oehl, F.; Sieverding, E.; Mäder, P.; Boller, T. & Wiemken, A. (2003). Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in

- Agroecosystems of Central Europe. *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2816-2824. doi: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003.
- Oehl, F.; Sieverding, E.; Palenzuela, J.; Ineichen, K. & Alves da Silva, G. (2011b). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2(2), 191–199. doi:10.5598/ima fungus.2011.02.02.10
- Öpik, M.; Metsis, M.; Daniell, T.J.; Zobel, M.; & Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184, 424–437. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x.
- Parniske M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 414-421. doi:10.1016/j.pbi.2004.05.011
- Paszkowski, U.; Kroken, S.; Roux, C. & Briggs, S.P. (2002). Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Proceedings National Academy of Sciences*, 99, 13324–13329. doi: 10.1073/pnas.202474599
- Peña-Venegas, C.; Cardona, G.; Mazorra, A.; Arguellez, J. & Arcos, A.L. (2006). *Micorrizas arbusculares de la Amazonía colombiana*. Catálogo Ilustrado. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Recuperado de https://www.sinchi.org.co/files/publicaciones/publicaciones/pdf/catalogo_micorrizas%20para%20web.pdf
- Pfeiffer, C.M. & Bloss, H.E. (1988). Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in a saline soil as influenced by vesicular–arbuscular mycorrhizal and phosphorus fertilization. *New Phytologist*, 108, 315–321. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb04168.x
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. (1970). Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Pozo, M.J.; Slezack-Deschaumes, S.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S. & Azcón-Aguilar, C. (2002). *Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi*. En Gianinazzi, S.; Schuepp, H.; Barea, JM. (eds.). *Mycorrhizal technology in agriculture*. Birkhäuser, Basel. doi: 10.1007/978-3-0348-8117-3_8
- Proyecto Perú Biodiverso (PBD); Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH; Programa Desarrollo Rural Sostenible (PDRS); Secretaría de Estado de Economía Suiza (SECO); Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (MINCETUR);

- & Reforesta Perú SAC. (2009). *Manual de producción de sachá inchi para el biocomercio y la agroforestería sostenible* (1° Ed.). Lima, Perú.
- Pumplin, N. & Harrison, M.J. (2009). Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 151(2), 809-19. doi: 10.1104/pp.109.141879
- Purakayastha, J. & Chhonkar, P. (2005). Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus etunicatum* L.) on mobilization of zinc in wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 33(4), 323- 327. doi: 10.1007/s003740000330
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Recuperado de <http://www.R-project.org/>
- Rabie, G.H. (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal Biotechnology*, 4, 332–345. Recuperado de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/15103/91009>
- Rask, K.A.; Johansen, J.L.; Kjølner, R. & Ekelund, F. (2019). Differences in arbuscular mycorrhizal colonisation influence cadmium uptake in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 223-229. doi: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.022.
- Requena, N. & Breuninger, M. (2004). *The old arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of the molecular era*. En Esser, K.; Luttge, U.; Beyschlag, W. y Murata, J (eds.). *Progress in Botany. Genetics Physiology Systematics Ecology*. Berlin, Heidelberg.
- Rittié, L. & Perbal, B. (2008). Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *Journal of cell communication and signaling*, (1-2), 25-45. doi: 10.1007/s12079-008-0026-2
- Roose, T. & Fowler A.C. (2004). A mathematical model for water and nutrient uptake by plant root systems. *Journal Theoretical Biology*, 228,173–184. doi: 10.1016/j.jtbi.2003.12.013
- Roumet, C.; Urcelay, C. & Díaz, D. (2006). Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* 170, 357–368. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01667.x
- Ruiz-Lozano, J.M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13, 309-317. doi: 10.1007/s00572-003-0237-6

- Sánchez-Castro, I.; Gianinazzi-Pearson, V.; Cleyet-Marel, J.; Baudoin, E. & van Tuinen, D. (2017). Glomeromycota communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Science of The Total Environment*, 598, 121-128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.084.
- Santos-González, J.C. (2007). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grasslands and arable fields. Ecological factors related to community composition and dynamics (Tesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences). Recuperado de https://pub.epsilon.slu.se/1545/1/AVTHESIS_jcs.pdf
- Scharnagl, K.; Sanchez, V. & von Wettberg, E. (2018). The impact of salinity on mycorrhizal colonization of a rare legume, *Galactia smallii*, in South Florida pine rocklands. *BMC Research Notes*, 11, 2. doi:10.1186/s13104-017-3105-8
- Scharnagl, K.; Scharnagl, A. & von, Wettberg, E. (2017). Nature's potato chip: The role of salty fungi in a changing world. *American Journal of Botany*, 104, 641-644. doi:10.3732/ajb.1700034
- Schüßler A.; Krüger M. & Walker, C. (2011). Revelando relaciones naturales entre hongos micorrízicos arbusculares: línea de cultivo BEG47 representa *Diversispora epigaea*, no *Glomus versiforme*. *Plos One*, 6 (8), e23333. doi: 10.1371/journal.pone.0023333
- Sheng, M.; Tang, M.; Chen, H.; Yang, B.; Zhang, F. & Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18, 287–296. doi: 10.1007/s00572-008-0180-7
- Siqueira, J.O.; Colozzi-Filho, A. & Oliveira, E. (1989). Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 24(12), 1499-1506. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/f3be/a2df671af267263bc55713b5229e95c.pdf>
- Smith, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 39, 221-244. doi: 10.1146/annurev.pp.39.060188.001253
- Smith, S. & Read, D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis* (2° Ed.). London. Academic Press. 605 p.
- Smith, S. & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis: The symbionts forming arbuscular mycorrhizas* (3° Ed.). Great Britain. Elsevier.
- Solís, L.; Ramos, Y. & Andrade A. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares? La ciencia y el Hombre. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad*

