

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE COMUNIDADES DE HONGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) ASOCIADOS A SISTEMAS
RADICULARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) Y SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.) EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

Presentada por:

RICHARD ESTRADA CAÑARI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2023

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

Reporte Turnitin

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

9%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	repositorio.cucba.udg.mx:8080 Fuente de Internet	<1%
4	repository.udca.edu.co Fuente de Internet	<1%
5	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1%
6	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
7	María Teresa Sebastiá Frasquet. "Pigmentos indicadores: caracterización de la comunidad fitoplanctónica en ecosistemas marinos costeros", Universitat Politecnica de Valencia, 2012 Publicación	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE COMUNIDADES DE HONGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) ASOCIADOS A SISTEMAS
RADICULARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) Y SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.) EN LA REGIÓN SAN MARTÍN”**

Presentada por:

RICHARD ESTRADA CAÑARI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Ph.D. Gretty Katherine Villena Chávez
MIEMBRO

Mg. Sc. Katty Ogata Gutiérrez
MIEMBRO

Mg.Sc. María del Rosario Castro Muñoz
ASESORA

Ing. M.Sc. Mike Anderson Corazón Guivin
CO-ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar mi más profundo agradecimiento en primer término a mis padres, cuyo inquebrantable apoyo a lo largo de mi trayectoria profesional ha sido mi fuente de inspiración constante, brindándome la fortaleza para perseverar en mis elecciones y envolviéndome con un amor y comprensión incomparables.

Agradecer también al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad de San Martín, reconozco su contribución al proporcionarme el espacio, la instrumentalidad y los materiales esenciales para realizar la investigación.

Además, de dar las gracias al Ingeniero M. Sc. Mike Anderson Corazón Guivin, quien supervisó el Laboratorio de Biología y Genética Molecular en la Universidad de San Martín. Y también agradecer a Ana María, por su comprometida dirección y generosa transferencia de conocimientos a lo largo del desarrollo de la tesis merecen mi reconocimiento.

Deseo expresar mi sincero reconocimiento a la profesora María del Rosario Josefina Castro Muñoz de la UNALM, cuya colaboración durante la realización de este proyecto de tesis y su compromiso en brindar asesoramiento son altamente valorados.

Igualmente, quiero expresar mi especial reconocimiento al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) por su contribución financiera al proyecto titulado: “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 sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Región de San Martín”.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 CULTIVO DE CAFÉ.....	3
2.1.1 Origen e distribución geográfica.....	3
2.1.2 Descripción botánica	3
2.1.3 Ciclo Fenológico	4
2.1.4 Importancia económica.....	5
2.1.5 Manejo agronómico de café en el Perú	5
2.2 CULTIVO DE SACHA INCHI.....	6
2.2.1 Origen y distribución geográfica.....	6
2.2.2 Descripción botánica	6
2.2.3 Ciclo Fenológico	7
2.2.4 Importancia económica de sachá inchi.....	8
2.2.5 Manejo agronómico de sachá inchi en Perú.....	8
2.3 MICORRIZAS.....	9
2.3.1 Origen de las micorrizas	9
2.3.2. Clasificación de las micorrizas	9
2.3.3 Hongos micorrícicos arbusculares	11
III. METODOLOGÍA.....	17
3.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	17
3.2. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	18
3.3 PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	18
3.4 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA.....	19
3.4.1 Amplificación del marcador molecular por PCR anidada.....	19

3.4.2 Análisis bioinformático	20
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 RESULTADOS	22
4.2 DISCUSIONES	46
V. CONCLUSIONES	49
VI. RECOMENDACIONES	50
VII. BIBLIOGRAFÍA	51
VIII. ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ubicación geográfica de las parcelas de sachá inchi y café muestreadas en la región de San Martín para análisis de diversidad de HMA mediante NGS-Illumina	17
Tabla 2: Distribución de las muestras de HMA en las localidades de San Martín.....	22
Tabla 3: Resultados de la generación de ASV, de remoción de quimeras y secuencias no HMA provenientes de muestras de café y sachá inchi	26
Tabla 4: PERMANOVA de las HMA de café y sachá inchi.....	29
Tabla 5: Two-way PERMANOVA de HMA de café	36
Tabla 6: Two-way PERMANOVA de HMA asociadas a sachá Inchi	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo de HMA en la región San Martín.....	18
Figura 2. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café y Sacha Inchi.....	30
Figura 3. Curvas de rarefacción de las muestras de HMA asociadas a café.	31
Figura 4. Alfa Diversidad de las muestras de HMA asociadas café con respecto al criterio de rango de edad.....	33
Figura 5. Índices de alfa Diversidad de las muestras de café con respecto a las localidades.....	34
Figura 6. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café mostrando rango de edades.	35
Figura 7. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café mostrando localidades.....	35
Figura 8. Curvas de rarefacción de las muestras de Sacha Inchi.....	37
Figura 9. Alfa Diversidad de las muestras de Sacha inchi con respecto al rango de edades. Se muestra el p-value de las comparaciones.....	38
Figura 10. Índices de alfa Diversidad de las muestras de Sacha Inchi con respecto a las distintas localidades estudiadas. Se muestra el p-value de las comparaciones.....	39
Figura 11. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a Sacha Inchi mostrando rango de edades.....	40
Figura 12. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a Sacha Inchi mostrando localidades.....	40
Figura 13. Composición taxonómica nivel de familia de HMA asociadas a café.....	42
Figura 14. Composición taxonómica nivel de género de HMA asociadas a café.....	43

Figura 15. Composición taxonómica nivel de familia de HMA asociadas a Sacha	
Inchi	44
Figura 16. Composición taxonómica nivel de género de HMA asociadas a Sacha	
Inchi	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) para muestras de sachá inchi correspondientes a la localidad de San Antonio.	68
Anexo 2: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachá inchi correspondientes a la localidad Nuevo Progreso.....	69
Anexo 3: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachá inchi correspondientes a la localidad Cashnahuasi.	70
Anexo 4: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachá inchi correspondientes a la localidad de Paucarpata.	71
Anexo 5: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a la localidad El Mirador.	72
Anexo 6: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a localidad de Cashnahuasi.....	73
Anexo 7: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a localidad de Shucshuyacu.....	74
Anexo 8: Factura del servicio de secuenciación de la empresa MR.DNA LAB.....	75
Anexo 9: Archivos fastq de las 51 muestras de café y sachá inchi.....	76
Anexo 10: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a café (Nivel taxonómico: Orden).....	77
Anexo 11: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a café (Nivel taxonómico: Especie).....	78
Anexo 12:: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a sachá inchi (Nivel taxonómico: Orden).....	79
Anexo 13: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a sachá inchi (Nivel taxonómico: Especie).....	80

RESUMEN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) desempeñan un papel fundamental al facilitar la absorción de nutrientes y mejorar el crecimiento de las plantas a través de una simbiosis mutualista en sus raíces. En la región de San Martín, los cultivos de café y sachá inchi se benefician de esta simbiosis, sin embargo, la relación con respecto a esta composición es aún desconocida. En tanto, se plantearon los siguientes objetivos: a) Identificar los HMA a través del secuenciamiento masivo de ADN con Illumina, y b) Investigar la riqueza y composición de los HMA en relación a la geografía y la edad de las plantas. Para lo cual se realizaron muestreos de raíces en cinco localidades de la región de San Martín: Lamas, Bellavista, El Dorado y Picota para sachá inchi (parcelas de 1 año y 2 años); y Lamas, El Dorado y Moyobamba para café (parcelas de 1 año, entre 3 y 4 años, y mayores de 6 años). La caracterización molecular se realizó mediante una PCR anidada y el secuenciamiento fue con Illumina. Se determinaron cambios significativos en la diversidad alfa y beta del café en función de las edades del cultivo y las localidades. Probablemente la selección ambiental en el tiempo provocó limitaciones bióticas y abióticas que favorecieron a un conjunto de taxones de hongos HMA. No obstante, en el caso de la diversidad del sachá inchi solo se observó influencia de la geografía. Posiblemente el periodo de tiempo no fue lo bastante largo para mostrar variaciones, pero las alteraciones debido a las prácticas agrícolas sí tuvieron una relevancia significativa para este cultivo. Esto es un gran aporte para comprender la relación de la composición de HMA con estas plantas y las variables estudiadas, además de servir como base para el mejoramiento de café y sachá inchi.

Palabras claves: Secuenciamiento de nueva generación, Illumina, edad, geografía, agricultura, hongos

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a crucial role in facilitating nutrient absorption and enhancing plant growth through a mutualistic symbiosis in their roots. In the San Martín region, coffee and sacha inchi crops benefit from this symbiosis, but the relationship regarding this composition remains unknown. Thus, the following objectives were proposed: a) Identify the AMF through DNA sequencing with Illumina, and b) Investigate the richness and composition of the AMF in relation to geography and plant age. For this, root samples were taken from five locations in the San Martín region: Lamas, Bellavista, El Dorado, and Picota for sacha inchi (plots of 1 year and 2 years); and Lamas, El Dorado, and Moyobamba for coffee (plots of 1 year, between 3 and 4 years, and older than 6 years). Molecular characterization was performed using nested PCR, and sequencing was done with Illumina. Significant changes were determined in the alpha and beta diversity of coffee based on age and locations. Likely because environmental selection over time caused biotic and abiotic constraints that favored a set of AMF taxa. However, for sacha inchi diversity, only geographic influence was observed. Perhaps the time period was not long enough to show variations, but alterations due to agricultural practices did have significant relevance for this crop. This is a significant contribution to understanding the relationship of AMF composition with these plants and the variables studied, and also serves as a basis for improving coffee and sacha inchi cultivation.

Keywords: Next generation sequencing, Illumina, age, geography, agriculture, fungus

I. INTRODUCCIÓN

Los HMA son una parte fundamental de la microbiota del suelo debido a su simbiosis mutualista con las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, esta asociación se conoce como micorrizas (Hu et al., 2022). En esta simbiosis micorrícica, el micelio del hongo se asocia con las raíces de la planta, donde esta contribuye con compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis y le brinda un microambiente, mientras que el hongo absorbe nutrientes minerales y humedad edáfica para transferirlos a la planta (Shi et al., 2023).

La diversidad taxonómica de los HMA es amplia y abarca diversas especies (Mathieu et al., 2018). Estos hongos, pertenecientes al phylum Glomeromycota, comprenden varias familias y órdenes y tienen una importancia que trasciende a los cultivos de interés económico, ejerciendo una función crucial en el desarrollo de los ecosistemas y la preservación de las comunidades vegetales (Jacott et al., 2017). Tradicionalmente, la clasificación de especies de HMA se ha fundamentado en la morfología y aspecto de sus esporas (Crossay et al., 2017). No obstante, este método puede ser limitado debido a variaciones en el aspecto de las esporas, influenciadas por factores medioambientales o incluso la ausencia temporal o permanente de esporas (Susila et al., 2022). Por tanto, se requiere la implementación de técnicas más avanzadas y precisas para estudiar y comprender la diversidad de los HMA.

Desde hace más de un siglo, se ha constatado la presencia de micorrizas arbusculares en las raíces del café (Cogo et al., 2017; De Beenhouwer et al., 2015). Hay estudios que han demostrado que las plántulas de café dependen significativamente de esta simbiosis (Vallejos et al., 2019). Sin embargo, hasta el momento, el conocimiento acerca de la diversidad de micorrizas en *C. arabica* se ha fundamentado principalmente en el análisis morfológico de las esporas (Alves et al., 2015). Sobre la identificación taxonómica en Sudamérica, las especies de HMA encontradas en cafetales se concentran principalmente en Glomeraceae (33%), Acaulosporaceae (28,2%) y Gigasporaceae (20,4%), quedando el 18.4% en otras familias (Lovera et al., 2022).

En la actualidad, existe una escasez de estudios que aborden la interacción de los HMA con especies de *Plukenetia volubilis* y su diversidad (de la Sota Ricaldi et al., 2023).

Investigaciones previas en condiciones controladas han revelado que los HMA de los géneros *Paraglomus*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Claroideoglomus* y *Funneliformis* promueven la morfogénesis de las plántulas de sachá inchi, mejorando su tolerancia a la sequía mediante modificaciones en las características estructurales, funcionales y metabólicas de las raíces (Wiriya et al., 2020). Además, se han identificado algunas especies de hongos HMA en la rizosfera de sachá inchi en la selva peruana y en Tailandia (Corazon-Guivin et al., 2019; Corazon-Guivin et al., 2021). No obstante, estos informes se basan en la clasificación taxonómica de las esporas, mientras que la diversidad y composición de los hongos AM que colonizan las raíces de sachá inchi aún no han sido exploradas en profundidad.

Las investigaciones sobre HMA han adoptado herramientas de identificación molecular, principalmente fundamentadas en el enfoque de PCR (Polymerase Chain Reaction) y el análisis de secuencias de ADN. Estas investigaciones se han centrado en distintos criterios, como regiones, plantas hospedadoras y épocas de muestreo (Rivera et al., 2016; S. Rodríguez et al., 2017; Varela et al., 2016). La zona más adecuada para llevar a cabo ampliaciones de PCR y la determinación de especies de HMA es el ADN ribosomal (ADNr), gracias a su ocurrencia en todos los hongos de interés, su alta cantidad de copias, simplicidad para amplificar, su aptitud de amplificación específica y suficiente variabilidad de secuencias nucleotídicas para diferenciar grupos taxonómicos (Kumar & Chaurasia, 2016).

Dentro del ADNr, se encuentran regiones conservadas, como 18S, 5.8S y 28S, con zonas intergénicas variables y polimórficas, como ITS1 e ITS2, que resultan muy informativas (Krishnamoorthy et al., 2017). La región ADNr LSU-D2 como marcador molecular para la secuenciación de alto rendimiento, muestra un poder de resolución similar a la región ITS, lo que indica que es útil para identificar especies (Drain et al., 2019). Este marcador es un buen candidato para llevar a cabo la identificación de especies a partir de muestras recolectadas en el campo. Además, ha sido incluido en el conjunto ampliado de códigos de barras de ADN para los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), lo que implica que ha sido caracterizado en la mayoría de las especies de HMA recién descritas (Drain et al., 2019). El propósito de esta tesis es investigar, a través del secuenciamiento masivo de DNA de la región LSU-D2 con Myseq, la composición y variedad genética de los hongos que forman micorrizas arbusculares en relación con las plantas de café (*Coffea arabica* L.) y sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CULTIVO DE CAFÉ

2.1.1 Origen e distribución geográfica.

El origen del café se encuentra en las selvas tropicales de África, específicamente en la familia de las Rubiáceas, que incluye más de 6,000 especies y 500 géneros (Adepoju et al., 2017). Entre estos, los géneros *Coffea* y *Psilanthus*, pertenecientes a la tribu *Coffeae*, están estrechamente vinculados al café (Stoffelen et al., 2021).

El género *Coffea* tiene una enorme relevancia económica y consta de 103 especies, de las cuales 41 tuvieron su origen en el continente africano, mientras que 59 son de origen silvestre y se encuentran en Madagascar (Martinez, 2022). Existen numerosas especies de cafeto y diversas variedades de cada una de ellas, sin embargo, las especies con mayor relevancia económica son del género *Coffea*, identificadas como *Coffea arabica* Linneo, también denominada arábica o arábiga, y *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner, a la que se le conoce como Robusta (Suarez, 2022).

2.1.2 Descripción botánica

Los cafetos de la especie arábica mayormente se clasifican como arbustos, en otras especies también pueden denominarse árboles.

El tallo de esta planta es leñoso, tiene una posición erguida y su longitud varía, con una altura que oscila entre 2.0 y 5.0 metros. Una característica distintiva es la existencia de tres tipos de yemas que dan origen a diferentes partes de la planta: el tallo, las ramas y las hojas (Arcila et al., 2007).

La raíz del cafeto es gruesa y pivotante, penetrando verticalmente hasta 50 o más centímetros de profundidad (Quintana, 2018). Esta requiere una adecuada disponibilidad de agua y nutrientes en zonas edáficas (Arcila et al., 2007). Las hojas son opuestas y tienen forma elíptica, además su coloración temprana es una característica distintiva que permite identificar diversas variedades de café (Florez et al., 2013; Romero & Camilo, 2019).

La flor del café cuenta con una corola formada por cinco lóbulos, así como un cáliz, cinco estambres y un pistilo. El ovario se ubica en la base de la corola y contiene dos óvulos, que después de la fecundación se convierten en semillas de café (Arcila, 2004).

El fruto del cafeto es una baya drupácea compuesta por tres elementos distintos: la pulpa, el exocarpio o epidermis, y el mesocarpio o mucílago que envuelve los dos granos adyacentes (Cevallos, 2023).

El contenido interno de la semilla de café engloba tanto el endospermo como el embrión, siendo el primero caracterizado por su tonalidad verdosa y amarillenta, y conteniendo almidón, aceites, azúcares, cafeína y otras sustancias relevantes para su composición (Arcila et al., 2007).

2.1.3 Ciclo Fenológico

Múltiples factores ejercen influencia sobre las etapas fenológicas del cultivo del café. Entre estos factores se encuentran la temperatura y la precipitación, los cuales tienen implicaciones en los procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la transpiración y las velocidades de crecimiento y desarrollo (Cuenca, 2020). Además, se expone que este período se extiende a lo largo de un período de 12 meses, iniciando desde que emerge la planta hasta su senescencia (Cuenca, 2020).

2.1.3.1 Fase de desarrollo vegetativo

En el contexto del cultivo de café, la etapa de desarrollo vegetativo abarca el período en el cual la planta experimenta el desarrollo de nudos, ramas, hojas y nuevas raíces (Cuenca, 2020). También se describe esta fase como una división en tres etapas distintas: la germinación hasta el trasplante, que abarca aproximadamente dos meses; el período de almácigo, con una duración entre 5 y 6 meses; y la siembra, que abarca hasta los 11 meses y coincide con la primera floración (Cascante, 2017).

2.1.3.2 Fase de desarrollo reproductivo

La etapa reproductiva del cultivo de café inicia con la aparición de las primeras flores, cuyo comienzo puede estar sujeto a influencias de diversos factores, como el tiempo de permanencia del fotoperiodo, periodo de siembra, las condiciones térmicas y la presencia de agua, como señala (Cuenca, 2020).

2.1.3.3 Fase de senescencia

En esta etapa el café logra su máximo crecimiento y rendimiento, normalmente ocurre desde los seis hasta ocho años de edad (Cascante, 2017). Sin embargo, también se proporciona un análisis minucioso sobre el deterioro gradual de la planta, resultando en una disminución de su productividad a niveles de rentabilidad reducidos (Cuenca, 2020).

2.1.4 Importancia económica

El café representa un cultivo de significativa trascendencia a nivel global, con un notable impacto económico, particularmente en naciones en desarrollo, como enfatiza el estudio de Villalta & Gatica (2019). Ocupa el segundo lugar solamente después del petróleo crudo. Por consiguiente, su relevancia para la sociedad es de gran magnitud (Enríquez et al., 2020).

La producción de café es un pilar esencial en la economía de naciones tropicales de América Latina, según Rahn et al. (2018). Esto brinda a los productores la oportunidad de expandir sus perspectivas profesionales a través de la creación de negocios centrados en el café, como indica el estudio de Davis et al. (2019).

2.1.5 Manejo agronómico de café en el Perú

El café (*Coffea arabica* L.) es el principal producto de agroexportación del Perú, el cual le otorga a la caficultura una gran importancia a nivel nacional (Díaz & Williams, 2017). De acuerdo con datos suministrados por el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2020), el cultivo de café ocupa la mayor extensión de tierra agrícola, abarcando aproximadamente 425,400 hectáreas. Además, representa una fuente significativa de ingresos para el sector agrícola, contribuyendo con casi el 30% de las divisas generadas. El Perú en el ámbito global se encuentra en el noveno lugar en comercio exterior de café tradicional y segundo de café orgánico y es el número uno en envíos a los Estados Unidos (Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo, 2023).

Hoy en día, en Perú, el cultivo del café se distribuye en quince regiones, entre las cuales se destacan Pasco, Cusco, Amazonas, Junín, San Martín y Cajamarca. Estas regiones son reconocidas por tener las mayores extensiones de tierras aptas para el cultivo y por ser líderes en la producción cafetalera. San Martín es la región más importante en términos de producción de café, representando el 23% de la producción total del país y albergando

alrededor de 90,000 hectáreas de cultivo de café, distribuidas en tres áreas geográficas distintas: Huallaga Central, Alto Huallaga y Valle del Alto Mayo (Díaz & Williams, 2017).