- Soti, P.; Jayachandran, K.; Koptur, S. & Volin, J. (2015). Effect of soil pH on growth, nutrient uptake, and mycorrhizal colonization in exotic invasive *Lygodium microphyllum*. *Plant Ecology*, 216(7), 989-998. doi: 10.1007/s11258-015-0484-6.
- Srichamnong, W.; Ting, P.; Pitchakarn, P.; Nuchuchua, O. & Temviriyankul, P. (2017). Safety assessment of *Plukenetia volubilis* (Inca peanut) seeds, leaves, and their products. *Food Science & Nutrition*, 6 (10). doi: 1002/fsn3.633.
- Stanley, P.C. & Steyemark J.A. (1949). Flora of Guatemala. Chicago, Ill. Chicago Natural History Museum. *Fieldiana Botany*, 24(6), 153-156.
- St Clair, S.B. & Lynch, J.P. (2005). Base cation stimulation of mycorrhization and photosynthesis of sugar maple on acid soils are coupled by foliar nutrient dynamics. *New Phytologist*, 165, 581-590. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01249.x
- Tahiri-Alaoui, A. & Antoniw, J.F. (1996). Cloning of genes associated with the colonisation of tomato roots by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agronomie, EDP Sciences*, 16(10), 699–707. Recuperado de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885769/document>.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599. doi: 10.1093/molbev/msm092
- Tian, Y.; Lei, Y.; Zheng, Y. & Cai, Z. (2013). Synergistic effect of colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves growth and drought tolerance of *Plukenetia volubilis* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 687-696. doi: 10.1007/s11738-012-1109-5
- Torrecillas, E.; Alguacil, M. M. & Roldán, A. (2012). Host preferences of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing annual herbaceous plant species in semiarid Mediterranean prairies. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6180–6186. doi: 10.1128/AEM.01287-12
- Toussaint, J.P.; St-Arnaud, M. & Charest, C. (2004). Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 251–260. doi: 10.1139/w04-009

- Udriste, A. & Radu, G. (2014). Optimized DNA extraction and southern hybridization in different Solanaceae species. *Chemistry and Materials Science*, 76(2), 193-202. Recuperado de https://www.scientificbulletin.upb.ro/rev_docs_arhiva/full442_177182.pdf
- Valles, C. R. (1990). *El "sacha inchi", planta nativa de importancia proteica y aceitera promisoro para la selva alta*. Lima.
- Van Aarle, I.M.; Olsson, P.A.; & Söderström, B. (2002), Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytologist*, 155 (1), 173-182. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00439.x
- Van Tichelen, K.K.; Colpaert, J.V. & Vangronsveld J. (2001). Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist*, 150(1), 203-213. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00081.x
- Van Tuinen, D.; Jacquot, E.; Zhao, B.; Gollotte, A. & Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 7(7), 879-887. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x
- Varela-Cervero, S.; López-García, A.; Barea, J. & Azcon-Aguilar, C. (2016). Differences in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities promoted by different propagule forms from a Mediterranean shrubland. *Mycorrhiza*, 26(5), 489-496. doi: 10.1007/s00572-016-0687-2
- Vasquez, R. & Rojas, R. (2016). Clave para identificar grupos de familias de Gymnospermae y angiospermae del Perú. Recuperado de http://www.jbmperu.org/curso/Clave_Identificacion_Plantas.pdf
- Vengatesen, T.; Lau, S.C.; Tsoi, M.M.; Zhang, W. & Qian, P. (2010). Monitoring Bacterial Biodiversity in Surface Sediment Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (T-RFLP): Application to Coastal Environment. Recuperado de <https://www.terrapub.co.jp/onlineproceedings/fs/nu/pdf/nu2010151.pdf>
- Vierheilig, H.; Coughlan, A.; Wyss, U. & Pich, Y. (1998). Ink and Vinegar, a simple staining sechnique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 5004-5007. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90956/>

- Walker, C. & Vestberg, M. (1998). Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstenum* and *G. fistulosum*. *Annals of Botany*, 82, 601–624. doi: 10.1006/anbo.1998.0714
- Wang, S.; Zhu, F. & Kakuda, Y. (2018). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chemistry*. 265. 316-328. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.055.
- Wetterauer, D.G. & Killorn RJ. (1996). Fallow and flooded soil syndromes: effects on crop production. *Journal of Production Agriculture*, 9(1), 39–41. doi: 10.2134/jpa1996.0039
- Wei, T.; Simko, V.; Levy, M.; Yihui, X.; Jin, Y.; Ze mla, J. (2017). Package ‘corrplot’. Recuperado de <https://cran.microsoft.com/web/packages/corrplot/corrplot.pdf>
- Winter, P. & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-48. doi: 10.1007/BF00364619
- Wolfe, B.E.; Mummey, D.L.; Rillig, M.C. & Klironomos, J.N. (2007). Small-scale spatial heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and community composition in a wetland plant community. *Mycorrhiza*, 17(3), 175-183. doi: 10.1007/s00572-006-0089-y
- Xiang, D.; Verbruggen, E.; Hu, Y.J.; Veresoglou, S.D.; Rillig MC, Zhou W, ... Chen, B. (2014). Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming-pastoral ecotone of northern China. *New Phytologist*, 204, 968–978. doi: 10.1111/nph.12961
- Yang, W.; Kang, X.; Yang, Q.; Lin, Y. & Fang, M. (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(2), 1–6. doi: 10.1186/2049-1891-4-2
- Zandavalli, RB.; Dillenburg, LR. & Paulo, VD. (2004). Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*, *Applied Soil Ecology*, 25 (3), 245–255. doi: 10.1016/j.apsoil.2003.09.009