Las condiciones óptimas necesarias para el cultivo del café, incluyendo una temperatura ideal que oscila entre 17 y 23°C, con mínimas de 16 a 13°C y máximas de 23 a 27°C. Asimismo, se requiere una precipitación anual que se encuentre dentro del rango de 1600 a 1800 mm. La humedad relativa debe situarse en un intervalo de 70-95%. Además, es importante destacar que el suelo debe presentar una ligera acidez, con un pH que oscila entre 5.5 y 6.5 (Gonzales, 2015).

A pesar de la significativa importancia del café en la agricultura peruana, su cultivo presenta algunas restricciones en cuanto a su manejo (Del Aguila et al., 2018). Entre estas se encuentran la deficiente nutrición del suelo, carencias en técnicas de cultivo como la poda y el manejo de hierbas no deseadas, así como la escasa implementación de medidas para el control de plagas. Todo esto ha resultado en una productividad media más baja en comparación con la de otros países productores (Díaz & Williams, 2017). Por consiguiente, es imperativo poner más énfasis en el manejo agrícola del cultivo, otorgándole un enfoque prioritario a esta actividad.

2.2 CULTIVO DE SACHA INCHI

2.2.1 Origen y distribución geográfica

El sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una especie autóctona de la región amazónica. Se encuentra clasificado en el género *Plukenetia*, cuya evolución se estima que ocurrió en la selva amazónica o atlántica de Brasil en el Oligoceno, aproximadamente hace 28.7 millones de años. Posteriormente, tuvo una dispersión hacia estas regiones, América Central, México y otras áreas durante el Mioceno (Cardinal et al., 2019). De las 20 especies registradas, 12 se distribuyen en el Neotrópico, mientras que 7 se encuentran en África y Madagascar. Además, una sola especie ha sido identificada en Asia (Bussmann et al., 2013).

2.2.2 Descripción botánica

La especie exhibe una naturaleza trepadora, enredándose de manera enérgica y con un crecimiento rápido. El eje principal es robusto, logrando alcanzar una altura de soporte o tutor de 1.8 metros y extendiéndose hasta 10 metros de longitud. La consistencia del tallo es semileñosa y la planta es de naturaleza perenne (Manco, 2006).

Se describe que las hojas se presentan en disposición alterna, forma de corazón, con un color verde oscuro y dimensiones que oscilan entre 10 y 12 cm de largo y 8 a 10 cm de ancho. Las nervaduras emergen desde la base de la hoja, y la nervadura central se dirige hacia el ápice (Manco, 2006).

La especie tiene flores masculinas y pistiladas, lo que la convierte en una planta hermafrodita. Las flores masculinas se presentan en grupos de racimos pequeños y blancos, mientras que las flores pistiladas se posicionan en la base de los racimos y se disponen de manera lateral en grupos de una a dos flores (Cachique, 2006).

El fruto del Sacha Inchi tiene forma de estrella y puede tener de cuatro a ocho lóbulos. Los lóbulos pueden dividirse cuando el fruto está maduro y sus paredes se endurecen (Gomez, 2004).

Las semillas del Sacha Inchi, en su mayoría, presentan una coloración marrón oscura y una forma ovalada. Tienen un diámetro que oscila entre 0,85 y 2,1 centímetros, con una ligera protuberancia en el centro y un aplanamiento hacia los bordes (Follegatti et al., 2009).

2.2.3 Ciclo Fenológico

El Sacha Inchi experimenta un crecimiento vegetativo constante, así como un proceso de floración y fructificación continuos a lo largo de todo el año. Sin embargo, durante las épocas de mayor precipitación, su productividad biológica se ve afectada negativamente (Manco, 2006).

2.2.3.1 Fase vegetativa

Esta fase en el sachu inchi abarca la formación de raíz, tallo y hojas, y se extiende hasta la etapa de prefloración por alrededor de tres meses. Siete días después de la germinación, se produce la emergencia del tallo principal, conocido como tallo guía. Durante esta fase, la planta de Sacha Inchi experimenta un crecimiento vigoroso y acelerado, lo cual requiere la presencia de tutores para promover su enrame y expansión, facilitando así un desarrollo más rápido y extenso (Ayala, 2016).

El Sacha Inchi exhibe un patrón de crecimiento vegetativo, floración y fructificación de forma continua a lo largo del año. Sin embargo, se ha observado que, durante períodos de alta precipitación, su productividad biológica tiende a disminuir (Gomez, 2004).

2.2.3.2 Fase reproductiva

La etapa de floración del Sacha Inchi inicia aproximadamente 3 meses después de la siembra, una vez que se ha completado el proceso de trasplante. En un primer momento, emergen las flores primordiales masculinas, seguidos por la parte femenina, en un intervalo de tiempo que va de 7 a 19 días (Arévalo, 1996).

La formación de los frutos del sachá inchi comienza aproximadamente 3 meses después de la siembra y finaliza 4 meses después del inicio de la floración. A partir de entonces, los frutos entran en su proceso de maduración, pasando de un tono verde negruzco a un color marrón oscuro o negro cenizo, lo que indica que están listos para ser recolectados (Arévalo, 1996). El proceso de maduración de esta fase se extiende por un período de aproximadamente 15 a 20 días, y la recolección se realiza de manera ininterrumpida a los 7.5 meses después del trasplante, como señala (Manco, 2006).

2.2.4 Importancia económica de sachá inchi

El Sacha Inchi se cultiva en Perú, así como en diversas zonas tropicales a nivel global, y se le valora por sus semillas comestibles que tienen un alto valor nutricional debido a su contenido de ácidos grasos esenciales (entre 45-50% de su composición), proteínas, tocoferoles, fitoesteroles y antioxidantes. Los ácidos grasos poliinsaturados son los componentes principales (aproximadamente 77,5-84,4%), mientras que los ácidos grasos monoinsaturados y saturados constituyen entre el 8,4-13,2% y 6,8-9,1%, respectivamente. Esto ha llevado a que esta especie tenga una importancia comercial, especialmente para la industria farmacéutica (Chirinos et al., 2013; Srichamnong et al., 2018).

2.2.5 Manejo agronómico de sachá inchi en Perú.

En el territorio peruano, es frecuente el cultivo de sachá inchi de forma exclusiva; sin embargo, también puede encontrarse en sistemas agroforestales, asociado a cultivos de subsistencia y otros cultivos anuales o perennes, como el cacao o café (Kodahl & Sørensen, 2021). Se encuentra en su hábitat natural en varias localidades, entre ellas Cuzco, Madre de Dios, Huánuco, Ucayali, Amazonas y San Martín. En la región de San Martín, se extiende a lo largo de la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, y también se localiza en los valles del Sisa (Manco, 2006).

El cultivo del Sacha Inchi requiere contar con un terreno nivelado y surcado mediante arado o rastra como preparación. La elección de semillas de alta calidad, con una tasa de germinación elevada, es un factor esencial para el éxito de la siembra directa (Manco, 2008). La época de cosecha está determinada por el patrón de precipitaciones y se realiza durante el período comprendido entre los meses de noviembre y abril. Bajo condiciones de monocultivo, en áreas de terreno plano y durante períodos estivales, se recomienda realizar el riego en intervalos de 15 a 20 días (Manco, 2008). La fertilización es una variable de gran relevancia, y se sugiere aplicar a la planta un fertilizante foliar que contenga nitrógeno (1,0 - 1,5 l/ha) y fósforo y potasio (1,0 - 2,0 kg/ha) al comienzo del período de floración y del desarrollo de los frutos. En cuanto al suelo, se sugiere humus de lombriz de tierra a una tasa de 15 - 30 t/ha/año, según las recomendaciones de Manco (2008).

Para controlar el desarrollo de malezas en el cultivo, se lleva a cabo un deshierbo manual utilizando lampa machete. La poda se ejecuta con el propósito de implementar un adecuado uso del cultivo, con miras a aumentar el rendimiento y agilizar la cosecha. En el caso de la siembra directa, la cosecha se realiza aproximadamente entre 6 y 7,5 meses después de la siembra (Manco, 2008).

2.3 MICORRIZAS

Las micorrizas representan una simbiosis esencial entre las raíces de la flora terrestre y los hongos. Esta asociación desempeña un papel crítico en la consecución ecológica de la gran representación de las plantas en nuestro planeta (Parniske, 2008).

2.3.1 Origen de las micorrizas

Debido a su importancia en los ecosistemas antiguos y actuales, la evolución de las micorrizas se ha explorado en varias revisiones basadas en datos de estudios de paleontología genómica y filogenómica, así como en la diversidad de plantas y hongos con el objetivo final de descifrar el origen de su éxito ecológico generalizado (Tedersoo et al., 2020). Basándonos en las pruebas fósiles y los estudios moleculares, se infiere que la simbiosis micorrícica se estableció hace unos 462-353 millones de años atrás (Camargo & Montaña, 2012).

2.3.2. Clasificación de las micorrizas

La gran mayoría de las plantas terrestres establecen simbiosis micorrícica, lo que sugiere que las especies restantes probablemente descienden de plantas micorrizadas que han perdido

esta característica en etapas posteriores (Ordoñez, 2015). La mayoría de las aproximadamente 5000 especies de hongos identificadas en las micorrizas pertenecen a la división Basidiomycota, mientras que en casos menos comunes se encuentran miembros de la división Ascomycota. Además, se ha observado que la tercera división, Glomeromycota, establece exclusivamente relaciones micorrícicas, y sus miembros mueren cuando se ven privados de la presencia de raíces (Jara, 2019, Chahal et al., 2022).

Se identifican tres grupos de micorrizas según su grado de intercomunicación con las células de la raíz: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectomicorrizas (Smith & Read, 2008, Sharma & Gupta, 2014).

2.3.2.1 Ectomicorrizas y ectendomicorrizas

Las ectomicorrizas representan un tipo de simbiosis micorrícica en la cual las hifas fúngicas no invaden las células de la raíz, sino que se desarrollan en el espacio intercelular o en la cutícula creando la red de Hartig (Farid, 2021). Asimismo, generan una manta micelial alrededor de la raíz llamada vaina (Vanegas et al., 2019). Estas micorrizas son ampliamente observadas en árboles forestales, siendo presentes en sólo el 3% de las plantas vasculares (Massone et al., 2023). En este tipo de micorrizas se pueden encontrar dos subtipos: arbustoide, que se encuentran en ciertos géneros como *Arbutus*, *Pyrola* y *Arctostaphylos*, y monotropoide, que se encuentra en Monotropaceae (Rodríguez, 2020). Las ectendomicorrizas se caracterizan por tener una capa externa similar a las ectomicorrizas, pero también exhiben la habilidad de invadir el interior de las células, al igual que ocurre con las endomicorrizas. A diferencia de estas últimas, no forman vesículas ni arbusculos (Abarca, 2021). Estas micorrizas se pueden encontrar tanto en hongos Basidiomycota como en Ascomycota y se presentan en mayor cantidad en plantas angiospermas que en gimnospermas. Además, se consideran poco específicas en cuanto a las especies de plantas con las que forman esta simbiosis (Roncal, 2023).

2.3.2.2 Endomicorrizas

Son las más comunes en el ambiente y tienen la peculiaridad de invadir las células de las raíces mediante las hifas fúngicas, sin el desarrollo de un manto. Se dividen en tres tipos según las plantas con las que se asocian: orquidioides, que se encuentran en las Orchidaceae; ericoides, que se encuentran en las Empetraceae, Epacridaceae y Ericaceae; y vesículo-arbusculares o arbusculares (Andrade et al., 2010; Sánchez, 2009).

2.3.3 Hongos micorrícicos arbusculares

La simbiosis de los HMA es ampliamente distribuida en nuestro planeta tanto en entornos agrícolas como en ecosistemas naturales (Huerta, 2019). Según se ha demostrado, que desde 400 millones de años antes los HMA fueron las formadoras primigenias de las simbiosis con las plantas originarias (Selosse et al., 2015).

Los HMA forman diferentes estructuras en arbusculos y vesículas en las células corticales del bulbo, cuya estructura puede ser variable entre especies de hongos. Los arbusculos permiten el intercambio nutricional entre las plantas y los hongos, mientras tanto las vesículas almacenan carbono. Además, los HMA pueden formar hifas extrarradiculares, esporas y células auxiliares en algunas familias, lo que incrementa la facultad de asimilación de las raíces (Chinchay, 2016).

Los HMA han establecido asociaciones simbióticas con las raíces en el 90% de las especies de plantas, abarcando incluso cultivos de gran relevancia como leguminosas, cereales y miembros pertenecientes a la familia Solanaceae (Floc'h et al., 2022). Estos vínculos se establecen a través de una serie de procesos biológicos, generando efectos beneficiosos tanto en el ecosistema natural como en la agricultura. Esta relación mutualista ejerce un papel crucial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Van der Heijden et al., 2015).

Una extensa red micelial de hongos se desarrolla bajo las raíces de la planta, lo cual beneficia la absorción de nutrientes que, de otra manera, no estarían accesibles. El micelio fúngico coloniza las raíces de muchas plantas, incluso si pertenecen a diferentes especies, lo que da como resultado una red micorrícica común (CMN). CMN es reconocida como un elemento esencial del ecosistema terrestre, ejerciendo efectos significativos en diversas comunidades vegetales, especialmente en plantas invasoras y en nitrógeno (N) y el transporte de fósforo (P) facilitado por hongos hacia las plantas (Pringle et al., 2009). Asimismo, se observa el transporte de nutrientes esenciales de los hongos hacia la planta, junto con otros efectos conexos, lo que posiblemente contribuye a mejorar la capacidad de las plantas para tolerar factores bióticos y abióticos (Plassard & Dell, 2010). Demuestran la habilidad para enriquecer las características del suelo y, por ende, estimular el crecimiento vegetal en circunstancias estándar y estresantes (Hijri, 2016).

2.3.3.1 Asociación simbiótica de los HMA con plantas

Para establecer una simbiosis entre las plantas y los HMA, se necesitan diversos procesos de reconocimiento que se fundamentan en la comunicación de señales particulares entre ambas entidades biológicas. La planta inicialmente emite una señal a través de los exudados de sus raíces, los cuales son liberados en respuesta a la escasez de nutrientes esenciales como el fósforo. Estos exudados promueven una alta actividad mitocondrial y aumento de la respiración en los hongos, lo que a su vez provoca la formación de ramificaciones de hifas con alta energía (Camarena, 2012).

Como consecuencia, esta señalización activa procesos en las raíces que desencadenan la expresión de genes específicos, cambios organizativos en las células y el desarrollo del aparato de prepenetración (Harrison, 2012). Este proceso de señalización se repite en las células de la epidermis, actuando como guía para la colonización de las hifas hacia las células corticales, donde se inicia la constitución del arbusculo (Hogema & Küster, 2013).

Al adentrarse la hifa en las células corticales, la membrana plasmática de la planta experimenta una modificación y se desarrolla en una región particular donde se produce el intercambio nutricional entre la planta y el hongo (Ortiz et al., 2015).

Es fundamental resaltar que para que la micorrización arbuscular alcance el éxito, es imperativo disminuir la reacción defensiva de la planta. Esto se obtiene a través de la descomposición de los elicitores exógenos, la supresión de los elicitores endógenos y la implementación de otras estrategias (García & Ocampo, 2002).

2.3.3.2 Importancia de los HMA en la agricultura

Los HMA desempeñan un papel crucial al aumentar la superficie de absorción radicular, mejorando así la eficiencia de la captación nutricional. Además, estos organismos contribuyen a la mejora de la estructura edáfica (Morell & Hernández, 2009) y proporcionan a la planta un mecanismo de protección y mayor tolerancia frente a situaciones de estrés abiótico y biótico (Garzón, 2015). Estos factores ejercen un efecto beneficioso en el desarrollo y rendimiento de las plantas (Falcón et al., 2013).

La mayoría de los cultivos agrícolas son hospedadores de HMA y, por lo tanto, pueden beneficiarse potencialmente de la inoculación con HMA. De hecho, muchos estudios han demostrado que la aplicación de inóculo comercial de HMA beneficia a los cultivos en

condiciones agrícolas (Weber, 2014). Diversas investigaciones han comprobado que los HMA pueden potenciar la vitalidad y la productividad vegetal (Hijri, 2016). Estos hongos desempeñan un papel fundamental en la nutrición vegetal al absorber y transportar nutrientes minerales más allá de las áreas de agotamiento en la rizosfera de las plantas, provocando cambios en el metabolismo secundario que mejoran los valores nutraceuticos. Además, los HMA intervienen en el equilibrio de las fitohormonas de las plantas hospedantes, influyendo en su desarrollo como biorreguladores y aumentando la tolerancia al estrés del suelo y el ambiente como bioprotectores (Rouphael et al., 2015). Un aspecto importante de esto es la promoción del desarrollo del sistema de raíces (Gutjahr & Paszkowski, 2013)

2.3.3.3 Diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares

Los HMA se encuadran en el filo Glomeromycota, conformado por 9 familias (Archaesporaceae, Geosiphonaceae, Paraglomeraceae, Diversisporaceae, Pacisporaceae, Entrophoraceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae) clasificadas en 4 órdenes (Archaeosporales, Paraglomerales, Diversisporales, Glomerales) (Schüßler et al., 2001).

La diversidad en HMA se ha investigado extensamente en diferentes ecosistemas y tipos de suelo (Espitia & Perez, 2016). Se ha descubierto que la composición de especies de HMA varía según las condiciones ambientales, como el tipo de suelo, la vegetación circundante y el uso de la tierra (Pérez et al., 2012). Además, se ha observado una alta especificidad de hospedero en las interacciones entre los HMA y las plantas, lo que significa que ciertas especies de HMA tienden a asociarse con ciertas especies de plantas (Lugo, 2021).

2.3.3.4 Técnicas moleculares para investigar la diversidad de los HMA

Históricamente, la taxonomía de los HMA ha sido abordada mediante el análisis de la estructura y morfometría de sus esporas. Sin embargo, este enfoque puede no ser completamente preciso, ya que algunos HMA pueden presentar variaciones en la forma de sus esporas, influenciados por factores ambientales o su ausencia temporal o permanente (Dorantes et al., 2012).

Por consiguiente, se han utilizado técnicas de identificación molecular basadas principalmente en la técnica de PCR y el análisis de secuencias de ADN para realizar investigaciones sobre la diversidad de los HMA. Las investigaciones se han enfocado en diferentes aspectos, como la ubicación geográfica (Rodríguez et al., 2017; Sánchez, 2009),

las plantas huéspedes (Rivera et al., 2016), y el momento de recolección de las muestras (Varela et al., 2016), entre otros.

El ADNr (ácido ribonucleico ribosomal) es un marcador fundamental para el estudio de los HMA. El ADNr se ha utilizado ampliamente en estudios de filogenia y ecología de los HMA, ya que ayuda a identificar y clasificar diferentes especies de hongos HMA y a entender su evolución (Maeda et al., 2017).

Se pueden encontrar en los genes de ADNr ciertas regiones que son conservadas y que facilitan el diseño de cebadores para su uso en técnicas de identificación de especies. Entre estas regiones se encuentran la región 18S o subunidad pequeña (SSU), la región 5.8S y la región 28S o subunidad grande (LSU). Además, se encuentran regiones intergénicas variables y con polimorfismo en longitud, tales como los espaciadores transcritos internos ITS1 y ITS2, que se localizan entre las áreas previamente mencionadas. La elección de estas regiones para su uso en identificación de especies puede variar según la capacidad para distinguir las especies de interés y la base de datos disponible. Estos conceptos han sido mencionados en publicaciones de autores como M. Krüger et al., (2009) y Kohout et al., (2014).

Es importante elegir cuidadosamente las regiones del ADNr a utilizar, ya que se pueden emplear individualmente o en conjunto, y su capacidad para distinguir los HMA y los datos disponibles pueden variar significativamente (Kohout et al., 2014; M. Krüger et al., 2009).