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Datos generales de ocho parcelas de sacha inchi en la región San Martín

PROVINCIA	LOCALIDAD	EDAD DEL CULTIVO (años)	PLANTA	AREA (ha)	SISTEMA DE CULTIVO	ALTITUD	UBICACION		OTRAS ESPECIES		ETAPA FENOLÓGICA
							Estándar UTM	DENTRO DE LA PARCELA	CERCO Y ALREDEDORES		
LAMAS	PAUCARPATA	1 año	LA-PA-A-P1	1.5	Tutor muerto	462	331070, 9287544	Papaya. Plátano	Monte	Floración-fructificación	
			LA-PA-A-P3		443	331109.5, 9287507	Papaya. Plátano	Monte			
			LA-PA-A-P4		439	331069, 9287489.2	Papaya. Plátano	Monte			
			LA-PA-A-P5		437	331048.7, 9287509	Papaya. Plátano	Monte			
		4 años	LA-PA-B-P1	2.5	Sin tutor	502	330677.4, 9288367	Maleza	Cacao (al costado)	Floración-fructificación	
			LA-PA-B-P2		503	330666.3, 9288361	Maleza	Cacao (al costado)			
			LA-PA-B-P3		501	330670, 9288376.3	Maleza	Cacao (al costado)			
			LA-PA-B-P4		502	330668.1, 9288368	Maleza	Cacao (al costado)			
			DO-CA-A-P1		Tutor muerto	900	294262.2, 9286933	Café cacao, maleza en su mayoría poaceas	Monte		
			DO-CA-A-P2		1	897	294174.1, 9288349	Café cacao, maleza en su mayoría poaceas	Monte		
DO-CA-A-P3	904	294268.1, 9288345	Café cacao, maleza en su mayoría poaceas	Monte							
DO-CA-A-P4	910	294268.1, 9288342	Café cacao, maleza en su mayoría poaceas	Monte							
DO-CA-B-P2	Tutor muerto	893	294255.1, 9288391	Cacao y maleza		Monte					
6 años	DO-CA-B-P3	0.5	898	294268, 9288393.8	Cacao y maleza	Monte	Floración-fructificación				
	DO-CA-B-P4		898	294268, 9288386.4	Cacao y maleza	Monte					
	DO-CA-B-P5		900	294275.5, 9288358	Cacao y maleza	Monte					
	PI-SA-A-P1		Tutor muerto	250	366448.3, 9226536	Maleza		Monte			
PICOTA	SAN ANTONIO	6 meses	PI-SA-A-P2	1	241	366424.5, 9226499	Maleza	Monte	Floración-fructificación		
			PI-SA-A-P3		234	366505.4, 9226529	Maleza	Monte			
			PI-SA-A-P5		230	366461.3, 9226495	Maleza	Monte			
		3.5 años	PI-SA-B-P1	Tutor muerto	276	366604.4, 9226717	Maleza, predominante pasto brizantha	Limón y papaya	Floración-fructificación		
			PI-SA-B-P2	1	284	366536.2, 9226720	Maleza, predominante pasto brizantha	Limón y papaya			
			PI-SA-B-P3		286	366525.1, 9226748	Maleza, predominante pasto brizantha	Limón y papaya			
			PI-SA-B-P4		283	366563.8, 9226745	Maleza, predominante pasto brizantha	Limón y papaya			
			BE-PO-A-P1		Sin tutor	305	348625, 9207226	Guaba y plátano. Maleza		Cerco vivo	
BE-PO-A-P2	0.5	304	348615, 9207225		Guaba y plátano. Maleza	Cerco vivo	Crecimiento vegetativo				
BE-PO-A-P3		306	348612, 9207226	Guaba y plátano. Maleza	Cerco vivo						
BE-PO-A-P4		309	348604, 9207214	Guaba y plátano. Maleza	Cerco vivo						
BELLAVISTA	NUEVO PROGRESO	5 Años	BE-PO-B-P1	Tutor muerto	286	348636, 9207121	Guaba, limón, coco, maíz y plátano. Maleza	Plátano y maíz	Floración-fructificación		
			BE-PO-B-P2	1	284	348614, 9207109	Guaba, limón, coco, maíz y plátano. Maleza	Plátano y maíz			
			BE-PO-B-P3		285	348614, 9207109	Guaba, limón, coco, maíz y plátano. Maleza	Plátano y maíz			
			BE-PO-B-P4		282	348641, 9207092	Guaba, limón, coco, maíz y plátano. Maleza	Plátano y maíz			

Anexo 2. Protocolo para purificación de ADN con el kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification

1. Captura de la muestra

- a) Pesar un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml sin ADNasa y registrar el peso.
- b) Usando un bisturí limpio, cortar la banda de agarosa que contiene la muestra de interés. Colocar la banda de gel de agarosa en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (suministrado por el usuario) libre de DNasa.
- c) Pesar el tubo de microcentrífuga más el gel agarosa y calcular el peso de la agarosa rebanada (La muestra ahora se puede almacenar a -20° C hasta 1 semana)
- d) Agregar 10 µl de Capture buffer type 3 por cada 10 mg de rebanada de gel, por ejemplo, agregar 300 µl de Capture buffer type 3 por cada 300 mg de gel. (Si la porción de gel pesa menos de 300 mg, agregar 300 µl de Capture buffer type 3. NO agregar menos de 300 µl de buffer por muestra).
- e) Mezclar por inversión e incubar a 60° C por 15-30 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta. Mezclar por inversión cada 3 minutos. (Si la muestra contiene ADN mayor a 5 kb, no vortecear, ya que esto puede causar la ruptura de ADN.
- f) Una vez que la agarosa se ha disuelto completamente, comprobar que la mezcla Capture buffer type 3-muestra, es de color amarillo o naranja pálido. (Si el color de la mezcla es rosa oscuro o rojo, agregar un pequeño volumen (~ 10 µl) de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y mezclar. Asegúrese de que la mezcla se vuelva de color amarillo o naranja pálido antes de cargar en el GFX MicroSpin column)
- g) Para cada purificación que se va a realizar, colocar una columna GFX MicroSpin en un tubo de colección.

2. Unión de la muestra

- a) Centrifugar brevemente la mezcla Capture buffer type 3-muestra para coleccionar el líquido en la parte inferior del tubo.
- b) Transferir 800 µl de la mezcla Capture buffer type 3-muestra en la columna GFX MicroSpin ensamblado en el tubo de colección. (Se puede utilizar la tapa del tubo de colección para tapar la columna GFX Microspin)
- c) Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- d) Centrifugar a 16000 xg por 30 segundos

- e) Desechar el flujo vaciando el tubo de colección. Colocar nuevamente la columna GFX MicroSpin dentro del tubo de recogida.
- f) Repetir los pasos de b a e hasta que toda la muestra esté cargada.

3. Lavar y secar:

- a) Añadir 500 µl de Wash buffer type 1 a la columna GFX MicroSpin.
- b) Centrifugar la columna ensamblada y el tubo de recogida a $16\ 000 \times g$ durante 30 segundos.

(Si la pureza es primordial (muestra de extremo romo), repetir el lavado y secado del paso a y realizar el paso b dos veces. Después de la primera centrifugada, descartar el flujo, colocar el GFX Columna MicroSpin de nuevo al interior del tubo de recogida y centrifugar a $16\ 000 \times g$ por 30 segundos. Este paso de lavado adicional puede reducir el rendimiento en un 4%).
- c) Descartar el tubo de colección y transferir la columna GFX MicroSpin a un nuevo tubo de 1,5 ml libre de DNasa (suministrado por el usuario).

4. Elución:

- a) Añadir 10–50 µl de Elution buffer type 4 o tipo 6 al centro de la membrana en la columna GFX MicroSpin ensamblada al nuevo tubo de colección.
- b) Incubar la Columna GFX MicroSpin y tubo de colección de muestra a T° ambiente durante 1 minuto.
- c) Centrifugar la columna ensamblada con el tubo de colección a $16\ 000 \times g$ durante 1 minuto para recuperar el ADN purificado.
- d) Almacenar el ADN purificado a -20°C .

Anexo 3. Protocolo para ligación del fragmento de ADN en el Vector PCR 2.1-TOPO

Materiales:

- Tubos eppendorf de 1.5 ml y 2 ml.
- Gradilla para tubos.
- Micropipetas de 10, 200 y 1000 µl
- Tips de 10, 200 y 1000 µl.
- Rack para tubos.
- Cooler.
- Vector PCR 2.1-TOPO
- Buffer de reacción de ligasa 5X T4 DNA
- Agua para PCR.

Procedimiento:

Para la ligación: Inicialmente, obtener el ADN puro. Posteriormente realizar la ligación con dicho fragmento.

- Determinar la concentración ideal de ADN en base al tamaño del fragmento de ADN y del vector 2.1-TOPO. Para ello utilizar la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng de producto PCR} = \frac{\text{Ypb de producto PCR} \times 50 \text{ ng de vector}}{\text{Tamaño en pb de PCR vector (3900)}}$$

- Preparar el siguiente mix de ligación para un volumen final de 10 µl:

Agua para PCR: 4 µl

Buffer 5XT4: 2 µl

Vector pCR 2.1: 2 µl

Producto PCR: 1 µl

LIGASA: 1 µl

TOTAL: 10 µl

- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y almacenar a -30°C hasta realizar la transformación bacteriana

Anexo 4. Protocolo para transformación bacteriana en Células *E. coli* TOP 10 químicamente competentes por shock térmico

Materiales:

- Células *E. coli* TOP 10 químicamente competentes.
- Medio S.O.C. y LB (sólido y líquido).
- Material de vidrio estéril (probeta de 100, 250 y 500 ml, alza, placas Petri)
- Cinta parafilm
- Alcohol.
- Mechero.
- Ampicilina o kanamicina.
- Cámara de flujo laminar.
- Incubador shaker.