Se ha utilizado ampliamente la técnica de TRFLP para evaluar la diversidad de los microorganismos de un ecosistema en particular. Esta metodología se fundamenta en la amplificación de genes codificantes del ADN ribosómico, utilizando cebadores marcados con moléculas fluorescentes, y en la subsiguiente digestión de los fragmentos generados con enzimas de restricción específicas. De esta manera, se obtienen diferentes patrones de fragmentos que pueden ser utilizados para crear una huella genética única para cada muestra. El tamaño de los fragmentos terminales de restricción varía debido a las diferencias en la secuencia de los sitios de corte de las enzimas de restricción elegidas (Dickie & FitzJohn, 2007; Mummey & Rillig, 2007). Tras la digestión con enzimas de restricción, los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN que emplea un sensor de fluorescencia para determinar las longitudes de los distintos fragmentos finales (Van Geel et al., 2016)

Para la caracterización de la diversidad de HMA en las raíces, se ha desarrollado la técnica PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), demostrado como un método adecuado para la cuantificación específica de taxones HMA en las raíces (Ferrol & Lanfranco, 2020).

Se ha descubierto que en ciertas especies de HMA, existen polimorfismos intracelulares en el ADNr (ITS), lo que significa que hay variaciones en las secuencias de ADNr entre diferentes copias dentro de una misma célula o genoma. Es por ello que la heterogeneidad del ADNr podría tener un impacto significativo en la comprensión de la heterogeneidad de especies de HMA, la identificación de taxones y la evolución de estos hongos simbioses (Maeda et al., 2017).

Las técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS), como la secuenciación de Illumina, han tenido un impacto significativo en los estudios de ecología microbiana (Igiehon & Babalola, 2017). Esta tecnología ha transformado de manera integral el conocimiento acerca de la diversidad y la distribución espacial de las poblaciones microbianas, las cuales eran previamente inaccesibles mediante enfoques basados en huellas genéticas, bibliotecas de clones o cultivos microbianos (Metzker, 2010). concluye que estas metodologías son valiosas para obtener una comprensión más precisa de la composición y la variedad de comunidades de HMA que habitan en el ambiente edáfico (Cui et al., 2016).

Se ha demostrado que diversos microorganismos viven en la superficie y dentro de su micelio, lo que da como resultado un metagenoma cuando se obtienen datos de secuenciación del genoma completo (WGS) a partir de la secuenciación de HMA cultivados in vivo. El metagenoma contiene no sólo las secuencias de HMA, sino también las de los microorganismos asociados (Kang et al., 2020).

Para un análisis taxonómico de los datos obtenidos mediante secuenciación de genoma completo (WGS) de HMA cultivados in vivo es un desafío debido a la complejidad de estos datos. Los datos de WGS representan un metagenoma complejo que contiene secuencias de microorganismos procarióticos y eucarióticos. Para abordar esta clasificación taxonómica, se utilizan dos enfoques principales: métodos basados en la composición y métodos de búsqueda basados en la similitud (Kang et al., 2020).

2.3.3.5 Estudios de HMA asociados a café y sachá inchi

La detección inicial de HMA en las raíces del café se atribuye a Janse en 1897 (Medina, 2017). Hay estudios que han demostrado el efecto de una asociación simbiótica entre

hongos y raíces de café, en comparación con el grupo de café inoculado con HMA con el grupo no inoculado en *Coffea arabica* (Al-Areqi et al., 2014).

También se registraron estudios en sachá inchi, en la región san Martín, se logró aislar y propagar HMA del tipo *Acaulospora* sp., *Rhizophagus intraradices* y *Acaulospora tuberculata* (Del Águila, 2016). Se han realizado escasos estudios sobre la relación de los HMA con *Plukenetia volubilis* y su diversidad. A pesar de lo anterior, se ha observado en estudios controlados (invernaderos) que ciertos géneros de HMA, como *Paraglomus*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Claroideoglomus* y *Funneliformis*, promueven el crecimiento y mejoran la tolerancia a la sequía en las plántulas de sachá inchi. Este efecto se da a través de cambios en los rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las raíces (Wiriya et al., 2020).

Se han encontrado algunas especies de HMA en suelos rizosféricos de sachá inchi en la selva tropical peruana y en Tailandia, según informes que se basan en la clasificación taxonómica de las esporas (Corazon-Guivin et al., 2019). Sin embargo, aún se desconoce la diversidad y composición de los HMA que se encuentran en las raíces de Sachá Inchi.

III. METODOLOGÍA

3.1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Esta investigación se llevó a cabo en el departamento de San Martín, que se encuentra en la parte nororiental de Perú. San Martín limita con los departamentos de Loreto al este, Amazonas al norte, La Libertad al oeste y Huánuco al sur. La región está ubicada en la selva alta y sus coordenadas son 7°12' de latitud sur y 76°48' de longitud oeste.

La colecta se realizó en 5 localidades de la región San Martín: Lamas, Bellavista, El Dorado y Picota para sacha inchi (Parcelas de 1 año y 2 años) ; y Lamas, El Dorado y Moyobamba para *C. arabica* L. (Parcelas de 1 año, entre 3 y 4 años, y mayores 6 años). La información de las zonas muestreadas se detalla en la Tabla 1 y Figura 1. Por cada parcela se escogieron 3 plantas aleatoriamente que fueron rotuladas.

Tabla 1: Ubicación geográfica de las parcelas de sacha inchi y café muestreadas en la región de San Martín para análisis de diversidad de HMA mediante NGS-Illumina

Región	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)	Cultivo
San Martín	Lamas	Paucarpata	6°26'36"	76°31'39"	462	sacha inchi
San Martín	El Dorado	Cashnahuasi	6°26'52"	76°51'37"	900	sacha inchi
San Martín	Picota	San Antonio	6°59'45"	76°12'33"	250	sacha inchi
San Martín	Bellavista	Nuevo Progreso	7°10'12"	76°18'0"	305	sacha inchi
San Martín	El Dorado	Cashnahuasi	6°26'52"	76°51'37"	900	Café
San Martín	Lamas	El Mirador	6°20'6"	76°30'0"	860	Café
San Martín	Moyobamba	Shuchshuyacu	6°9'23"	76°48'0"	1027	Café

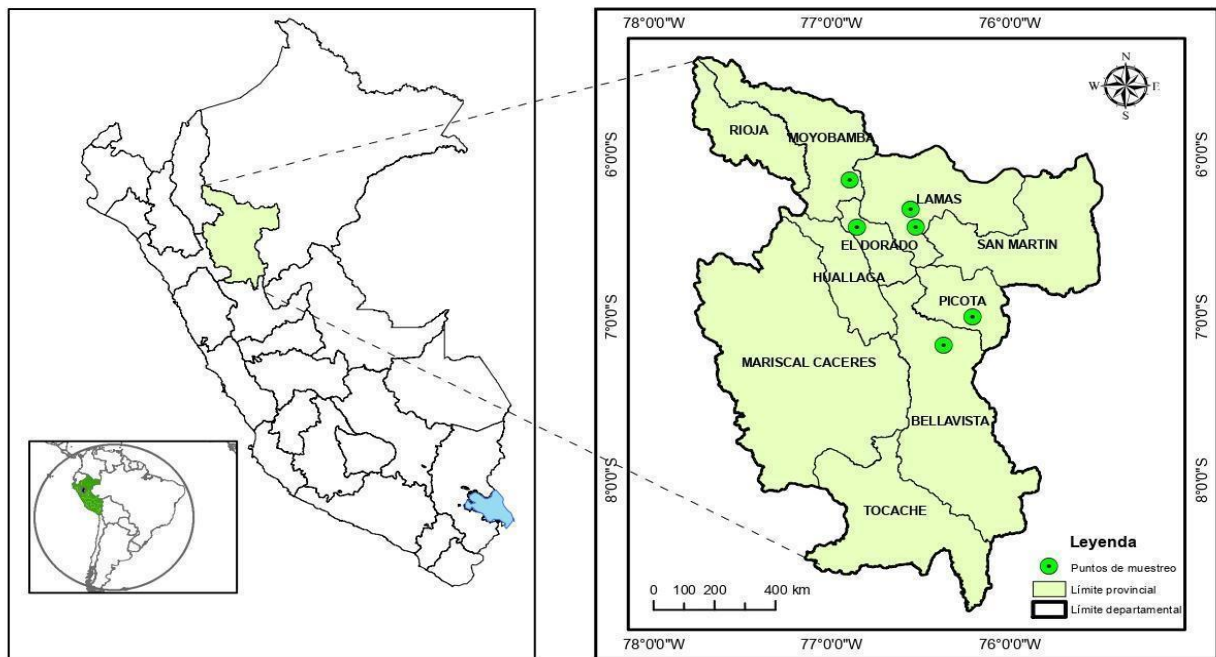


Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de muestreo de HMA en la región San Martín

3.2. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de julio y agosto de 2019, que corresponden a la época seca en la región. Durante los días de muestreo, la temperatura fluctuó entre 19°C y 29°C. Se tomaron muestras de raíces de estas poblaciones. Para cada rango de edad, se eligieron al azar 3 plantas sanas, que fueron debidamente codificadas y georreferenciadas (Anexo 1). En cada una de estas plantas, se realizaron dos sub-muestreos en puntos equidistantes al tallo principal. Con la ayuda de una pala estéril, se extrajo cuidadosamente aproximadamente 20 g de biomasa radicular. Luego, se homogeneizaron las submuestras para obtener una muestra compuesta por planta, obteniendo un total de 51 muestras (Varela et al., 2016).

3.3 PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El tratamiento de las muestras se llevó a cabo en el LBG (Laboratorio de Biología y Genética Molecular) de la Universidad Nacional San Martín. Las raíces delgadas se limpiaron con agua corriente, luego se aclararon con agua destilada y se secaron usando papel toalla. Después, se segmentaron en tramos de 1 a 2 cm. A continuación, se combinaron

las muestras de las cuatro plantas de cada parcela y se uniformaron manualmente. A partir de la muestra extraída de raíces, se realizó un lavado adicional con agua filtrada de membranas de 0.22 μm , se secaron con papel absorbente y se pesaron en alícuotas de 200 mg. Posteriormente se almacenará en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se realice la extracción de ADN.

3.4 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA

3.4.1 Amplificación del marcador molecular por PCR anidada

Se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando un protocolo CTAB modificado de la Sota Ricaldi et al.(2023). Posteriormente se realizó la amplificación del marcador molecular con una PCR anidada. Cada PCR se realizó por triplicado. Para el primer PCR, las mezclas de cebadores SSUmAf y LSUmAr (M. Krüger et al., 2009) fueron utilizados. Estos cebadores específicos de HMA amplificaron un fragmento de aproximadamente 2 kb que cubre una parte del gen SSU rRNA, la región ITS (ITS1–5.8S-ITS2) y una parte del gen de ARNr de LSU. El ADN se amplificó en 15 μl de la mezcla de PCR que contiene 0,5 μl de extracto de ADN, 0,75 pmol de cada cebador y 7,5 μl de KOD- High fidelity DNA polymerase mastermix (Sigma-Aldrich Ipswich, MA, EE. UU.). Las condiciones del ciclo incluyeron la desnaturalización inicial a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ para 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 s, recocido a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 s y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min; una la extensión final se llevará a cabo a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Cada producto de PCR se utilizó como plantilla para una PCR anidada y generar un fragmento de 1500 pb con los primers SSUCmf y LSUmBr (M. Krüger et al., 2009). El ADN se amplificó en 10 μl Mezcla de PCR 0,5 μl de extracto de la 1era PCR, 0,4 μL (0.4 μM) de cada primer, 0,4 μL (0.2mM) de dNTPs, 0.6 μL MgCl (1.5mM), 2 μL de Buffer, 0.05 KOD-High fidelity DNA polymerase mastermix (Sigma-Aldrich Ipswich, MA, EE. UU), y 6.45 μL de H₂O molecular. Las condiciones del ciclo incluyeron la desnaturalización inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, recocido a $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 s y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 min; una la extensión final se llevará a cabo a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Tras completar el PCR, se comprobó la amplificación de los productos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% usando tampón TAE 1X a 100 V y 400 mA durante 40 minutos. Se empleó un marcador de peso molecular ADN Ladder de 1 Kb (Invitrogen TM). El gel se visualizó en un fotodocumentador Cleaver

Scientific con iluminación azul (Anexos 1-7). Cada producto de PCR se utilizó como sustrato para la secuenciación metagenómica dirigida de un fragmento de 450 pb (ADNr LSU-D2 región) con los primers : Forward: LSUD2Af (5'-GTGAAATTGTTRAWARGGAAACG-3') (C. Krüger, 2013), y reverse LSUmBr (M. Krüger et al., 2009). La secuenciación de extremos emparejados (2 × 300 pb) se realizó con un kit de reactivos MiSeq v3 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) en la empresa MR DNA (Molecular Research LP) (<https://www.mrdnalab.com/>).

3.4.2 Análisis bioinformático

Se implementó el programa QIIME2 v.2023 (Bolyen et al., 2019) para los primeros pasos analíticos, que incluyó control de calidad base; eliminación de lecturas quiméricas, y unión de lecturas emparejadas. Se utilizó el flujo de trabajo de DADA2 v.1.18 (Callahan et al., 2016) para procesar los archivos de extremos emparejados FASTQ y crear las variantes de secuencia del amplicón (ASV). El filtrado de calidad, el recorte y la eliminación de ruido de las lecturas directas e inversas se realizaron antes de que se fusionaran en los ASV. Para curar aún más los posibles errores de secuenciación, aplicamos el algoritmo LULU (Frøslev et al., 2017), y para reducir el potencial de ASV falsos, se filtraron todas las secuencias únicas con una abundancia total inferior a 10 lecturas en todas las muestras. La base de datos para la anotación taxonómica se creó con el complemento ReScript de QIIME2 (Robeson et al., 2021) utilizando secuencias publicadas (M. Krüger et al., 2012) y secuencias correspondientes adicionales de especies de HMA recién descritas disponibles en repositorios públicos. Esta asignación taxonómica de secuencias "representativas" (RS) se obtuvo mediante el uso del clasificador integrado Naïve Bayes ajustado en QIIME2, previamente entrenado en la base de datos generada. Las tablas de ASV se filtraron para eliminar los phylum no HMA. Los RS restantes, después del filtrado de calidad, la remoción de quimeras y la eliminación de secuencias no HMA, se utilizaron para análisis posteriores.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los efectos potenciales de la profundidad de muestreo de lectura en los cálculos de diversidad microbiana se evaluaron mediante el examen de las curvas de rarefacción con el paquete iNext (Hsieh et al., 2016) en R versión 4.3.1 (Core team, 2020). Normalizamos los datos enrareciendo las muestras al número de secuencia de la muestra más baja. La

diversidad alfa se determinó mediante los índices: ACE, Chao, Observed ASV, Pielou, Shannon, y Simpson; con el paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2019) en R. Se evaluaron las disparidades entre los conjuntos empleando las pruebas de suma de rangos de Kruskal-Wallis, y se aplicó el método de Holm-Bonferroni para ajustar los valores de p en las pruebas de comparaciones múltiples, todo aquello con el paquete de Microbiotaprocess (Xu et al., 2023) en R. Se llevó a cabo el análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando el índice de disimilitud de Bray-Curtis con el paquete Microbiotaprocess (Xu et al., 2023) para observar las variaciones en la composición de la comunidad entre distintos grupos. Se evaluaron las variaciones en la diversidad beta entre las muestras usando MANOVA permutacional de dos vías (PerMANOVA) con 999 permutaciones en R, utilizando el paquete vegan v2.5-6 (Oksanen et al., 2019). Finalmente, los datos se presentaron gráficamente con la ayuda del paquete ggplot2 v3.2.1 (Wickham, 2011) en R.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Se procesaron un total de 51 muestras para la generación de las bibliotecas, la cuales contemplan dos cultivos (n=2), tiempo de muestreo (n=3 para café, n=2 para sachá inchi) y réplicas (n=3) (Tabla 2). Todas las réplicas de amplicón de PCR de cada una de estas muestras dieron como resultado productos medibles que se agruparon y secuenciaron, tanto para café (Anexos 1,2,3,4) y sachá inchi (Anexos 5,6,7).

Tabla 2: Distribución de las muestras de HMA en las localidades de San Martín.

Muestras	Planta	Provincia	Localidad	Edad de la planta
LP-A2	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Menor a un año
LP-A4	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Menor a un año
LP-A5	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Menor a un año
LP-B4	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Mayor a tres años
LP-B2	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Mayor a tres años
LP-B5	Sacha Inchi	Lamas	Paucarpata	Mayor a tres años
BP-A1	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Menor a un año
BP-A2	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Menor a un año
BP-A3	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Menor a un año
BP-B3	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Mayor a tres años
BP-B4	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Mayor a tres años

Continuación ...

Muestras	Planta	Provincia	Localidad	Edad de la planta
BP-B5	Sacha Inchi	Bellavista	Nuevo Progreso	Mayor a tres años
PS-A1	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Menor a un año
PS-A4	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Menor a un año
PS-A5	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Menor a un año
PS-B1	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Mayor a tres años
PS-B2	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Mayor a tres años
PS-B3	Sacha Inchi	Picota	San Antonio	Mayor a tres años
DC-A2	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DC-A3	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DC-A4	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DC-B1	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a tres años
DC-B2	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a tres años
DC-B3	Sacha Inchi	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a tres años
MS-A1	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Menor a un año
MS-A2	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Menor a un año
MS-A3	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Menor a un año
MS-B1	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Entre 3 a 4 años
MS-B2	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Entre 3 a 4 años
MS-B3	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Entre 3 a 4 años
MS-C1	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Mayor a 6 años
MS-C2	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Mayor a 6 años
MS-C4	Café	Moyobamba	Shucshuyacu	Mayor a 6 años

Continuación ...

Muestras	Planta	Provincia	Localidad	Edad de la planta
LM-A2	Café	Lamas	Mirador	Menor a un año
LM-A3	Café	Lamas	Mirador	Menor a un año
LM-A4	Café	Lamas	Mirador	Menor a un año
LM-B1	Café	Lamas	Mirador	Entre 3 a 4 años
LM-B4	Café	Lamas	Mirador	Entre 3 a 4 años
LM-B5	Café	Lamas	Mirador	Entre 3 a 4 años
LM-C3	Café	Lamas	Mirador	Mayor a 6 años
LM-C4	Café	Lamas	Mirador	Mayor a 6 años
LM-C5	Café	Lamas	Mirador	Mayor a 6 años
DH-A1	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DH-A2	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DH-A3	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Menor a un año
DH-B1	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Entre 3 a 4 años
DH-B2	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Entre 3 a 4 años
DH-B3	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Entre 3 a 4 años
DH-C2	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a 6 años
DH-C3	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a 6 años
DH-C5	Café	El Dorado	Cashnahuasi	Mayor a 6 años

Se filtraron con éxito las secuencias quiméricas y no HMA. Se generaron un total de 1066200 ASV, con un promedio de 20905 por muestra (Tabla 3). La mínima cantidad de secuencias fue de 2269 para la muestra LM-B1, y la máxima cantidad para la muestra DH-C2 con 62494 secuencias (Tabla 3).

En la figura 2 se observa el agrupamiento de las muestras por tipo de planta (café y Sacha Inchi), y esta agrupación es estadísticamente significativa por el análisis permanova (p -value=0.0001) (Tabla 4). El grupo de las HMA asociadas a café es más heterogéneo a comparación del grupo de HMA asociadas a las plantas de sachá inchi.

Las gráficas de rarefacción de las muestras indicaron que las bibliotecas analizadas presentaban una cercana o completa saturación de especies de HMA asociadas a café, lo que sugiere una amplia diversidad de HMA en todas las muestras (Figura 3).

En la figura 4, los índices de alfa diversidad (ACE y Shannon) disminuyen significativamente con la edad, especialmente al comparar rangos de 3 a 4 años con aquellos mayores de 6 años. Este patrón también se observa en los indicadores (ACE, Pielou, Shannon, Simpson) al evaluar el grupo menos de un año y el grupo más de 6 años. Además, se observan mayores niveles de diversidad en el rango entre 3 a 4 años a comparación de los otros grupos de edades.

En la figura 5, se observan los índices de alfa diversidad agrupados por las tres localidades distintas. Se evidencian diferencias significativas entre las localidades de Mirador y Shucshuyacu en los índices de Chao 1 ($p = 0.013$), Observe ($p = 0.015$) y Pielou ($p = 0.024$). No se encontraron diferencias significativas en las demás comparaciones de localidades.