Procedimiento:

La transformación bacteriana se realizará por shock térmico, para ello se realiza el siguiente procedimiento:

- Calentar el baño María a 42°C.
- Descongelar los viales de bacterias y la reacción de ligación sobre hielo y el medio S.O.C. a temperatura ambiente.
- Pipetear 1 µl de reacción de ligación en el vial que contiene 50 µl de suspensión bacteriana.
- Incubar en hielo durante un minuto.
- Incubar en baño María durante 30 segundos e inmediatamente colocar en hielo durante 30 segundos más.
- Adicionar al vial, 250 µl de medio S.O.C. y resuspender.
- Incubar durante 1 hora a 37°C y 150 rpm.
- Preparar el medio LB sólido conteniendo kanamicina en la relación de 1000:1 (LB:Kanamicina). P. ej. verter 250 µl de kanamicina en 250 ml de medio LB.
- Plaquear 25 ml de medio LB sólido con kanamicina y enfriar durante 15 minutos.
- Pipetear 25 µl de X-gal en el medio sólido y expandir.
- Sembrar 100 µl de bacteria transformada en la placa.
- Incubar durante 16 horas a 37°C.

Anexo 5. Protocolo del QIAprep® Spin Miniprep Kit

Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a 13,000 rpm (~ 17,900 x g) en una centrífuga convencional.

Procedimiento:

- Obtener pellet a partir de 1–5 ml de cultivo bacteriano mediante centrifugación a > 8000 rpm (6800 x g) durante 3 min. a temperatura ambiente (15–25°C).
- Resuspender las células bacterianas sedimentadas en 250 µl de Tampón P1 y transferir a un tubo de microcentrífuga.
- Agregar 250 µl de Buffer P2 y mezclar bien invirtiendo el tubo 4–6 veces hasta que la solución se vuelva clara. No permitir que la reacción de lisis proceda más de 5 min. (Si usa el reactivo LyseBlue, la solución se volverá azul)
- Agregar 350 µl de Buffer N3 y mezclar inmediatamente y completamente invirtiendo el tubo 4–6 veces. (Si usa el reactivo LyseBlue, la solución se volverá incolora)
- Centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm (~ 17,900 x g) en una microcentrífuga.
- Aplicar 800 µl de sobrenadante del paso 5 a la columna de centrifugación QIAprep 2.0 mediante pipeteo. Centrifugar durante 30–60 s y desechar el flujo.
- Recomendado: Lavar la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0.5 ml de tampón PB. Centrifugar durante 30–60 s y desechar el flujo
Nota: este paso solo es necesario cuando se utilizan endA + cepas u otras cepas de bacterias con alta actividad nucleasa o contenido de carbohidratos.
- Lavar la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0.75 ml de Buffer PE. Centrifugar durante 30–60 s y desechar el flujo,
- Centrifugar durante 1 minuto para eliminar el tampón de lavado residual.
- Colocar la columna QIAprep 2.0 en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml. Para eluir el ADN, añadir 50 µl de Buffer EB (TrisCl 10 mM, pH 8.5) o agua al centro del QIAprep 2.0 spin column , dejar reposar durante 1 min y centrifugar durante 1 min.
- Si el ADN extraído se analiza en un gel, agregar 1 volumen de Loading Dye por 5 volúmenes de ADN purificado. Mezclar la solución pipeteando arriba y abajo antes de cargar el gel.

Anexo 6. Protocolo para purificación de ADN de 40 pb a 50 kb a partir de soluciones acuosas

Procedimiento:

- Transferir la muestra a un tubo de 1.5 ml. Agregar 3 volúmenes de **Buffer QX1** a 1 volumen de muestra de ADN de 100 pb - 4 kb. (Por ejemplo, agregar 300 µl de Buffer QX1 a cada 100 mg de gel).
- Resuspender **QIAEX II** mediante vortecido durante 30 s. Añadir 10 µl de **QIAEX II** a la muestra.
- Incubar a 50° C durante 10 minutos para solubilizar la agarosa y unir el ADN. Mezclar por vortecido * cada 2 minutos para mantener **QIAEX II** en suspensión. Comprobar que el color de la mezcla sea amarillo. (Si el color de la mezcla es naranja o púrpura, agregar 10 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.0, y mezclar).
- Centrifugar la muestra durante 30 segundos y eliminar cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta.
- Lavar el pellet con 500 µl de **Buffer QX1**. (Resuspender el sedimento mediante agitación con vórtex. * Centrifugar la muestra durante 30 segundos y retirar todo el sobrenadante con una pipeta. Este paso de lavado elimina la agarosa residual).
- Lavar el pellet dos veces con 500 µl de **Buffer PE**. (Resuspender el pellet mediante vórtice *. Centrifugar la muestra durante 30 s y eliminar con cuidado el sobrenadante con una pipeta. Estos pasos de lavado eliminan los restos de sal).
- Secar al aire el pellet durante 10–15 minutos o hasta que el pellet se vuelva blanco. (Si se usan 30 µl de suspensión QIAEX II, secar al aire el sedimento durante aproximadamente 30 minutos. No secar al vacío, ya que esto puede causar un secado excesivo. El secado en exceso del pellet QIAEX II puede resultar en una disminución de la eficiencia de elución).
- Para eluir el ADN, agregar 20 µl de Tris · Cl 10 mM, pH 8.5 o H₂O y volver a suspender el sedimento mediante vórtice. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar durante 30 s. Con cuidado pipetear el sobrenadante en un tubo limpio. (El sobrenadante ahora contiene el ADN purificado).
- Opcional: repita los pasos 9 y 10 y combine los eluatos. (Un segundo paso de elución aumentará el rendimiento en aproximadamente un 10-15%).

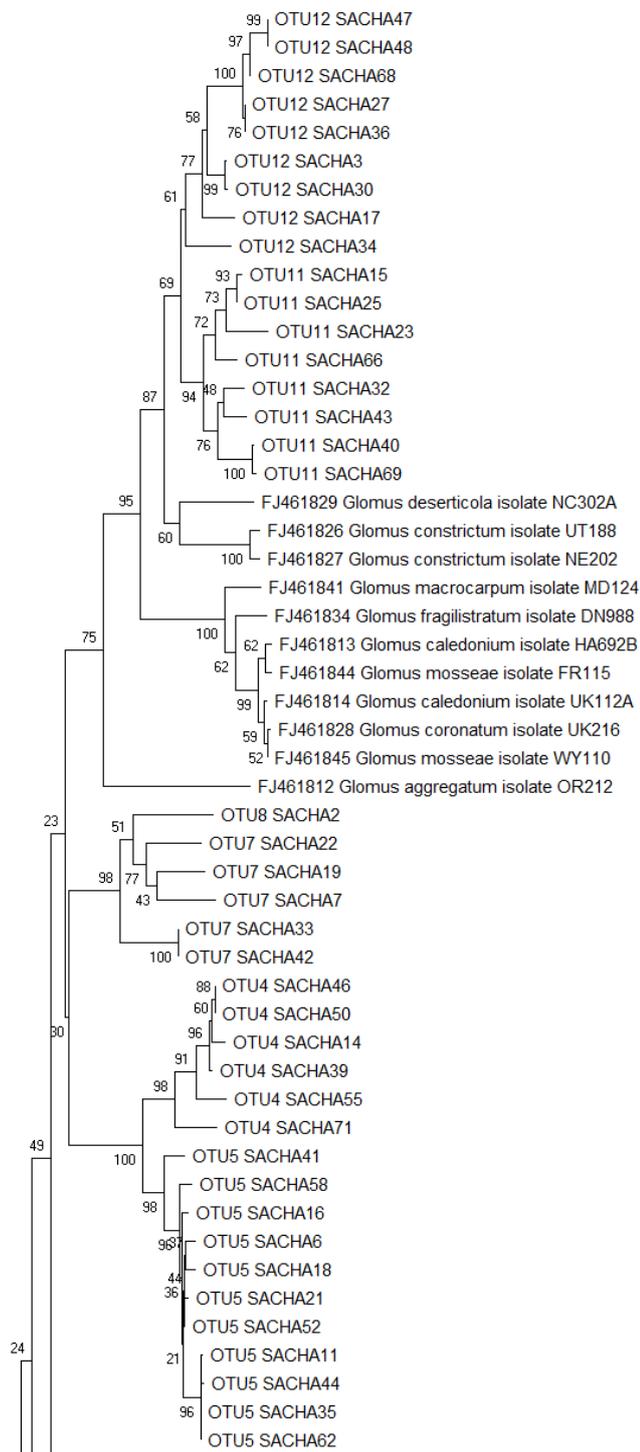
**Anexo 7. Análisis fisicoquímico del suelo en parcelas de sachá inchi de cuatro
localidades de la región San Martín**