En la figura 6, se aprecia la beta diversidad donde el grupo con edades menores a un año, muestra mayor homogeneidad. En cambio, para los rangos de edades comprendidos entre 3 a 4 años y mayores a 6 años, se observa una mayor variabilidad en la agrupación. El impacto de la edad de las plantaciones se confirma mediante el test estadístico PERMANOVA, evidenciando la significancia de estas variables (Tabla 5).

Tabla 3: Resultados de la generación de ASV, de remoción de quimeras y secuencias no HMA provenientes de muestras de café y sachá inchi

Muestras	Secuencias	Denoising en		Unidas	No quimeras	Solo HMA	
		Filtradas	Forward				Reverse
BP-A1	42031	30143	29318	29728	19335	10060	9409
BP-A2	62615	48723	47464	48253	34014	19359	17979
BP-A3	50894	38026	36960	37407	21269	12918	12139
BP-B3	104718	79124	77648	78403	58181	18871	17382
BP-B4	51578	39016	37997	38579	26445	14253	12849
BP-B5	83919	62803	61440	62001	40155	16572	14658
DC-A2	30745	23411	22798	23113	16552	12081	11513
DC-A3	87125	65207	63999	64608	46807	27256	25300
DC-A4	62986	47528	46052	47000	27849	16027	14720
DC-B1	73191	54023	52500	53495	35543	22430	20865
DC-B2	40568	30542	29484	30005	19000	12512	11721
DC-B3	36245	21932	21394	21569	13792	9086	8468
DH-A1	63427	43754	43273	43504	38089	25627	25020
DH-A2	54791	41957	41827	41708	39854	36409	35417

Continuación ...

Muestras	Secuencias	Filtradas	Denoising en		Unidas	No quimericas	Solo HMA
			Forward	Reverse			
DH-A3	87849	72140	71594	71718	60618	26659	25681
DH-B1	28422	21302	21187	21212	20221	15989	15622
DH-B2	105850	86908	86139	86481	75132	41871	40732
DH-B3	57092	47694	42514	47506	28741	16137	15796
DH-C2	149673	113884	113000	113805	110083	61735	62494
DH-C3	86468	72602	72585	72595	70989	57644	54441
DH-C5	40657	33139	33109	32966	32412	27192	24780
LM-A2	58264	48306	48115	48064	41555	20514	20191
LM-A3	63440	52121	51874	51985	46207	24164	23047
LM-A4	25568	20013	19856	19940	15259	9721	7953
LM-B1	107286	18226	18122	18193	16382	15619	2269
LM-B4	41174	33638	33478	33605	32911	24649	23947
LM-B5	102837	75063	74823	74970	72677	62577	40422
LM-C3	59140	46497	46195	46253	41122	31262	30703
LM-C4	85230	62923	62722	62495	60265	42328	38650
LM-C5	46983	36279	35996	36156	33344	23712	23002
LP-A2	66972	49091	48119	48622	36142	14698	12825

Continuación ...

Muestras	Secuencias	Filtradas	Denoising en Forward	Denoising en Reverse	Unidas	No quimericas	Solo HMA
LP-A4	72638	54433	53417	53731	38777	14385	12266
LP-A5	35823	28062	27266	27746	18592	7879	7099
LP-B2	39801	28442	27625	28006	18460	10613	8875
LP-B4	32465	24757	23935	24359	16200	9340	8556
LP-B5	94022	72407	68182	71874	53010	17971	14340
MS-A1	115903	89346	88746	89099	78582	53252	51419
MS-A2	50523	39372	39117	39250	31803	21057	20093
MS-A3	66775	50077	49440	49776	45904	28909	28622
MS-B1	46037	37750	37544	37533	34819	23941	23344
MS-B2	84563	66826	66143	66569	53042	27153	26943
MS-B3	32690	26505	26137	26249	21074	13448	12954
MS-C1	34616	24609	24216	24364	18142	10286	10030
MS-C2	44383	31493	31360	31440	27560	18416	18041
MS-C4	79814	64331	64179	64071	61554	35891	34878
PS-A1	46116	36848	36181	36478	26048	11983	11305
PS-A4	58790	44909	41553	44421	31504	17317	16662

Continuación ...

Muestras	Secuencias	Filtradas	Denoising en Forward	Denoising en Reverse	Unidas	No quimericas	Solo HMA
PS-A5	64638	49961	49016	49279	32124	10599	9729
PS-B1	54809	44007	43426	43557	31270	12340	11613
PS-B2	48275	39049	38246	38495	26536	12166	11011
PS-B3	166624	127746	125676	126644	98698	31000	28425
Total	3327043	2496945	2452987	2478880	1994644	1157878	1066200

Tabla 4: PERMANOVA de las HMA de café y sachá inchi

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Tipo de planta	1	2.8938	0.12994	7.3181	0.0001***
Residual	49	19.3762	0.87006		
Total	50	22.2699	1		

*Nota: (***) indica un valor altamente significativo con p-value <0.001*

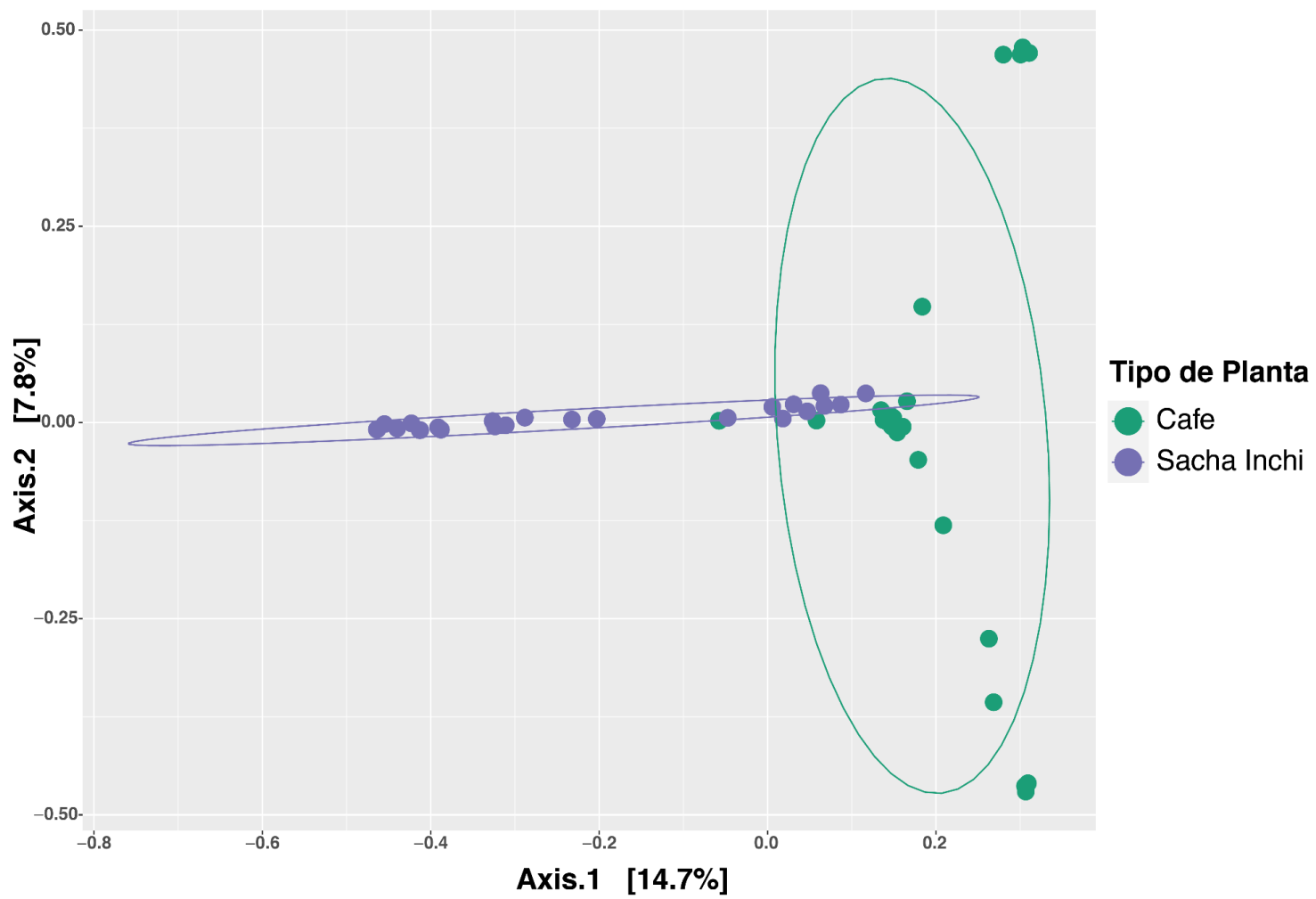


Figura 2. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café y Sacha Inchi.

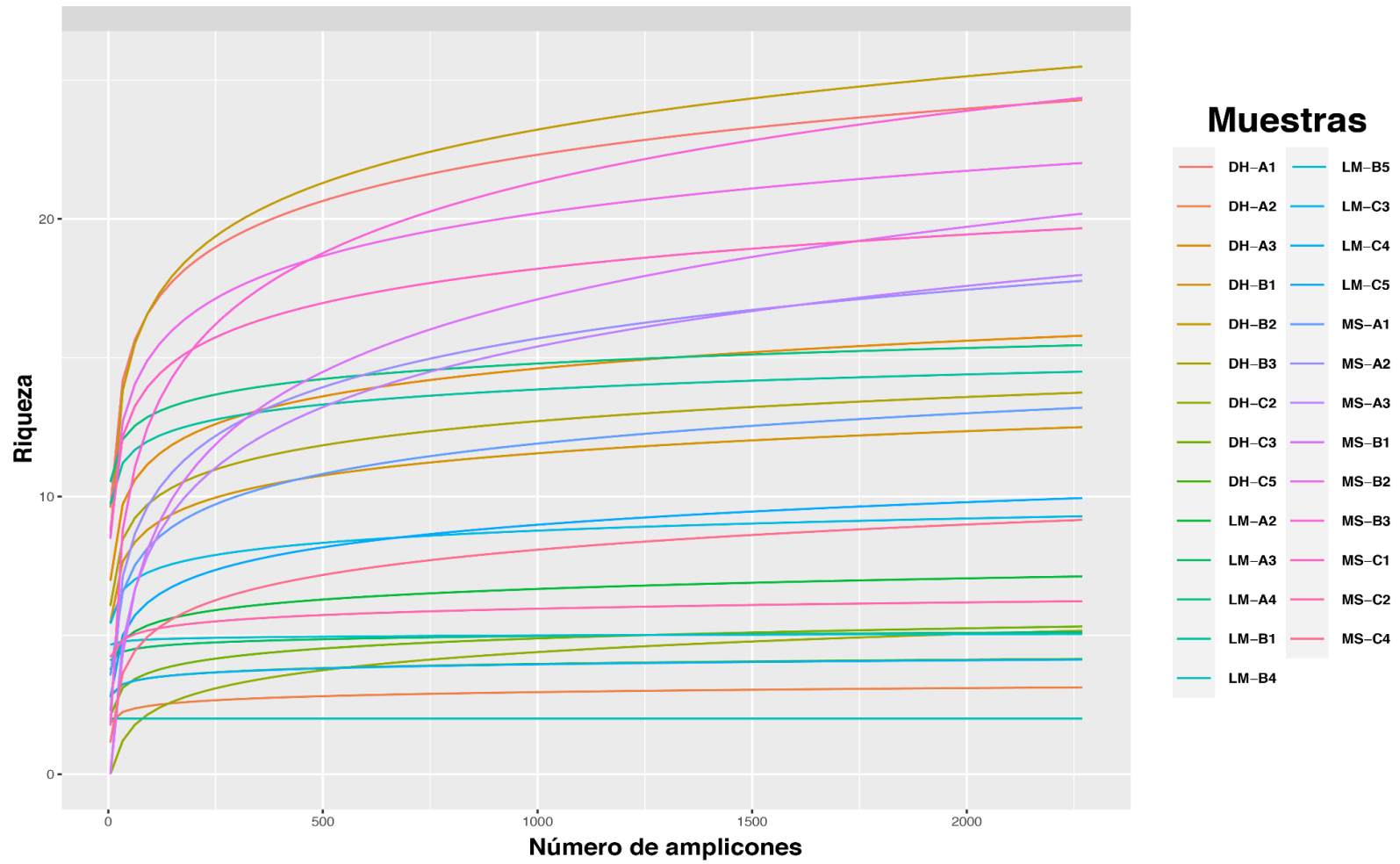


Figura 3. Curvas de rarefacción de las muestras de HMA asociadas a café.

La Figura 7 ilustra la beta diversidad en distintas localidades, evidenciando una mayor homogeneidad en Cashnahuasi y Mirador. Por el contrario, en Shucshuyacu se destaca una variabilidad más pronunciada en la agrupación. Se evidencia una influencia significativa por las localizaciones, lo cual se confirma mediante el análisis estadístico PERMANOVA. El análisis arroja una significancia considerable de esta variable presentando un valor de p de 0.0001 (Tabla 5).

Las gráficas de rarefacción de las muestras indicaron que las bibliotecas analizadas presentaban una cercana o completa saturación de especies de HMA en Sacha Inchi, lo que sugiere una amplia diversidad de HMA en todas las muestras (Figura 8). En la figura 9, se observa los índices de alfa diversidad en dos distintos niveles de edad. Se observa que, en todos los indicadores, no existen diferencias significativas entre los índices de los rangos de edad de menos de un año y más de tres años.

La Figura 10 destaca diferencias significativas en los índices de diversidad entre localidades de plantaciones de Sacha Inchi. Las comparaciones entre las localidades Cashnahuasi y San Antonio mostraron significancia en ACE ($p = 0.0087$) y Chao1 ($p = 0.013$). Entre Cashnahuasi y Paucarpata revelaron índices significativos en ACE, Chao1 y Observe (todos con $p = 0.0043$). Nuevo Progreso y San Antonio exhibieron diferencias en ACE, Chao1, Observe y Shannon. Finalmente, entre Nuevo Progreso y Paucarpata, las diferencias se observaron en ACE, Chao1, Observe y Shannon.

La Figura 11 ilustra la diversidad beta de dos rangos de edades: menores a un año y mayores a tres años. Se percibe una escasa distinción entre ambos grupos, sugiriendo una inclinación hacia la homogeneidad. Esta constatación está sustentada por el análisis PERMANOVA que demuestra la no significancia de la influencia de esta variable con un valor de p de 0.223 (Tabla 6).

La Figura 12 muestra la beta diversidad en cuatro localidades diferentes. Es evidente la variabilidad en las especies de micorrizas entre estas localidades, con Paucarpata destacándose por su notable heterogeneidad, a diferencia de Cashnahuasi, que presenta menor variabilidad. Esta variación en las localidades está respaldada por el test estadístico PERMANOVA, que confirma la significancia de esta variable con un p-value de 0.001 (Tabla 6).

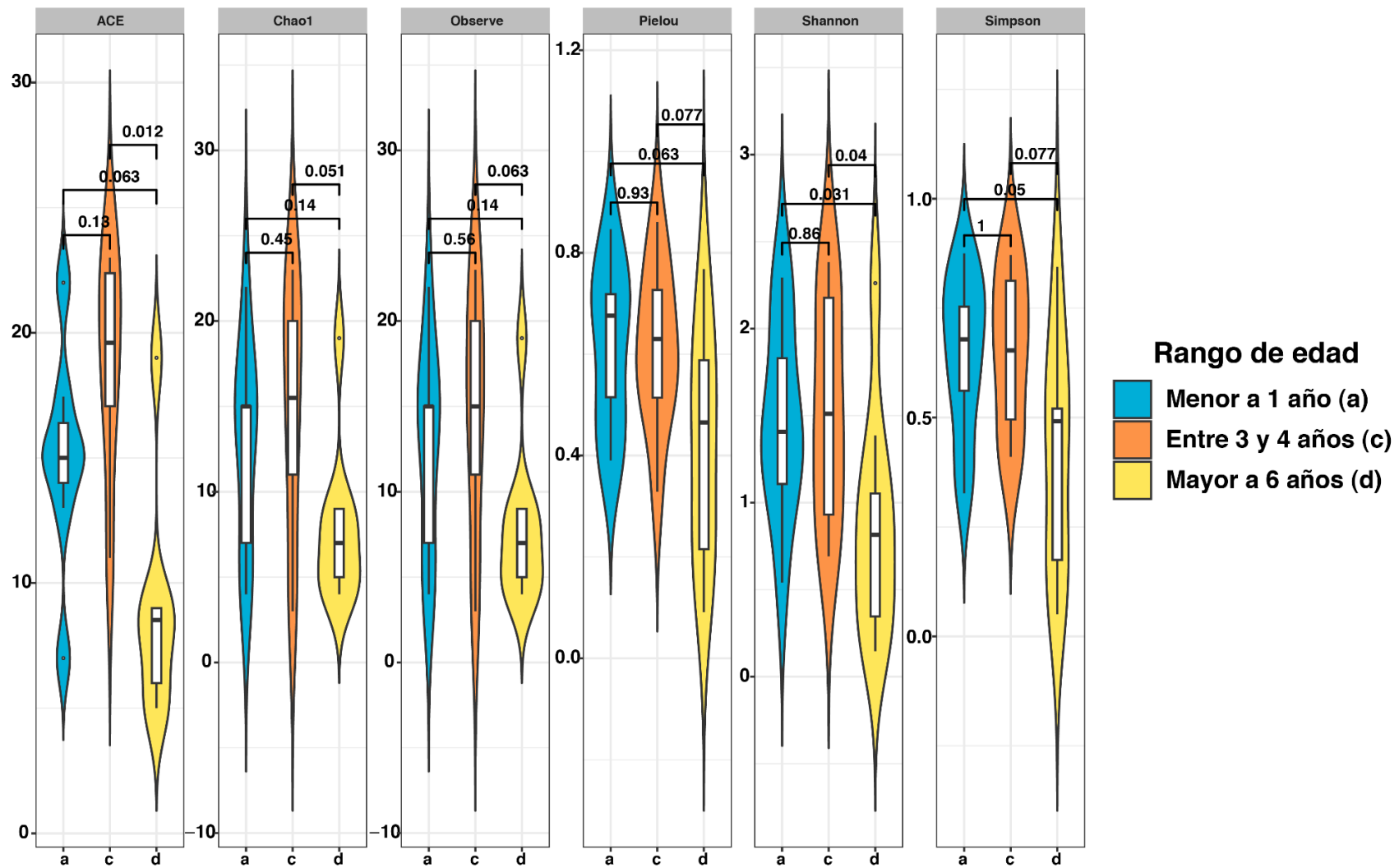


Figura 4. Alfa Diversidad de las muestras de HMA asociadas café con respecto al criterio de rango de edad.