LOCALIDAD	EDAD DEL CULTIVO (años)	PLANTA	pH	C.E. (dS/m)	CaCO3 (%)	M.O. (%)	P (ppm)	K (ppm)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
												Clase Textural
PAUCARPATA-LAMAS	1	LA-PA-A-P1	7.62	0.34	19.99	3.42	8.4	250	24	38	38	Fr.Ar.
		LA-PA-A-P3	7.71	0.47	14.76	4.50	10.7	397	30	26	44	Ar.
		LA-PA-A-P4	7.67	0.47	10.95	7.24	11.8	295	46	22	32	Fr.Ar.A.
		LA-PA-A-P5	7.75	0.46	12.38	4.06	4.8	471	30	26	44	Ar.
	4	LA-PA-B-P1	7.71	0.41	15.71	4.83	5.7	282	36	32	32	Fr.Ar.
		LA-PA-B-P2	7.71	0.43	19.52	5.29	4.8	272	38	32	30	Fr.Ar.
		LA-PA-B-P3	7.72	0.43	14.76	4.43	4.3	270	32	32	36	Fr.Ar.
		LA-PA-B-P4	7.80	0.31	20.94	3.97	3.4	203	36	40	24	Fr.
CASHNAHUASI-EL DORADO	1	DO-CA-A-P1	7.39	0.38	0.70	11.13	14.1	544	30	33	37	Fr.Ar.
		DO-CA-A-P2	6.92	0.37	0.00	6.55	16.7	650	22	35	43	Ar.
		DO-CA-A-P3	7.13	0.32	0.00	5.88	8.9	306	34	33	33	Fr.Ar.
		DO-CA-A-P4	7.77	0.27	8.60	8.66	8.0	339	28	41	31	Fr.Ar.
	6	DO-CA-B-P2	6.53	0.18	0.00	6.90	10.7	615	30	39	31	Fr.Ar.
		DO-CA-B-P3	7.26	0.41	0.70	11.26	7.3	409	26	25	49	Ar.
		DO-CA-B-P4	6.61	0.30	0.20	6.07	2.8	335	22	35	43	Ar.
		DO-CA-B-P5	6.74	0.33	0.00	14.48	5.2	328	42	29	29	Fr.Ar.
SAN ANTONIO-PICOTA	0.5	PI-SA-A-P1	7.84	0.43	15.71	5.79	6.0	758	36	30	34	Fr.Ar.
		PI-SA-A-P2	7.75	0.47	5.71	4.24	5.7	1022	28	28	44	Ar.
		PI-SA-A-P3	7.71	0.50	13.33	4.21	6.5	726	22	38	40	Ar.
		PI-SA-A-P5	7.71	0.53	13.80	5.33	8.2	1052	22	40	38	Fr.Ar.
	3.5	PI-SA-B-P1	7.84	0.39	15.23	3.37	3.5	680	26	36	38	Fr.Ar.
		PI-SA-B-P2	7.93	0.42	22.37	2.68	4.9	1020	26	34	40	Ar.
		PI-SA-B-P3	7.84	0.45	12.85	4.06	3.6	1070	30	32	38	Fr.Ar.
		PI-SA-B-P4	7.84	0.37	14.28	3.59	5.1	662	32	32	36	Fr.Ar.
NUEVO PROGRESO-BELLAVISTA	0.25	BE-PO-A-P1	7.69	0.40	21.00	5.14	2.8	511	26	33	41	Ar.
		BE-PO-A-P2	7.73	0.38	25.30	4.44	4.4	391	24	33	43	Ar.
		BE-PO-A-P3	7.78	0.44	23.90	7.46	3.8	523	30	33	37	Fr.Ar.
		BE-PO-A-P4	7.82	0.31	22.40	4.14	3.3	332	30	27	43	Ar.
	5	BE-PO-B-P1	7.78	0.54	30.50	6.73	3.8	518	24	31	45	Ar.
		BE-PO-B-P2	7.82	0.47	29.60	4.78	3.7	512	26	33	41	Ar.
		BE-PO-B-P3	7.86	0.59	28.60	1.38	4.2	594	26	31	43	Ar.
		BE-PO-B-P4	7.77	0.40	34.80	5.75	3.4	344	24	41	35	Fr.Ar.