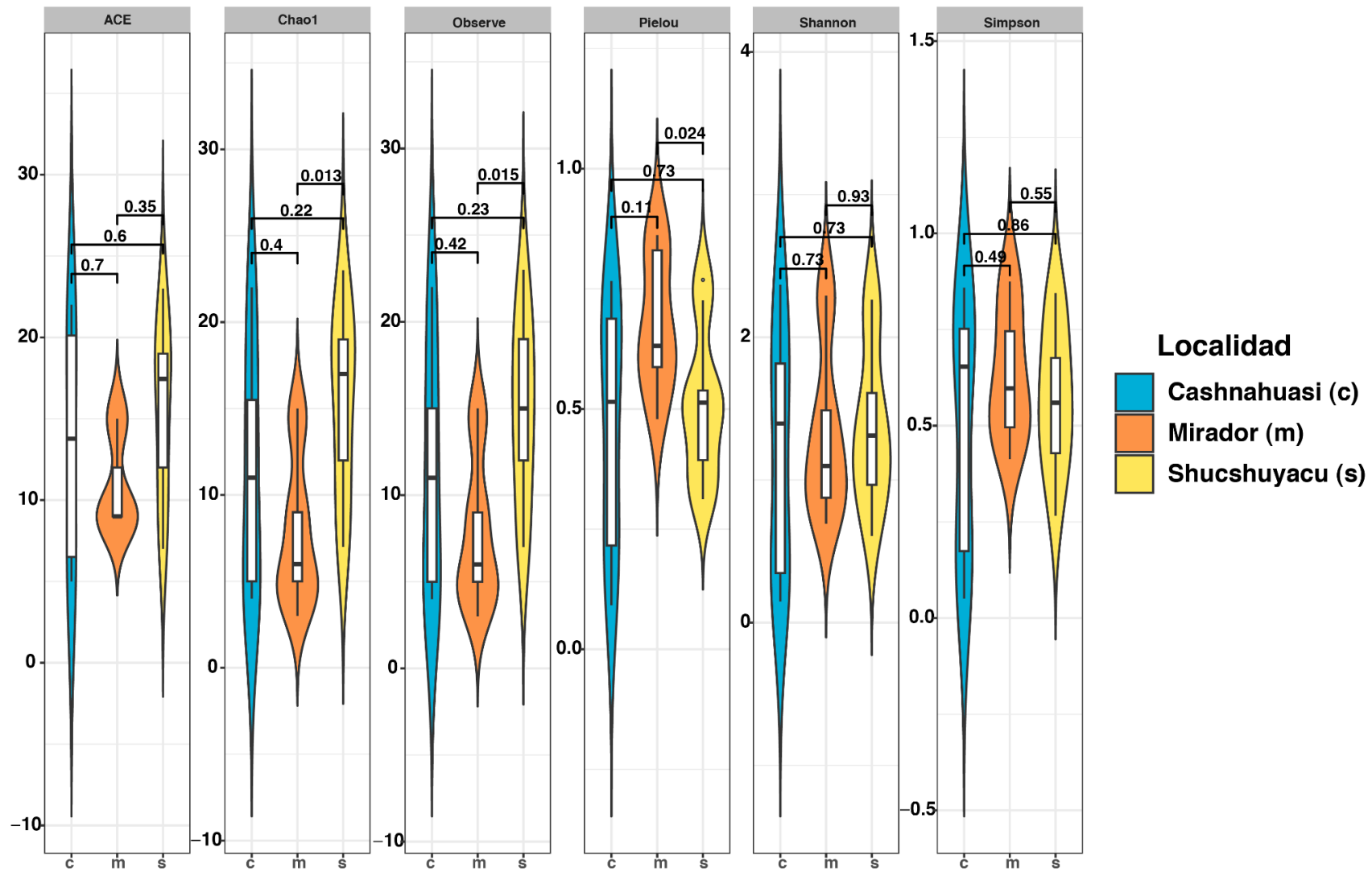


Figura 5. Índices de alfa Diversidad de las muestras de café con respecto a las localidades.

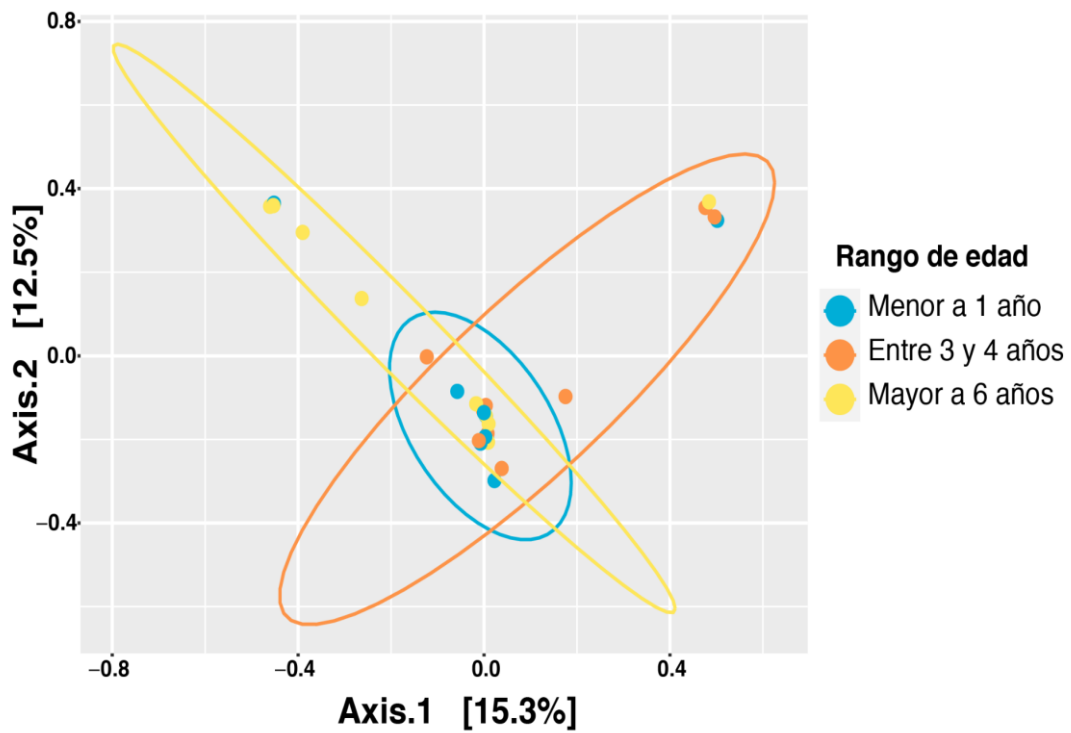


Figura 6. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café mostrando rango de edades.

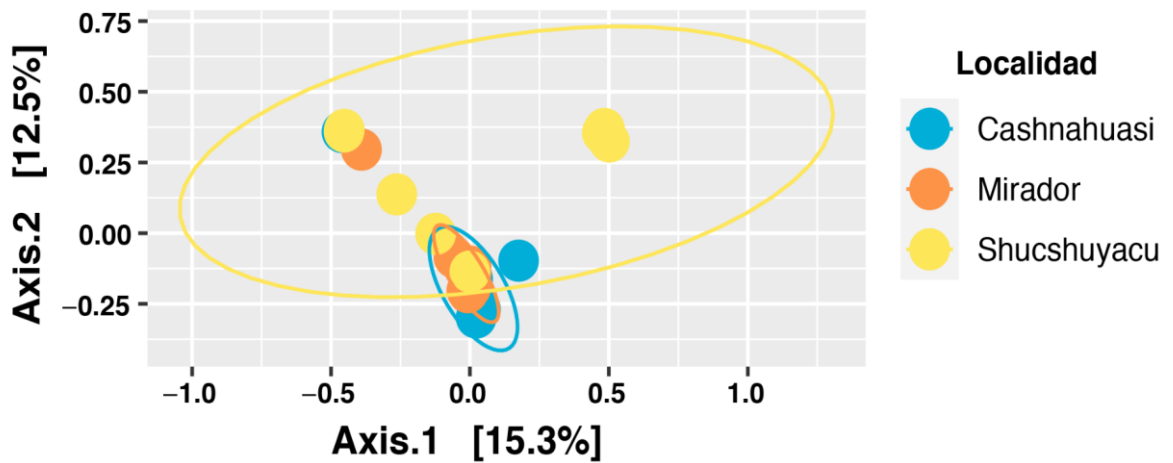


Figura 7. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a café mostrando localidades.

Tabla 5: Two-way PERMANOVA de HMA de café

	Df	SumOfSqs	R2	f	Pr(>F)
Rango de edad	2	1.1235	0.09545	1.4193	0.0489*
Localidad	2	1.9134	0.16256	2.4172	0.0001***
Rango de edad:					
Localidad	4	1.6091	0.13671	1.0164	0.4258
Residual	18	7.1244	0.60528		
Total	26	11.7705	1		

Nota: (***) indica un valor altamente significativo con p -value < 0.001 , (*) con p -value < 0.05

En base a promedios totales sobre la composición taxonómica de las comunidades de HMA asociadas a café, con relación al Orden, se observó en las localidades una predominancia general de Diversisporales (81.60%), seguida por Glomerales (17.82%), y se resalta que esta última fue predominante en las muestras DH-A2, LM-B5, LM-C4, MS-A1 (Anexo 10). En la Figura 13, a nivel de familia, se evidenció una predominancia de Acaulosporaceae (58.24%) en las tres localidades, aunque en la región de Shucshuyacu se destacó también la presencia de Gigasporaceae (20.25%), y esta aparece en menor medidas en las otras localidades. En tercera posición tenemos a la familia Glomeraceae (17.76%), y con gran representación en las muestras DH-A2, LM-B5, LM-C5, y MS-A1. La familia Diversisporaceae (3.10%) también estuvo presente de manera importante en algunas muestras de la localidad de Cashnahuasi. Las otras familias (Claroideoglomeraceae, y Paraglomeraceae) tuvieron una baja representación menor que el 1% total (Figura 13).

El género *Acaulospora* muestra la mayor predominancia (58.97%), seguida por *Dentiscutata* (15.08%), que se presenta con mayor medida en Shucshuyacu, y en menor medida en las otras localidades. Seguidamente tenemos a *Septoglomus* (8.34%), *Rhizophagus* (6.23%) y *Gigaspora* (5.27%), mientras que *Diversispora* (3.40%) solo se observa en Cashnahuasi, pero no en el rango de edad mayor a 6 años (Figura 14).

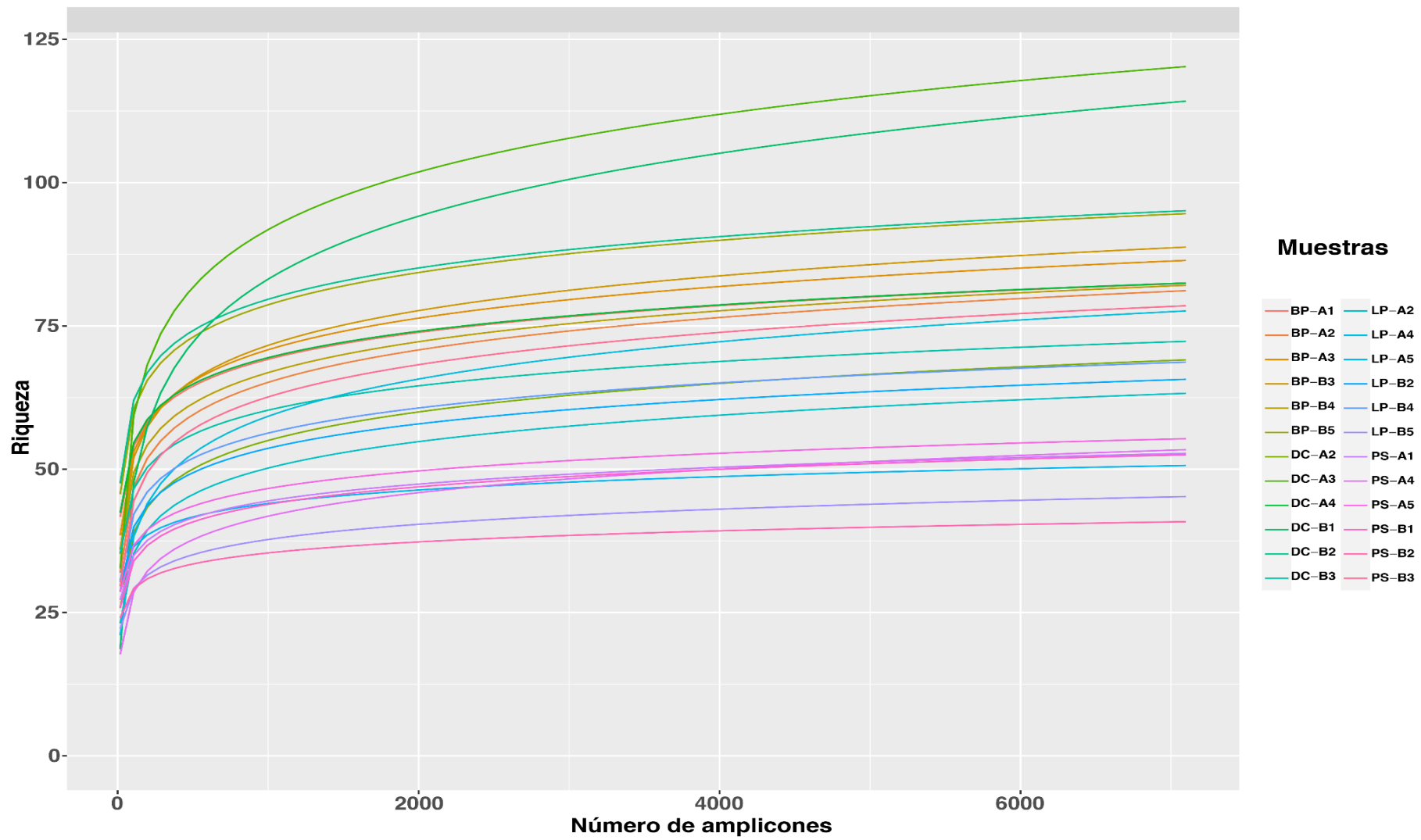


Figura 8. Curvas de rarefacción de las muestras de Sacha Inchi.

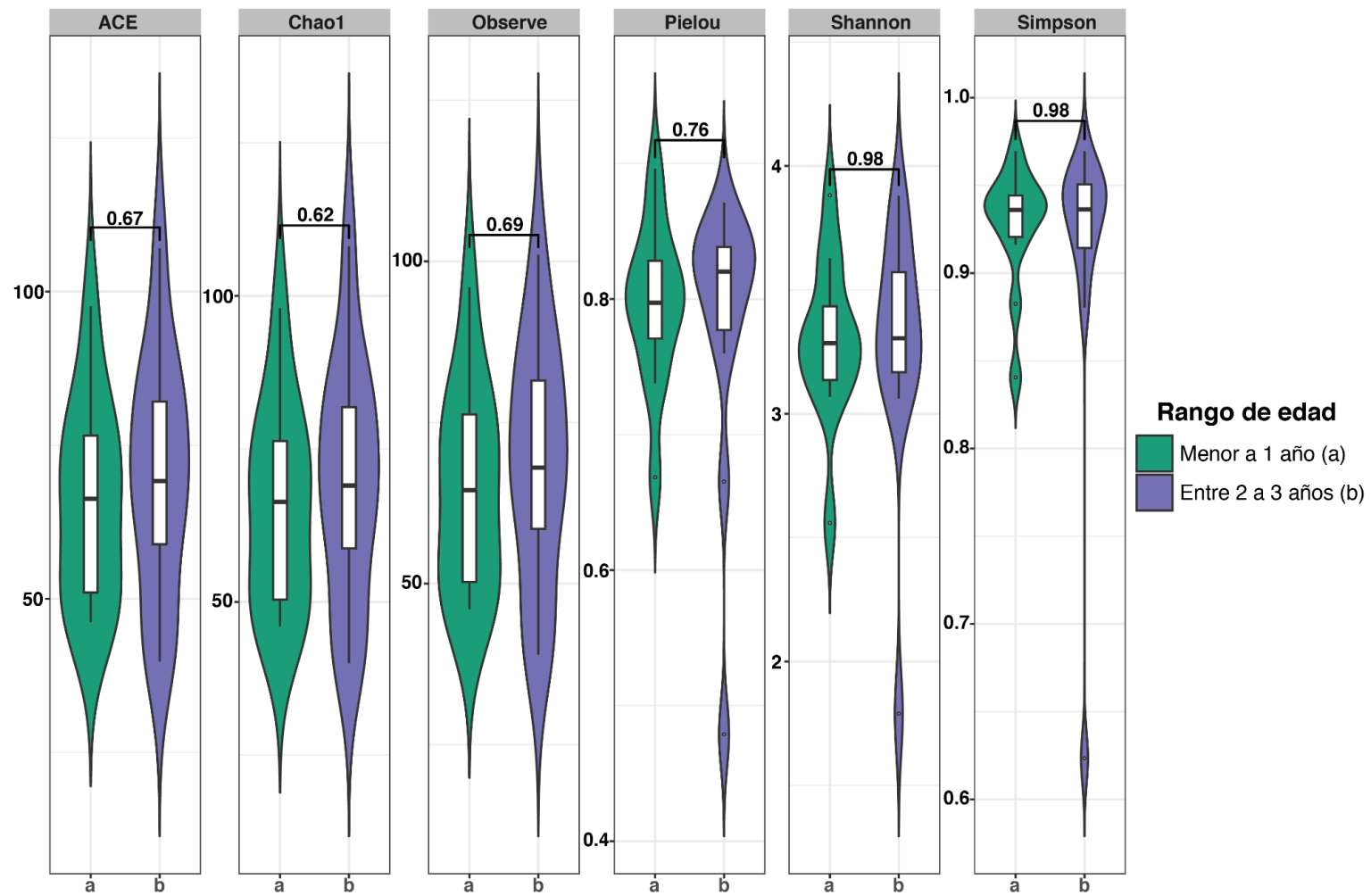


Figura 9. Alfa Diversidad de las muestras de Sacha inchi con respecto al rango de edades. Se muestra el p-value de las comparaciones.

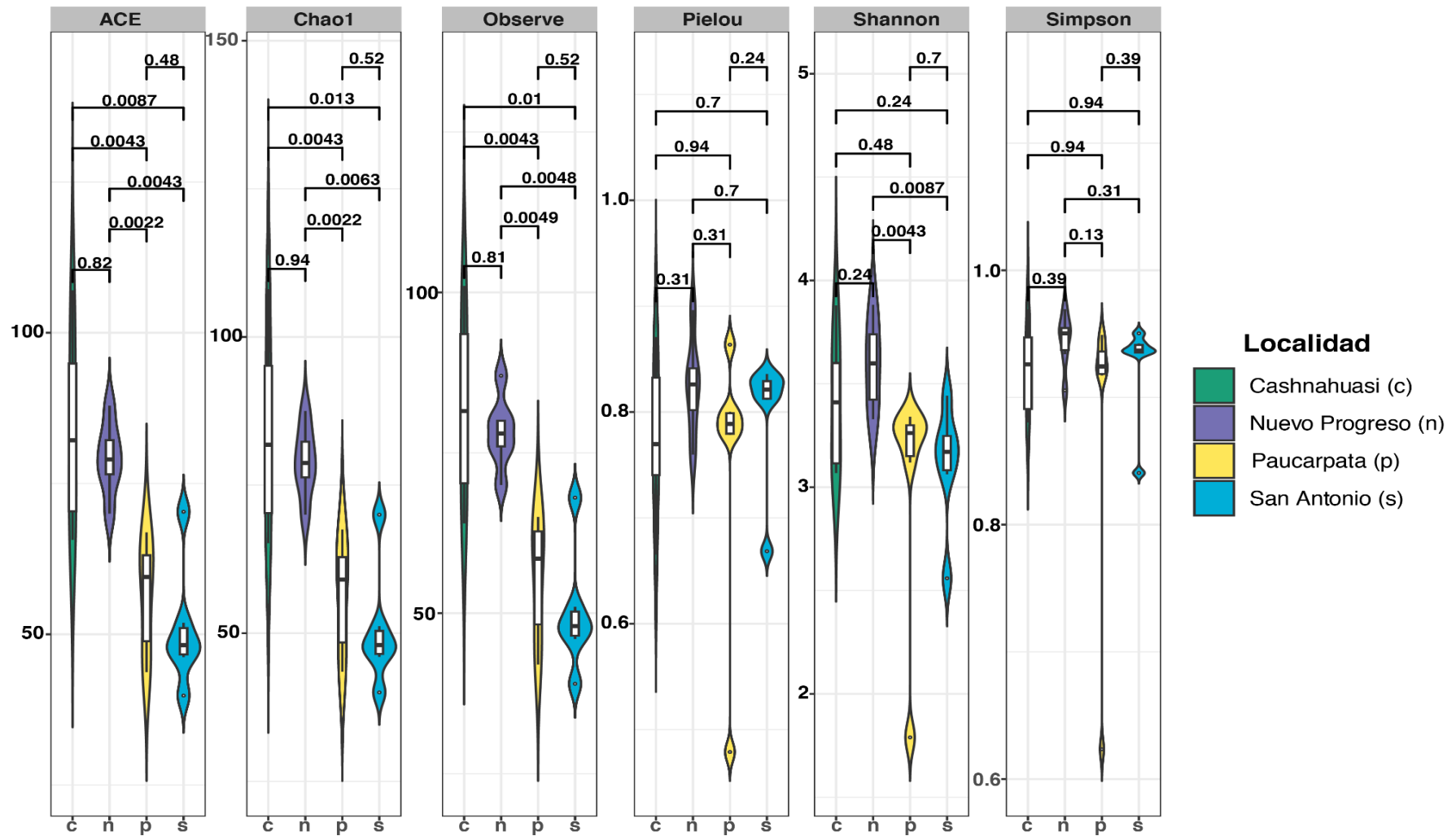


Figura 10. Índices de alfa Diversidad de las muestras de Sacha Inchi con respecto a las distintas localidades estudiadas. Se muestra el p-value de las comparaciones

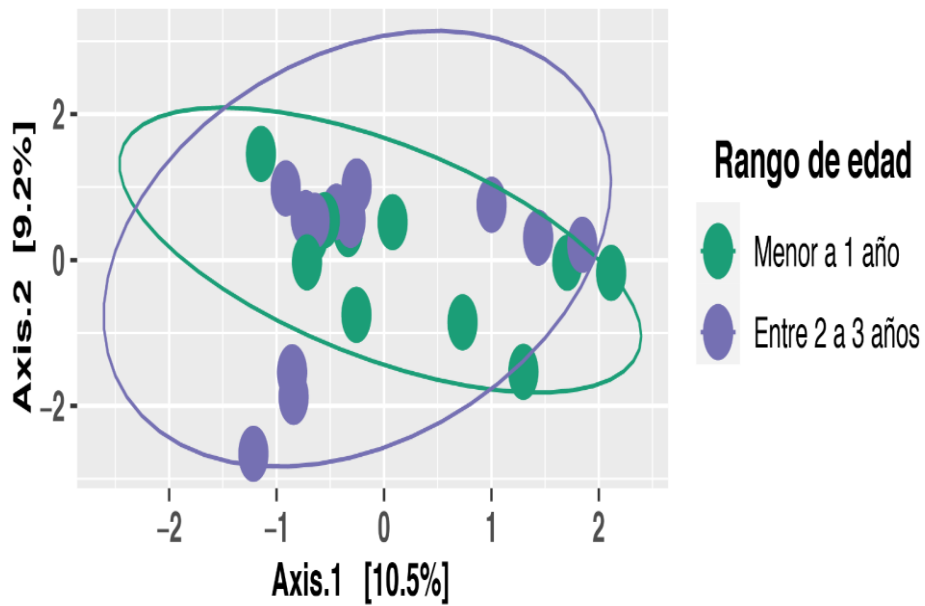


Figura 11. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a Sacha Inchi mostrando rango de edades.