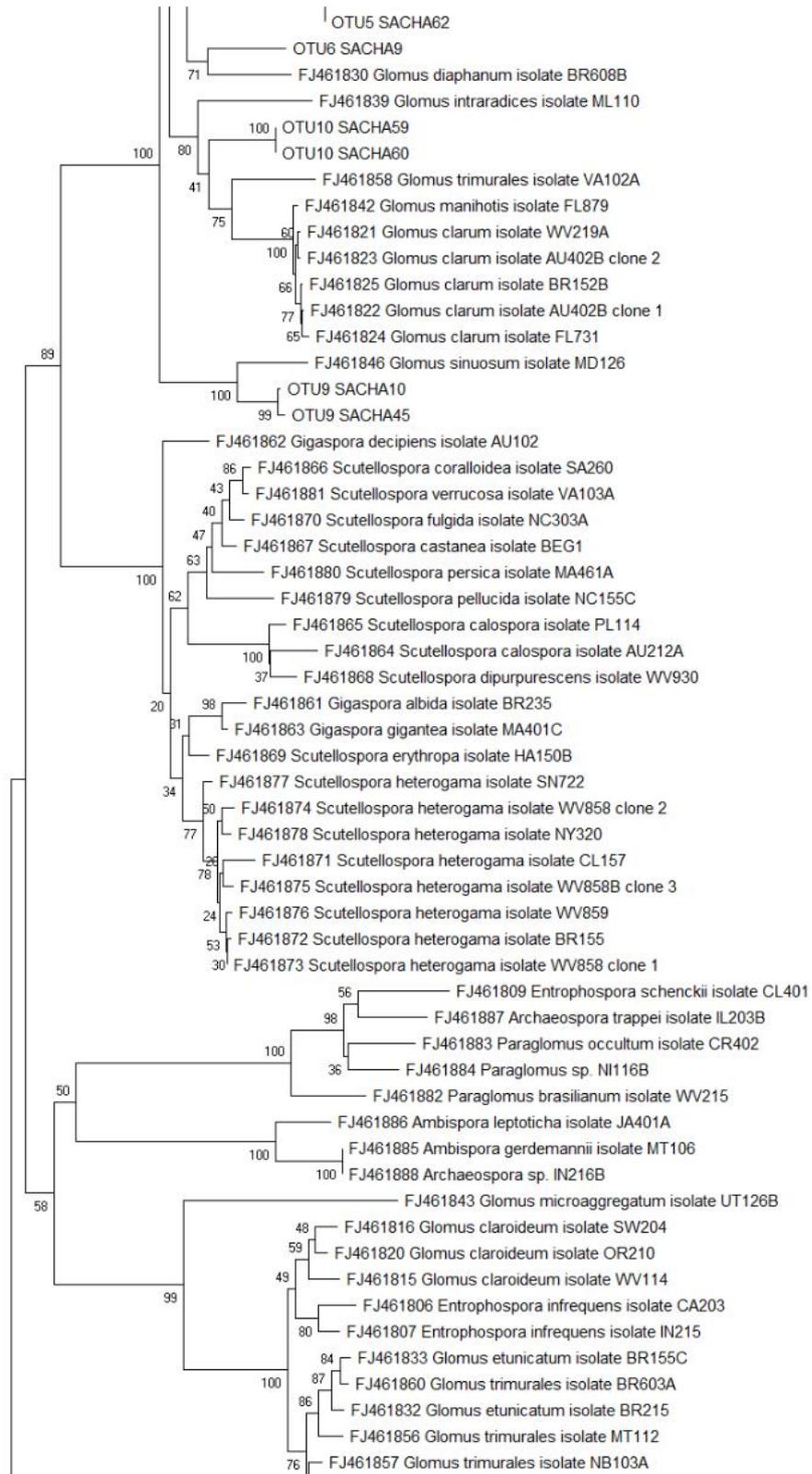
<<Continuación>>

LOCALIDAD	EDAD DEL CULTIVO (años)	PLANTA	CIC (meq/100g)	Cationes cambiabiles					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases	N (%)
				Ca+2	mg+2	K+	Na+	Al+3 + H+				
PAUCARPATA-LAMAS	1	LA-PA-A-P1	25.60	23.03	1.63	0.78	0.15	0	25.60	25.60	100	0.23
		LA-PA-A-P3	35.84	31.14	3.83	0.76	0.11	0	35.84	35.84	100	0.31
		LA-PA-A-P4	40.00	34.96	4.20	0.72	0.11	0	40.00	40.00	100	0.45
	4	LA-PA-A-P5	36.32	32.10	3.02	1.06	0.15	0	36.32	36.32	100	0.31
		LA-PA-B-P1	27.68	24.57	2.23	0.76	0.12	0	27.68	27.68	100	0.38
		LA-PA-B-P2	28.16	24.60	2.72	0.68	0.16	0	28.16	28.16	100	0.33
		LA-PA-B-P3	30.72	27.32	2.65	0.64	0.10	0	30.72	30.72	100	0.30
CASHNAHUASI-EL DORADO	1	LA-PA-B-P4	26.08	23.03	2.35	0.59	0.11	0	26.08	26.08	100	0.27
		DO-CA-A-P1	39.20	31.40	3.67	1.21	0.12	0	36.40	36.40	93	0.57
		DO-CA-A-P2	42.56	28.40	3.12	1.64	0.10	0	33.26	33.26	78	0.31
	6	DO-CA-A-P3	31.68	23.40	1.62	0.72	0.09	0	25.82	25.82	82	0.34
		DO-CA-A-P4	28.32	25.34	2.18	0.68	0.12	0	28.32	28.32	100	0.46
		DO-CA-B-P2	27.20	19.60	2.75	1.32	0.13	0	23.80	23.80	88	0.35
		DO-CA-B-P3	42.40	32.90	2.82	0.83	0.15	0	36.70	36.70	87	0.48
SAN ANTONIO-PICOTA	0.5	DO-CA-B-P4	30.72	21.70	2.37	0.79	0.13	0	24.99	24.99	81	0.28
		DO-CA-B-P5	40.00	30.10	2.38	0.71	0.13	0	33.32	33.32	83	0.58
		PI-SA-A-P1	27.68	19.85	6.17	1.54	0.12	0	27.68	27.68	100	0.36
	3.5	PI-SA-A-P2	31.68	24.52	5.47	1.55	0.15	0	31.68	31.68	100	0.30
		PI-SA-A-P3	27.20	22.15	3.13	1.76	0.15	0	27.20	27.20	100	0.29
		PI-SA-A-P5	28.80	21.96	3.97	2.74	0.13	0	28.80	28.80	100	0.35
		PI-SA-B-P1	24.64	19.22	3.65	1.59	0.18	0	24.64	24.64	100	0.25
NUEVO PROGRESO-BELLAVISTA	0.25	PI-SA-B-P2	25.60	19.46	3.83	2.17	0.13	0	25.60	25.60	100	0.22
		PI-SA-B-P3	28.80	21.84	4.30	2.53	0.13	0	28.80	28.80	100	0.30
		PI-SA-B-P4	24.80	18.65	4.32	1.67	0.17	0	24.80	24.80	100	0.27
	5	BE-PO-A-P1	35.20	29.56	4.53	0.97	0.14	0	35.20	35.20	100	0.40
		BE-PO-A-P2	30.72	25.88	3.87	0.82	0.15	0	30.72	30.72	100	0.33
		BE-PO-A-P3	32.32	25.92	5.23	1.01	0.17	0	32.32	32.32	100	0.43
		BE-PO-A-P4	34.56	29.72	4.07	0.63	0.14	0	34.56	34.56	100	0.30
5	BE-PO-B-P1	31.04	24.70	5.18	0.99	0.17	0	31.04	31.04	100	0.43	
	BE-PO-B-P2	30.08	23.97	4.80	1.14	0.17	0	30.08	30.08	100	0.33	
	BE-PO-B-P3	28.80	22.33	5.12	1.18	0.17	0	28.80	28.80	100	0.42	
	BE-PO-B-P4	24.32	19.50	3.98	0.70	0.13	0	24.32	24.32	100	0.36	

Anexo 8. Árbol filogenético y clustering al 97% de secuencias de clones de HMA en asociación con raíces de sachá inchi



<<Continuación>>



<<Continuación>>