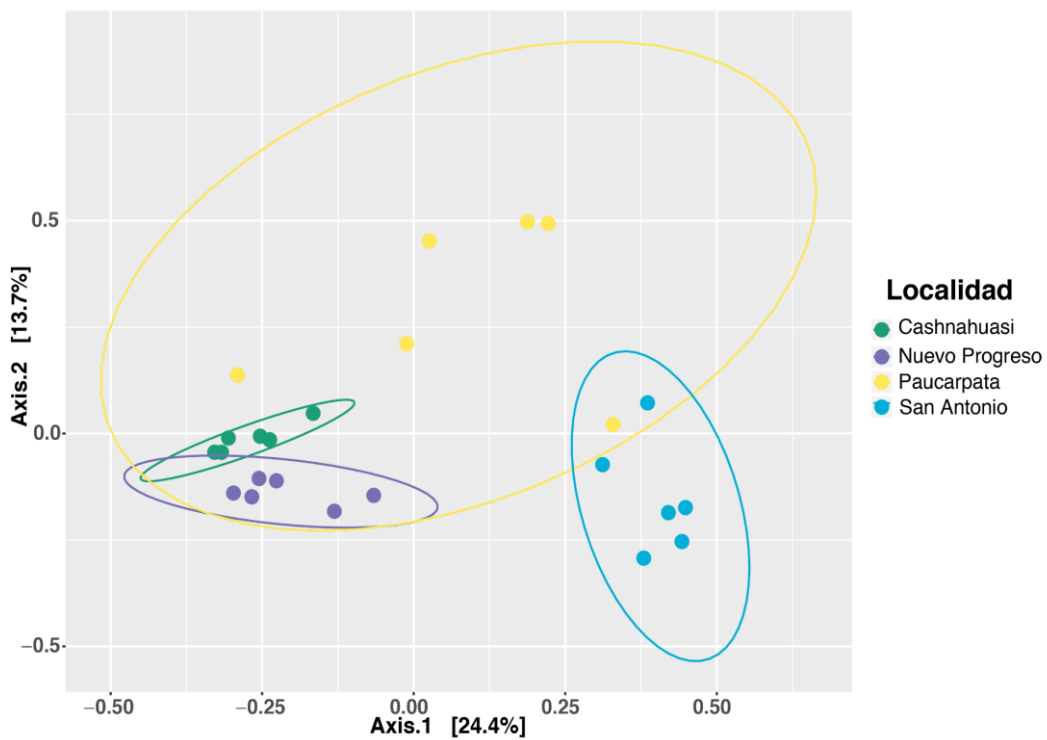


Figura 12. PCoA basado en medidas de disimilitud de Bray curtis en comunidades HMA asociadas a Sacha Inchi mostrando localidades.

Tabla 6: Two-way PERMANOVA de HMA asociadas a sachá Inchi

	Df	SmOfSqs	R2	F	Pr(>F)
Rango de edad	1	0.2495	0.03383	1.1975	0.223
Localidad	3	3.0072	0.40768	4.8103	0.00099***
Rango de edad:Localidad	3	0.7855	0.10649	1.2565	0.149
Residual	16	3.3341	0.45201		
Total	23	7.3763	1		

Nota: (***) indica un valor altamente significativo con $p\text{-value} < 0.001$

Con respecto a la especies de HMA asociadas a sachá inchi (Anexo 11), se destaca la predominancia de las siguientes especies: *Acaulospora lacunosa* (45.51%), *Dentiscutata heterogoma* (15.88%), *Acaulospora scrobiculata* (9.06%), *Aucaulospora colombiana* (7.09%), *Gigaspora margarita* (6.9%), *Septoglomus viscosum* (4.2%), *Diversispora trimurales* (4.11%), *Acaulospora spinosa* (3.17%), *Diversispora celata* (1.94%).

En las comunidades de HMA asociadas a sachá inchi con relación a promedios totales, se observa una predominancia general de los Órdenes Diversisporales (56.68%) y Glomerales (43.04%) (Anexo 12). En la figura 15, con respecto a la taxonomía en Familia de se denota una predominancia de Glomeraceae (57.46%) en las tres localidades, seguido por Diversisporaceae (28.14%), y Acaulosporaceae (13.86%). Las demás familias obtuvieron un porcentaje menor al 1%.

En cuanto a los géneros (Figura 16), se resalta la predominancia de *Diversispora* (30.11%) en las localidades. Seguidamente se resalta la predominancia de los géneros *Dominikia* (23.14%), *Septoglomus* (19.58%), *Acaulospora* (14.53%), *Rhizophagus* (7.80%), y *Microkamienskia* (3.06%).

En el Anexo 13, se ilustra la distribución taxonómica con respecto a especies en sachá inchi. Presentando una uniformidad en todas las localidades, no hay mucha variación entre sí. Las especies más importantes son: *Diversispora trimurales* (24.68%), *Septoglomus viscosum* (20.37%), *Dominikia disticha* (15.67%), *Acaulospora scrobiculata* (7.57%), *Acaulospora kentinensis* (6.61%), *Microkamienskia peruviana* (5.36%).

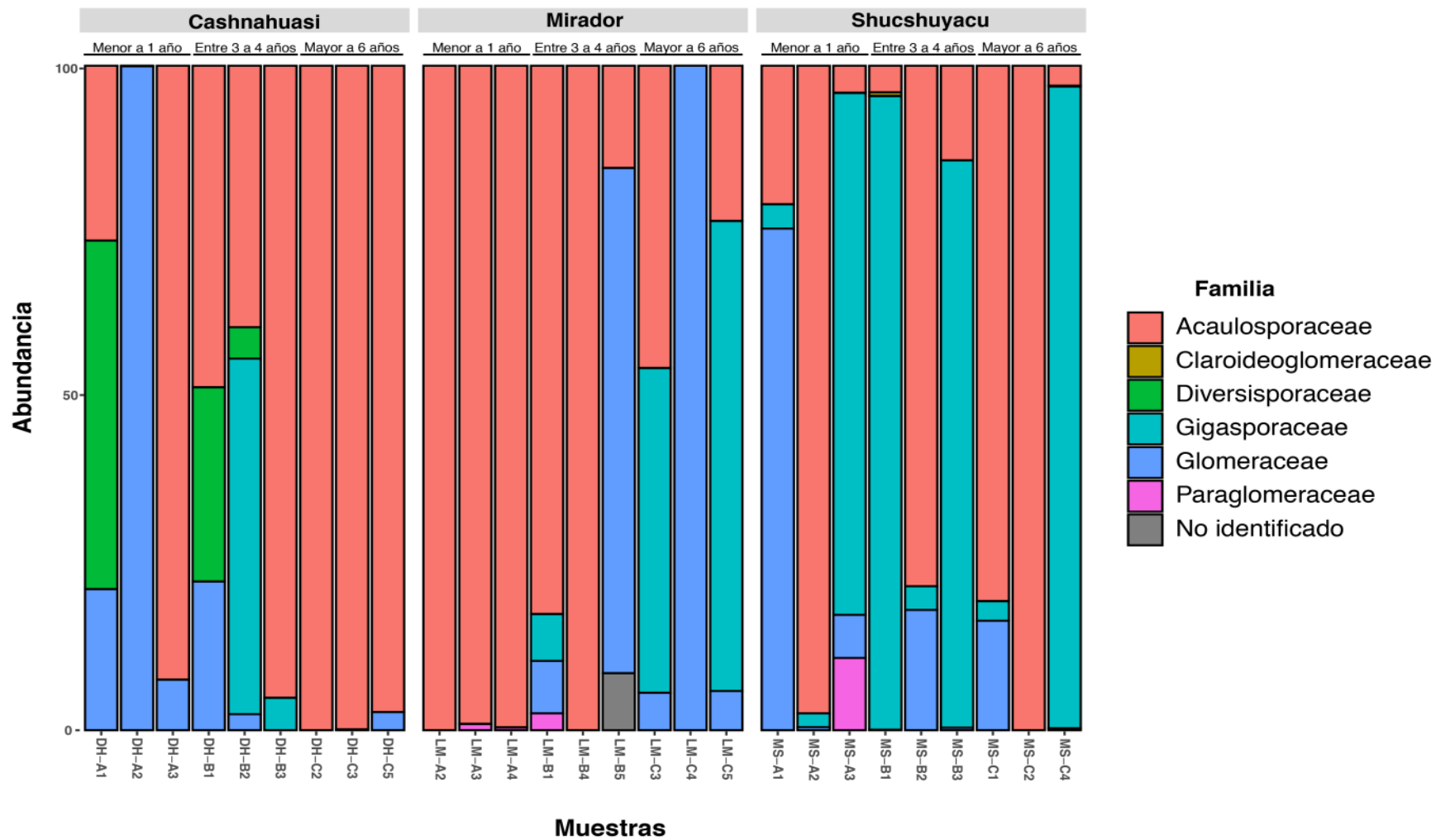


Figura 13. Composición taxonómica nivel de familia de HMA asociadas a café.

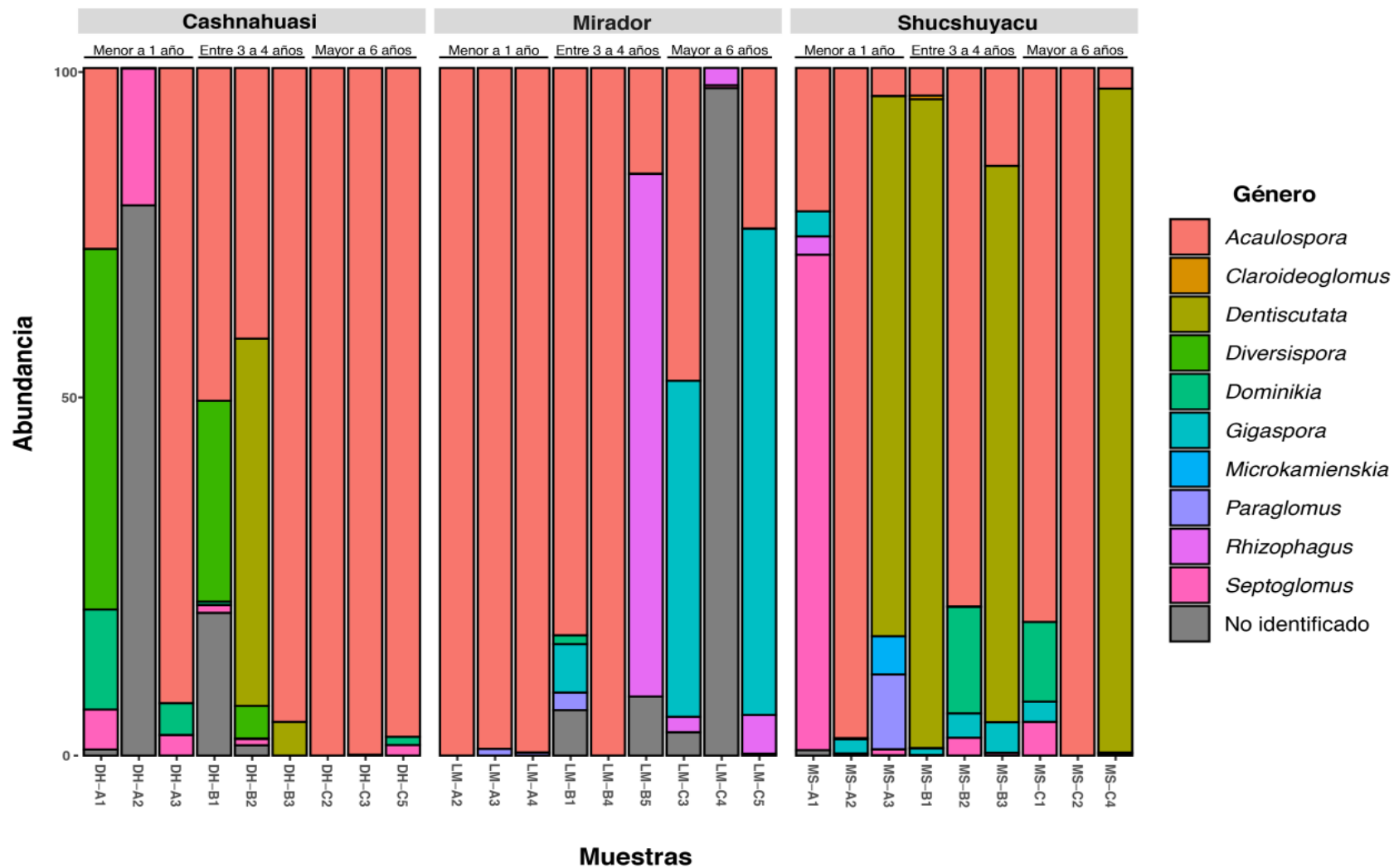


Figura 14. Composición taxonómica nivel de género de HMA asociadas a café

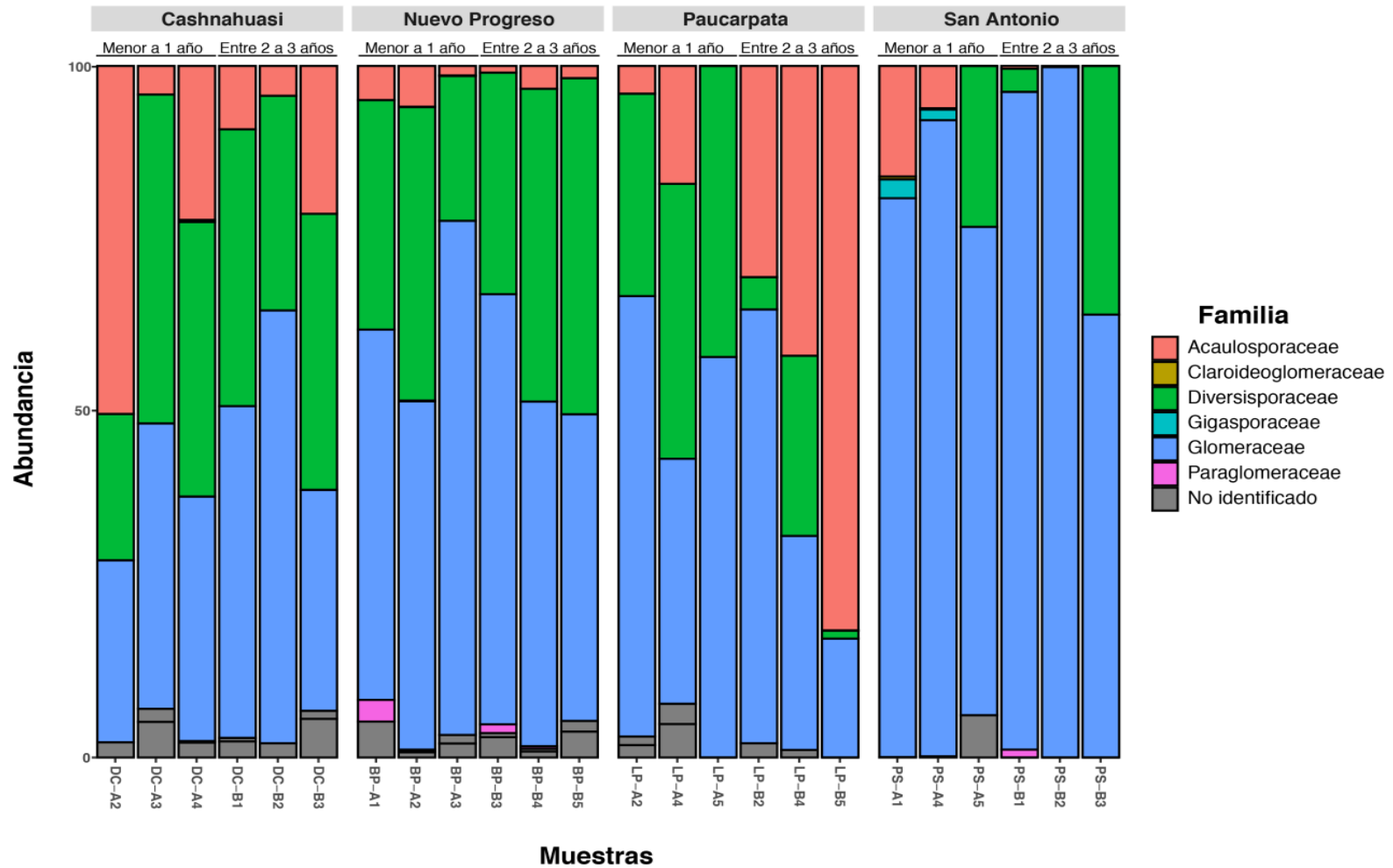


Figura 15. Composición taxonómica nivel de familia de HMA asociadas a Sacha Inchi

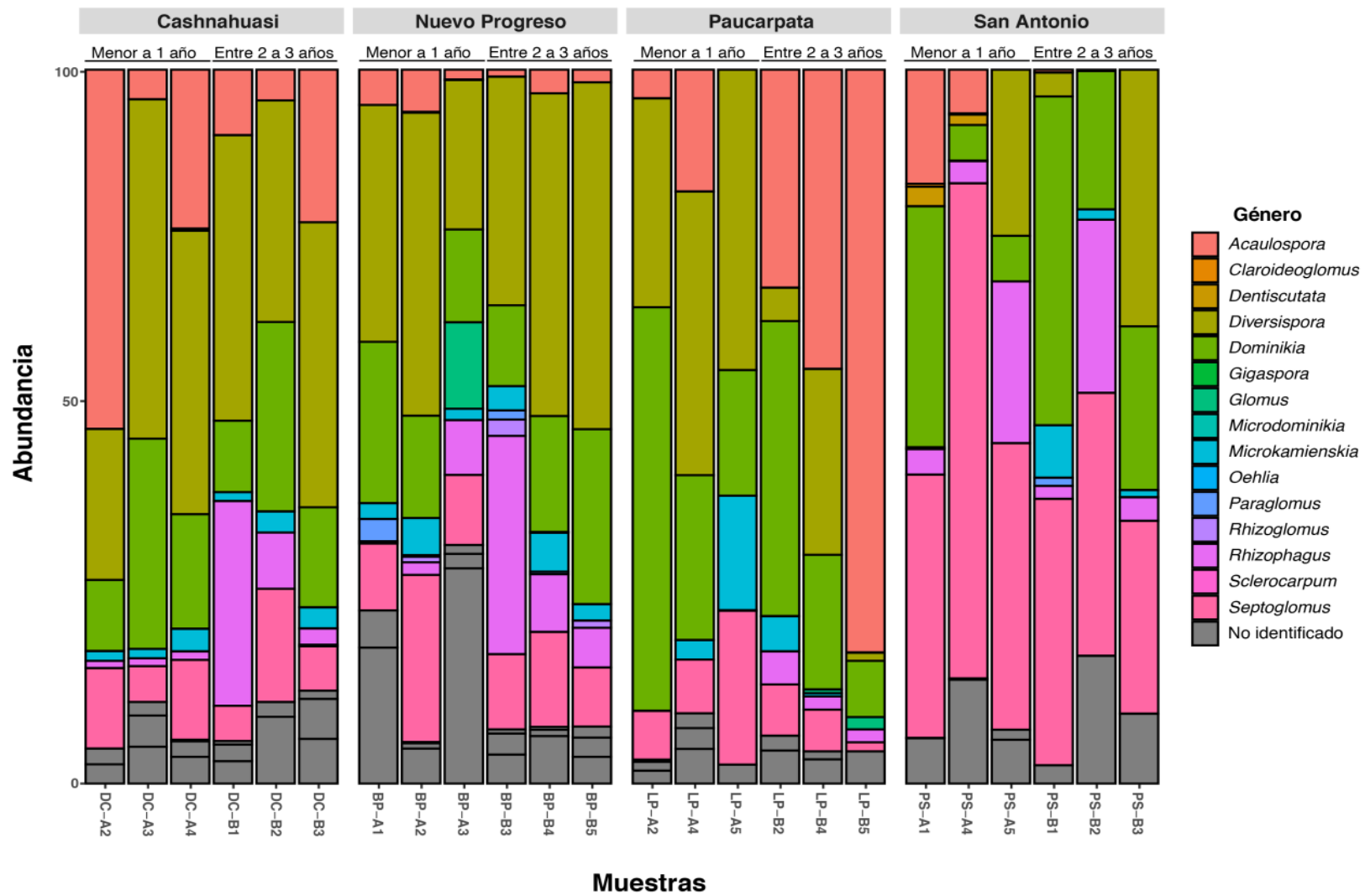


Figura 16. Composición taxonómica nivel de género de HMA asociadas a Sacha Inchi

4.2 DISCUSIONES

Este estudio corrobora las diferencias altamente significativas en las comunidades micorrícicas según el tipo de planta, además de desigualdades significativas por el tipo de localidad, tanto en sacha inchi como en café. También, se ha encontrado una relación entre la edad de las plantaciones y la riqueza de HMA en café.

Se encontraron diferencias significativas en la composición de HMA entre las muestras de café y Sacha Inchi. Asimismo, en una investigación sobre distintos grupos de plantas, como pastos, plantas C4 y plantas no ruderales, encontraron que el tipo de planta era crucial para estructurar las comunidades de HMA (Davison et al., 2020). Estos resultados sugieren que las diferentes necesidades de nutrientes de cada tipo de planta pueden contribuir a la composición única del suelo y, por lo tanto, a la diversidad de hongos micorrízicos en cada planta.

Con relación a la Figura 4, se visualiza la disminución de la diversidad alfa significativa en el cultivo de café con la edad más avanzada, además de una influencia significativa de la edad en la composición de las comunidades de HMA. Esto es constatable con un estudio de diversidad de HMA en café (Rengifo-Del Aguila et al., 2022), en donde se observó que la relación entre la riqueza y la edad de las plantaciones de café fue constante. No obstante, en aquel estudio se utilizó la técnica de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP), esta tiene menor resolución que la generada por la secuenciación de alto rendimiento de Myseq-Illumina. Por otra parte, nuestro hallazgo es consistente con un trabajo previo en ginseng donde se identificaron una disminución de la diversidad alfa de HMA en relación a la edad (Kil et al., 2014). También en *Cunninghamia lanceolata* (Lu et al., 2019) se observó esta misma tendencia. Se ha destacado que tanto la identidad como la edad de las plantas anfitrionas son factores cruciales que influyen en la estructura y composición de las comunidades de HMA (Martínez et al., 2015). Sin embargo, se sugiere que existen otros factores potenciales que desempeñan un papel importante en la composición de la comunidad de HMA (Rengifo-Del Aguila et al., 2022).

Por otra parte, se denota una alta influencia de las localidades en la riqueza de las comunidades de HMA de café, además de su impacto en la beta diversidad. Esto es concordante con la investigación de Rengifo-Del Aguila et al., (2022), donde se indica una influencia de la localidad en la diversidad beta. En términos generales, es conocido que las

propiedades del terreno pueden influir considerablemente en las comunidades de hongos presentes en el suelo (Hazard et al., 2013). Estas diferencias podrían atribuirse a la perturbación relacionada con el uso de la tierra, como el cultivo convencional, y la calidad del suelo, según lo mencionado por Garcia de Leon et al., (2018), donde analizaron muestras de diversas ubicaciones para evaluar la alteración de la diversidad alfa.

En relación con la Figura 9, se pudo observar la ausencia de significancia estadística en cuanto a la riqueza entre dos diferentes rangos de edades en la planta Sacha Inchi. Este resultado concuerda con el hallazgo de otro estudio de HMA en Sacha Inchi (de la Sota Ricaldi et al., 2023), donde también se concluyó que no se encontró ninguna variación significativa en la riqueza en función de la edad de la planta. Además, en la figura 11 se presentó la representación gráfica de la diversidad beta de las muestras de Sacha Inchi, considerando dos grupos de edades distintos. No se observó una significativa variabilidad entre las composiciones de estas comunidades en base al rango de edad, pero sí al tipo de localidad. Sin embargo, el estudio realizado por de la Sota Ricaldi et al. (2023) sobre la diversidad beta en Sacha Inchi reportó que la edad sí influyó en la beta diversidad, ya que se evidenció un aumento con el tiempo. Al igual que en café, este estudio realizó la tecnología T-RFLP, siendo está probablemente el origen de obtención de resultados no tan similares.

Las diferencias significativas en las comparaciones de las localidades de Sacha Inchi en riqueza y composición de comunidades de HMA pueden atribuirse al manejo agrícola al que están expuestas estas plantaciones, que sigue diferentes prácticas de agricultura convencional en cada localidad, y así mismo en las variables fisicoquímicas de los suelos. Este hallazgo concuerda con investigaciones previas, como la de Manoharan et al., (2017), quienes también encontraron una relación significativa entre las prácticas agrícolas convencionales y la disminución de la diversidad de HMA en plantaciones de cereales. Este efecto del manejo agrícola en la comunidad de HMA también ha sido respaldado por estudios como el de Liu et al., (2020), quienes observaron respuestas significativas y diferenciadas en la composición de la comunidad de HMA debido a la fertilización a largo plazo en plantaciones de maíz. Además, Cheng et al., (2023) relacionaron los incendios leves y moderados en Bosques de China con el impacto significativo en la composición de la comunidad de HMA y también sus propiedades fisicoquímicas en distintas áreas geográficas. Dando correlaciones significativas de la relación en las variables presentadas.

A pesar de estas diferencias de la composición de comunidades microbianas entre localidades, se encontró algunas similitudes en los taxones identificados de HMA en general para ambas especies, café y Sacha Inchi. Este hallazgo se respalda con la investigación de Rincón et al., (2021), quienes estudiaron la diversidad de HMA en plantaciones de cacao, donde se destaca que la mayoría de los taxones presentes en HMA tienen una distribución global. A nivel de Orden en café se observó la predominancia general de Diversisporales y Glomerales. Esto también ha sido reportado por Medina, (2017) que estudió la biogeografía de HMA en cultivos de café donde observó la predominancia de Glomerales.

Es notable la limitada presencia de la familia Gigasporaceae en café (Figura 15) mencionada por Aldrich-Wolfe et al. (2020). Las prácticas antropogénicas suelen reducir la aparición de estas familias, como se señala en los estudios de De Souza et al., (2005) y Chagnon et al. (2013).

En los cultivos de café, el género *Acaulospora* es el más predominante, seguido por *Dentiscutata* y *Diversispora*. Varios estudios, incluyendo Corazon-Guivin et al. (2021) y De Beenhouwer et al., (2015), han identificado una predominancia de *Acaulospora* en cultivos de café y sachá inchi. Otros estudios, como los de Coral, (2015) y Medina, (2017), reportaron la prevalencia de los géneros *Acaulospora*, *Glomus* y, en algunos casos, *Claroideoglomus*. Díaz, (2022) también destacó la abundancia de *Acaulospora* y *Glomus* en cafetales.

Por otra parte, se observó una prevalencia de dos órdenes, Diversisporales y Glomerales en sachá inchi. Según el estudio De Acosta, (2021), en las plantaciones de Sachá Inchi, se menciona que los hongos del orden Diversisporales son colonizadores más lentos que los miembros del orden Glomerales, a pesar de esto, también se observó la predominancia de ambos órdenes.

En sachá inchi, la familia de hongos predominante es Glomeraceae, seguida por Diversisporaceae y Acaulosporaceae, como confirma el estudio de De la Sota Ricaldi et al., (2023). A nivel de género, *Acaulospora*, *Diversispora* y *Septoglomus* son los más comunes, variando sus proporciones según Acosta, (2021). Sin embargo, De la Sota Ricaldi et al., (2023) también destacan la presencia de los géneros *Diversispora*, *Glomus*, *Rhizophagus* y *Funneliformis* en sachá inchi.

V. CONCLUSIONES

- Se generaron productos PCR medibles e idóneos que secuenciaron o por la plataforma Illumina-Myseq para realizar estudios de diversidad de HMA en café y sachá inchi.
- Se obtuvieron archivos Fastq pareados de las 51 muestras de HMA obtenidas de distintas localidades de café y Sachá Inchi.
- Se realizó la anotación taxonómica de las 51 muestras de HMA obtenidas de distintas localidades de café y Sachá Inchi.
- Se determinó que las variaciones en la diversidad del café están influenciadas de manera significativa por la antigüedad del cultivo y su ubicación, dado que posiblemente la evolución favoreció a ciertos HMA asociadas a café debido a restricciones bióticas y abióticas.
- Se identificó un impacto geográfico significativo en la variabilidad de la diversidad de HMA de las plantaciones de sachá inchi que indica que probablemente solo las adaptaciones derivadas de las técnicas agrícolas mostraron tener una relevancia significativa para este cultivo.
- No se detectó una influencia de la edad en la diversidad de los HMA asociados a sachá inchi que sugiere que el lapso de tiempo evaluado no haya sido suficientemente extenso para reflejar variaciones.

VI. RECOMENDACIONES

- Con miras a profundizar en la investigación, se recomienda ejecutar análisis fisicoquímicos en las muestras de suelo se presenta como una medida esencial, ya que estos análisis poseen el potencial de esclarecer las variaciones observadas en los índices de alfa diversidad en relación con la edad de los cultivos de café. Asimismo, estos análisis pueden proporcionar una comprensión más profunda de las fluctuaciones en la beta diversidad, particularmente en lo que respecta a las diferencias geográficas entre las localidades de estudio.
- Realizar análisis de metadiversidad de suelos rizosférico en las parcelas estudiadas.
- Aumentar la cantidad de repeticiones en un estudio subsiguiente se plantea como una medida necesaria, ya que la limitación actual de réplicas compromete la robustez de nuestros análisis centrados en la temática de la variación en función de la edad.
- Emplear una tecnología de mayor calidad como PacBio-HiFi se vislumbra como una elección pertinente, dado que esta tecnología tiene la capacidad de amplificar la totalidad del marcador 18S y ofrecer resultados más precisos en lo que concierne a la anotación taxonómica a nivel de especie.
- Validar los resultados de metadiversidad obtenidos con ensayos de aislamiento de suelos y especies de HMA más representantes.
- Complementar el estudio con técnicas microscópicas para identificación de HMA de las muestras utilizadas para análisis de metadiversidad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, C. L. (2021). Comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares en talares del partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires: Interacción con la invasión de *Ligustrum lucidum* [Doctor en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/129186>
- Acosta, R. (2021). Estudio de la diversidad de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) en el cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), en la región San Martín [Tesis Titulación, Universidad Nacional de San Martín]. <http://hdl.handle.net/11458/4124>
- Adepoju, A. F., Adenuga, O. O., Mapayi, E. F., & Olaniyi, O. O. (2017). Coffee: Botany, distribution, diversity, chemical composition and its management. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10(7), 57-62. <https://doi.org/10.9790/2380-1007035762>
- Al-Areqi, A. H. N. A., Chliyeh, M., Touhami, A. O., Benkirane, R., & Douira, A. (2014). Effect of a composite endomycorrhizal inoculum on the growth of *Coffea arabica* seedlings. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(1), 185-194.
- Aldrich-Wolfe, L., Black, K. L., Hartmann, E. D. L., Shivega, W. G., Schmaltz, L. C., McGlynn, R. D., Johnson, P. G., Asheim Keller, R. J., & Vink, S. N. (2020). Taxonomic shifts in arbuscular mycorrhizal fungal communities with shade and soil nitrogen across conventionally managed and organic coffee agroecosystems. *Mycorrhiza*, 30(4), 513-527. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00967-7>
- Alves, E. P., Barrella, T. P., & Santos, R. H. S. (2015). The Atlantic forest zone, Brazil. *Ciênc. Agrotec.* <https://doi.org/10.1590/S1413-70542015000300004>
- Andrade, S. A. L., Gratão, P. L., Azevedo, R. A., Silveira, A. P. D., Schiavinato, M. A., & Mazzafera, P. (2010). Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 198-207.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.11.009>

Arcila, J. (2004). Anormalidades en la floración del cafeto.

Arcila, J., Farfan V., F. F., Moreno B., A. M., Salazar G., L. F., & Hincapie G., E. (2007). Sistemas de producción de café en Colombia (Primera edición). Cenicafé. <http://hdl.handle.net/10778/720>

Arévalo, G. (1996). El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la amazonia. INIA. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/944>

Ayala, G. (2016). Análisis de crecimiento y producción de 3 variedades de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en el municipio de Tena Cundinamarca [Tesis Titulación, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales]. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/487>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Bussmann, R. W., Paniagua Zambrana, N., & Téllez, C. (2013). *Plukenetia carolis-vegae* (Euphorbiaceae) – A new useful species from northern Peru. *Economic Botany*, 67(4), 387-392. <https://doi.org/10.1007/s12231-013-9247-2>

Bussmann, R. W., Téllez, C., & Glenn, A. (2009). *Plukenetia huayllabambana* sp. Nov. (Euphorbiaceae) from the upper amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany*, 27(4), 313-315. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2009.00460.x>

Cachique, D. (2006). Biología floral y reproductiva de *Plukenetia volubilis* L. (Euphorbiaceae)- (Sacha Inchi) [Tesis Titulación]. Universidad Nacional de San Martín.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Camarena, G. (2012). Interacción plantas-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista*

- Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XVIII(3), 409-421.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Camargo, S. L., & Montaña, N. M. (2012). Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*.
- Cardinal, 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. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1308-9>
- Cascante, P. (2017). Crecimiento y desarrollo de rebrotes de café (*Coffea arabica* L.) mediante la utilización de *Trichoderma harzianum*, foliares a base de reguladores de crecimiento y boro-zinc en la zona de Palmichal, Acosta. [Tesis Licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://hdl.handle.net/2238/10839>
- Cevallos, M. A. (2023). Detección de defectos morfológicos en granos de café utilizando técnicas de Inteligencia artificial y visión por computador [Tesis Titulación, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/14099>
- Chagnon, P.-L., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science*, 18(9), 484-491. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.001>
- Chahal, K., Rana, B., & Jha, M. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Potentially Sustainable Alternative in Agriculture and other Ecosystems. *Strad Research*, 9(7). <https://doi.org/10.37896/sr9.7/021>
- Cheng, Z., Wu, S., Du, J., Liu, Y., & Siu, X. (2023). Reduced arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) diversity in light and moderate fire sites in Taiga forests, northeast China. *Microorganisms*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071836>
- Chinchay, D. (2016). Efectos de hongos micorrízicos arbusculares nativos sobre el nematodo agallador de raíces (*Meloidogyne spp.*) en plantones de café (*Coffea arabica*) variedad caturra en la región San Martín. [Tesis Titulación, Universidad Nacional de San Martín]. <http://hdl.handle.net/20.500.12390/2012>
- 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(3), 1732-1739. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>
- Cogo, F., Gontijo, P., & Pouyú, E. (2017). Arbuscular mycorrhiza in *Coffea arabica* L.: Review and meta-analysis. *Coffee Science*, 25.
- Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. (2023). Perú en el top diez de productores de café arábico a nivel mundial [Nota de prensa]. <https://www.gob.pe/institucion/promperu/noticias/823939-peru-en-el-top-diez-de-productores-de-cafe-arabico-a-nivel-mundial>
- Coral, L. (2015). Estudio de la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares nativos y su potencial micorrízico en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en diferentes condiciones agroecológicas de la región San Martín [Tesis de Titulación, Universidad Nacional de San Martín]. <https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/664>
- Corazon-Guivin, M. A., Cerna, A., Guerrero, J. C., Vallejos, A., Silva, G. A., & Oehl, F. (2019). *Acaulospora aspera*, a new fungal species in the Glomeromycetes from rhizosphere soils of the inka nut (*Plukenetia volubilis* L.) in Peru. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 250-257 Pages. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2019.092.035>
- Corazon-Guivin, M. A., Vallejos, A., De La Sota, A. M., Cerna, A., Guerrero, J. C., Santos, V., Alves Da Silva, G., & Oehl, F. (2021). *Acaulospora flava*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from *Coffea arabica* and *Plukenetia volubilis* plantations at the sources of the Amazon river in Peru. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 116-123 Pages. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2021.094.014>
- Core team, R. (2020). R A Language and environment for statistical computing. *Statistical Computing*. <https://scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=3064798>
- Crossay, T., Antheaume, C., Redecker, D., Bon, L., Chedri, N., Richert, C., Guentas, L., Cavaloc, Y., & Amir, H. (2017). New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports*, 7(1), 14306. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6>

- Cuenca, E. (2020). Fenología del cafeto (*Coffea arabica* L.) en tres sitios de producción cafetalera de Malacatos, Chaguarpamba y Zapotepamba de la provincia de Loja. [Tesis Titulación, Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/23702>
- Cui, X., Hu, J., Wang, J., Yang, J., & Lin, X. (2016). Reclamation negatively influences arbuscular mycorrhizal fungal community structure and diversity in coastal saline-alkaline land in eastern China as revealed by Illumina sequencing. *Applied Soil Ecology*, 98, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.10.008>
- Davis, A. P., Chadburn, H., Moat, J., O'Sullivan, R., Hargreaves, S., & Nic Lughadha, E. (2019). High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances*, 5, 1-9.
- Davison, J., García de León, D., Zobel, M., Moora, M., & Barceló, M. (2020). Plant functional groups associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, 226(4), 1117-1128.
- De Beenhouwer, M., Muleta, D., Peeters, B., Van Geel, M., Lievens, B., & Honnay, O. (2015). DNA pyrosequencing evidence for large diversity differences between natural and managed coffee mycorrhizal fungal communities. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 241-249. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0231-8>
- de la Sota Ricaldi, A. M., Rengifo del Águila, S., Blas Sevillano, R., López-García, Á., & Corazon-Guivin, M. A. (2023). Beta diversity of arbuscular mycorrhizal communities increases in time after crop establishment of peruvian Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). *Journal of Fungi*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof9020194>
- de Souza, F. A., Dalpé, Y., Declerck, S., de la Providencia, I. E., & Séjalon-Delmas, N. (2005). Life history strategies in Gigasporaceae: Insight from monoxenic culture. En S. Declerck, J. A. Fortin, & D.-G. Strullu (Eds.), *In Vitro Culture of Mycorrhizas* (pp. 73-91). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_5
- Del Águila, K. (2016). Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares a plantones de café (*Coffea arabica*), variedad caturra a nivel de vivero en la región San Martín [Universidad Nacional de San Martín - Perú].

https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/11458/826/1/TP_AGRO_00698_2016.pdf

Del Aguila, K. M., Vallejos-Torres, G., Arévalo, L. A., & Becerra, A. G. (2018). Inoculación de consorcios micorrícicos arbusculares en *Coffea arabica*, variedad Caturra en la región San Martín. *Información tecnológica*, 29(1), 137-146. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000100137>

Díaz, C., & Williams, M. (2017). Línea base del sector café en el Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo – PNUD.

Díaz, M. (2022). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantaciones de café y bosques de San Martín, Perú. [Tesis de Titulación, Universidad Nacional de San Martín]. <https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/4812>

Dickie, I. A., & FitzJohn, R. G. (2007). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: A methods review. *Mycorrhiza*, 17(4), 259-270. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0129-2>

Dorantes, N. G., Trujillo, M. M., & Abud, Y. C. (2012). Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares que colonizan plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.). 14(2).

Drain, A., Bonneau, L., Recorbet, G., Van Tuinen, D., Wipf, D., & Courty, P.-E. (2019). Characterization of arbuscular mycorrhizal communities in roots of vineyard plants. En D. Reinhardt & A. K. Sharma (Eds.), *Methods in Rhizosphere Biology Research* (pp. 27-34). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_3

Enríquez, J. P., Retes-Cálix, R. F., & Vásquez-Reyes, E. F. (2020). Importancia, genética y evolución del café en Honduras y el mundo. *Innovare: Revista de ciencia y tecnología*, 9(3), 149-155. <https://doi.org/10.5377/innovare.v9i3.10649>

Espitia, F., & Perez, A. (2016). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (amf) in three agroecosystems with grass colosoana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus) in the department of Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 8(1), 72-81. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n1.2016.226>

Falcón, E., Riera-Nelson, M. C., & Rodríguez Leyva, O. (2013). Effect of the inoculation of mycorrhizal fungi on forest production postures in two types of soils. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*, 34(3), 32-39.

- Farid, A. (2021). Ecology and diversity of boletes of the southeastern United States [Tesis Doctoral, University of South Florida]. <https://digitalcommons.usf.edu/etd/9670>
- Ferrol, N., & Lanfranco, L. (Eds.). (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi: Methods and protocols (Vol. 2146). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0603-2>
- Floc'h, J. B., Hamel, C., Laterrère, M., Tiedemann, B., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2022). Long-term persistence of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere and bulk soils of non-host *Brassica napus* and their networks of co-occurring microbes. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.828145>
- Florez, C. P., Ibarra, L. N., Gomez, L. F., Carmona, C. Y., Castaño, A., & Ortiz, A. (2013). Estructura y funcionamiento de la planta de café. (Vol. 1). Cenicafé. <http://hdl.handle.net/10778/4321>
- Follegatti, L. A., Piantino, C. R., Grimaldi, R., & Cabral, F. A. (2009). Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(3), 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.03.010>
- Frøslev, T. G., Kjøller, R., Bruun, H. H., Ejrnæs, R., Brunbjerg, A. K., Pietroni, C., & Hansen, A. J. (2017). Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications*, 8(1), 1188. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01312-x>
- Garcia de Leon, D., Davison, J., Moora, M., Opik, M., Feng, H., Hiiesalu, I., & Zobel, M. (2018). Anthropogenic disturbance equalizes diversity levels in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Global Change Biology*, 24(6), 2649-2659.
- García, J. M., & Ocampo, J. A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. <http://www.jstor.org/stable/23697515>
- Garzón, L. P. (2015). Importancia de las micorrizas arbusculares (ma) para un uso sostenible del suelo en la amazonia colombiana. *Luna Azul*, 42, 217-234. <https://doi.org/10.17151/luaz.2016.42.14>
- Gomez, J. (2004). Monografía y cultivo de Sacha Inchi. Produmedios.
- Gonzales, R. L. (2015). Situación productiva y perfil de calidad del cultivo de café (*Coffea*

- arabica*) en el Alto Mayo, región San Martín [Tesis Titulación, Universidad Nacional de San Martín]. <http://hdl.handle.net/11458/3602>
- Gutjahr, C., & Paszkowski, U. (2013). Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00204>
- Harrison, M. J. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(6), 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.010>
- Hazard, C., Gosling, P., Van der Gast, C., Mitchell, D. T., Doohan, F. M., & Bending, G. D. (2013). The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME journal*, 7(3), 498-508. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.127>
- Hijri, M. (2016). Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza*, 26(3), 209-214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>
- Hogemap, C., & Küster, H. (2013). A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *BMC Genomics*. <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-306>
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451-1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Hu, Y., Pandey, A. K., Wu, X., Fang, P., & Xu, P. (2022). The role of arbuscular mycorrhiza fungi in drought tolerance in legume crops: A Review. *LEGUME RESEARCH - AN INTERNATIONAL JOURNAL*, Of. <https://doi.org/10.18805/LRF-660>
- Huerta, A. (2019). Hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos ácidos asociados con maíz, como promotores de crecimiento y bioprotección contra *Phyllophaga spp.* [Tesis Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/6612
- Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: Exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 4871-4881. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>

- Jacott, C., Murray, J., & Ridout, C. (2017). Trade-offs in arbuscular mycorrhizal symbiosis: Disease resistance, growth responses and perspectives for crop breeding. *Agronomy*, 7(4), 75. <https://doi.org/10.3390/agronomy7040075>
- Jara, L. G. (2019). Efecto de la micorriza y materia orgánica animal en la producción del frijol verde (*Phaseolus vulgaris*), distrito Cayran, provincia y región Huánuco—2018 [Tesis Titulación, Universidad de Huánuco]. <http://repositorio.udh.edu.pe/123456789/2328>
- Kang, J. E., Ciampi, A., & Hijri, M. (2020). SeSaMe PS Function: Functional analysis of the whole metagenome sequencing data of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 601-612. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.107235>
- 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, 416-421. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.416>
- Kodahl, N., & Sørensen, M. (2021). Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Is an underutilized crop with a great potential. *Agronomy*, 11(6), 1066. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061066>
- Kohout, P., Sudová, R., Janoušková, M., Čtvrtlíková, M., Hejda, M., Pánková, H., Slavíková, R., Štajerová, K., Vosátka, M., & Sýkorová, Z. (2014). Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 482-493. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.027>
- Krishnamoorthy, R., Premalatha, N., Karthik, M., Anandham, R., Senthilkumar, M., Gopal, N. O., Selvakumar, G., & Sa, T. (2017). Molecular markers for the identification and diversity analysis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). En B. P. Singh & V. K. Gupta (Eds.), *Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker Developments* (pp. 177-199). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4_8
- Krüger, C. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi for reforestation of native tropical trees in the Andes of South Ecuador [Tesis Titulación, Universidad Ludwig-Maximilians en Munich]. urn:nbn:de:bvb:19-164538

- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, *193*(4), 970-984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x>
- 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*(1), 212-223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x>
- Kumar, S., & Chaurasia, P. (2016). Mycorrhizal diversity: Methods and constraints? *Indian Journal of Science and Technology*, *9*(37). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i37/87422>
- Liu, J., Zhang, J., Li, D., Xu, C., & Xiang, X. (2020). Differential responses of arbuscular mycorrhizal fungal communities to mineral and organic fertilization. *MicrobiologyOpen*, *9*(1). <https://doi.org/10.1002/mbo3.920>
- Lovera, M., Cuenca, G., Fajardo, L., Cáceres, A., & Guerra-Sierra, B. E. (2022). AMF Diversity in coffee and cacao agroforestry systems: Importance for crop productivity and forest conservation. En M. A. Lugo & M. C. Pagano (Eds.), *Mycorrhizal Fungi in South America: Biodiversity, Conservation, and Sustainable Food Production* (pp. 107-127). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-12994-0_5
- Lu, N., Xu, X., Wang, P., Zhang, P., Ji, B., & Wang, X. (2019). Succession in arbuscular mycorrhizal fungi can be attributed to a chronosequence of *Cunninghamia lanceolata*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54452-z>
- Lugo, M. J. (2021). Evaluación de micorrizas arbusculares asociadas a tres especies frutales en la hacienda agua fría, municipio Arismendi, estado Sucre, Venezuela [Universidad de Oriente]. <http://ri2.bib.udo.edu.ve:8080/jspui/handle/123456789/5279>
- Maeda, T., Kobayashi, Y., Kameoka, H., Okuma, N., Takeda, N., Yamaguchi, K., Bino, T., Shigenobu, S., & Kawaguchi, M. (2017). Evidence of non-tandemly repeated rDNAs and their intragenomic heterogeneity in *Rhizophagus irregularis* [Preprint]. *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1101/205864>

- Manco, E. (2008). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) cultivo promisorio para la Amazonía Peruana. Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/729>
- Manco, E. (2006). Situación y avances del cultivo de sachá inchi en el Perú. Informe técnico. Instituto Nacional de Investigación y Extensión. Ministerio de Agricultura. Recuperado de: <http://www.incainchi.es/pdf/1358.pdf>
- Manoharan, L., Rosenstock, N. P., Williams, A., & Hedlund, K. (2017). Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. *Applied Soil Ecology*, *115*, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.012>
- Martinez, C. (2022). Métodos de pronóstico de cosecha para el cultivo del café *Coffea arabica* L. En Colombia. Una revisión bibliográfica [Tesis Titulación, Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/52285>
- Martínez, L. B., Richardson, S. J., Tylianakis, J. M., Peltzer, D. A., & Dickie, I. A. (2015). Host identity is a dominant driver of mycorrhizal fungal community composition during ecosystem development. *New Phytologist*, *205*(4), 1565-1576. <https://doi.org/10.1111/nph.13226>
- Massone, D. S., Martucci, A. A., Askenazi Vera, J. E., Pastorino, M. J., & Bartoli, C. (2023). Colonización micorrícica de los plantines de ciprés de la cordillera en relación con la disponibilidad de fósforo y agua en vivero. *Bosque (Valdivia)*, *44*(1), 191-200. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002023000100191>
- Mathieu, S., Cusant, L., Roux, C., & Corradi, N. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi: Intraspecific diversity and pangenomes. *New Phytologist*, *220*(4), 1129-1134. <https://doi.org/10.1111/nph.15275>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2019). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Medina, V. (2017). Biogeografía de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en la región San Martín, Perú [Tesis Titulación,

Universidad Nacional de San Martín - Perú].
<https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/855>

- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- MINAGRI. (2020). MINAGRI y el sector cafetalero impulsan estrategia para la promoción del consumo de café peruano. <https://www.gob.pe/institucion/sse/noticias/317968-minagri-y-el-sector-cafetalero-impulsan-estrategia-para-la-promocion-del-consumo-de-cafe-peruano>.
- Morell, F., Hernández, A., Borges, Y., & Marentes, F. L. (2009). La actividad de los hongos micorrízicos arbusculares en la estructura del suelo. *Cultivos Tropicales*, 30(4), 00-00.
- Mummey, D. L., & Rillig, M. C. (2007). Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.002>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., & Kindt, R. (2019). Vegan: Community ecology package. <https://cran.r-hub.io/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Ordoñez, J. L. (2015). Efecto de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares sobre la nutrición fosfatada y rendimiento de caña de azúcar [Tesis Titulación, Universidad Rafael Landívar]. <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/17/Ordonez-Jarhii.pdf>
- Ortiz, A., Osorio-Vega, N. W., & Echeverri-Gómez, J. (2015). Fisiología de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Revista en Ciencias Agrarias*, 19.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pérez, Y. D. C., Álvarez-Solís, J. D., Mendoza-Vega, J., Pat-Fernández, J. M., Gómez-Álvarez, R., & Cuevas, L. (2012). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana Botánica*, 69(1), 46-56. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100006>
- Plassard, C., & Dell, B. (2010). Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*,

30(9), 1129-1139. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq063>

- Pringle, A., Bever, J. D., Gardes, M., Parrent, J. L., Rillig, M. C., & Klironomos, J. N. (2009). Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 699-715. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173454>
- Quintana, V. (2018). Radiosensibilidad de café (*Coffea arabica* L. var. Typica) aplicado con radiación gamma. [Tesis Titulación, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3721>
- Rahn, E., Vaast, P., Läderach, P., van Asten, P., Jassogne, L., & Ghazoul, J. (2018). Exploring adaptation strategies of coffee production to climate change using a process-based model. *Ecological Modelling*, 371, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmod.2018.07.025>
- Rengifo-Del Aguila, S., de la Sota Ricaldi, A., Corazon Guivin, M., & Lopéz-García, Á. (2022). Phylogenetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities increases with crop age in *Coffea arabica* Plantations. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00887-9>
- Rincón, C., Droh, G., Villard, L., Masclaux, F. G., N'guetta, A., Zeze, A., & Sanders, I. R. (2021). Hierarchical spatial sampling reveals factors influencing arbuscular mycorrhizal fungus diversity in Côte d'Ivoire cocoa plantations. *Mycorrhiza*, 31(3), 289-300. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-01019-w>
- Rivera, F. A., González Salazar, V., González Acosta, J. G., & Ossa López, P. A. (2016). Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrícica en la rizósfera del aguacate (*Persea americana* Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4), 398-405. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.51714>
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLOS Computational Biology*, 17(11), e1009581. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>
- Rodríguez, S., Teixeira, H., Correia, M., Timóteo, S., Heleno, R., Öpik, M., & Moora, M. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi communities from tropical Africa reveal strong ecological structure. *New Phytologist*, 213(1), 380-390. <https://doi.org/10.1111/nph.14288>

<https://doi.org/10.1111/nph.14122>

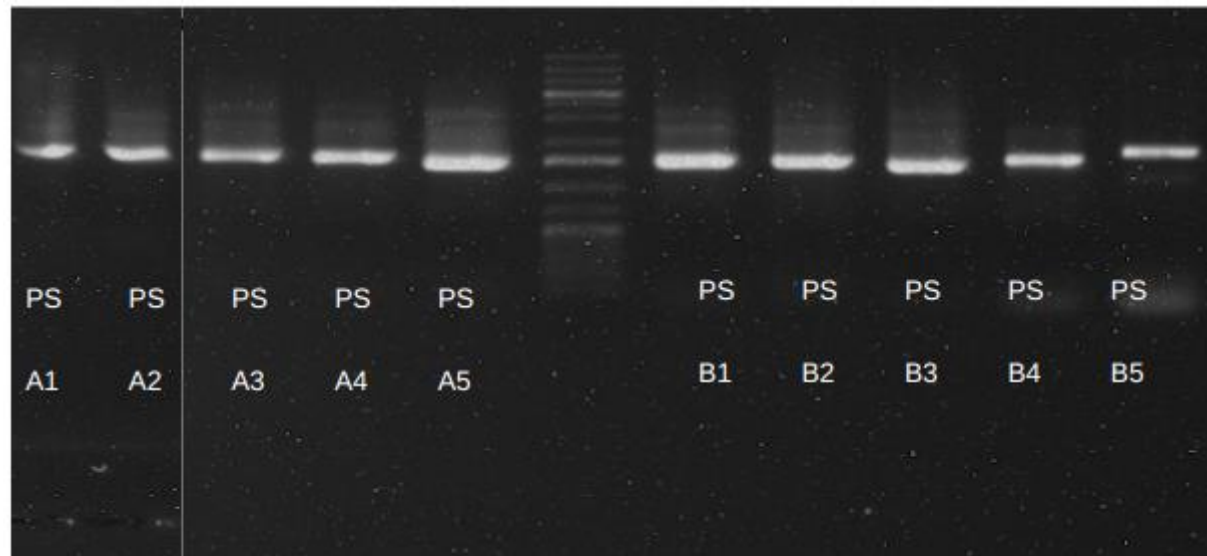
- Rodríguez, Z. (2020). Desarrollo de plantas de café (*Coffea arabica* L.) de la variedad marsellesa modulado por el uso de micorrizas [Tesis Titulación]. Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla.
- Romero, J. M., & Camilo, J. (2019). Manual de producción sostenible de café. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). <https://repositorio.iica.int/handle/11324/8726>
- Roncal, M. R. (2023). Diversidad, composición florística, estructura y presencia de micorrizas en un bosque estacionalmente seco del Marañón, UTCO, Celendín, Cajamarca, Perú [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5785>
- Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., Pascale, S. D., Bonini, P., & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, 91-108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>
- Sánchez, I. (2009). Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos [Tesis Doctoral, Universidad de Granada]. <http://hdl.handle.net/10481/2383>
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005196>
- Selosse, M.-A., Strullu-Derrien, C., Martin, F. M., Kamoun, S., & Kenrick, P. (2015). Plants, fungi and oomycetes: A 400-million year affair that shapes the biosphere. *The New Phytologist*, 206(2), 501-506.
- Sharma, M., & Gupta, S. K. (2014). Approaches and Trends in Plant Disease Management. *Scientific Publishers*.
- Shi, J., Wang, X., & Wang, E. (2023). Mycorrhizal symbiosis in plant growth and stress adaptation: from genes to ecosystems. *Annual Review of Plant Biology*, 74(1), 569-607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-061722-090342>

- Smith, S., & Read, D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Srichamnong, W., Ting, P., Pitchakarn, P., Nuchuchua, O., & Temviriyankul, P. (2018). Safety assessment of *Plukenetia volubilis* (Inca peanut) seeds, leaves, and their products. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 962-969. <https://doi.org/10.1002/fsn3.633>
- Stoffelen, P., Anthony, F., Janssens, S., & Noiro, M. (2021). A new coffee species from South-West Cameroon, the principal hotspot of diversity for *Coffea* L. (*Coffeaceae*, *Ixoroideae*, *Rubiaceae*) in Africa. *Adansonia*, 43(26), 277-285. <https://doi.org/10.5252/adansonia2021v43a26>
- Suarez, L. (2022). Análisis del desarrollo morfológico y agronómico de plántulas de *Coffea arabica* L. cv Catuaí en condiciones de vivero con diferentes sustratos y bioestimulantes [Tesis Titulación, Universidad Estatal del Sur de Manabí]. <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/3897>
- Susila, E., Chan, S. R. O. S., Achmad, B. S., & Maulina, F. (2022). Exploration and morphology identification of spores arbuscular mycorrhizal fungi from horticultural plantation. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, 6(1), 20-30. <https://doi.org/10.55043/jaast.v6i1.31>
- Tedersoo, L., Bahram, M., & Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367(6480), eaba1223. <https://doi.org/10.1126/science.aba1223>
- Vallejos, G., Sánchez, T., García, M. A., Trigo, M., & Arévalo, L. A. (2019). Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.72117>
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Van Geel, M., De Beenhouwer, M., Lievens, B., & Honnay, O. (2016). Crop-specific and single-species mycorrhizal inoculation is the best approach to improve crop growth in controlled environments. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2), 37. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0373-y>

- Vanegas, M. L., Sulzbacher, M. A., Rinaldi, A. C., Roy, M., Selosse, M.-A., & Neves, M. A. (2019). Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes? *Mycological Progress*, 18(9), 1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01519-w>
- Varela, S., López-García, Á., Barea, J. M., & Azcón-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. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0687-2>
- Villalta, J., & Gatica, A. (2019). Una mirada en el tiempo: Mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 577-599. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34173>
- Weber, O. B. (2014). Biofertilizers with arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. En Z. M. Solaiman, L. K. Abbott, & A. Varma (Eds.), *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration* (Vol. 41, pp. 45-66). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45370-4_4
- Wickham, H. (2011). Ggplot2. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics*, 3(2), 180-185.
- Wiriya, J., Rangjaroen, C., Teaumroong, N., Sungthong, R., & Lumyong, S. (2020). Rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi of oil crops (physic nut and Sacha Inchi): A cultivable-based assessment for abundance, diversity, and plant growth-promoting potentials. *Plants*, 9(12), 1773. <https://doi.org/10.3390/plants9121773>
- Xu, S., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Dai, Z., Zhou, L., Feng, T., Chen, M., Wu, T., Hu, E., & Yu, G. (2023). MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for deep mining microbiome. *The Innovation*, 4(2), 100388. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) para muestras de sachu inchi correspondientes a la localidad de San Antonio.



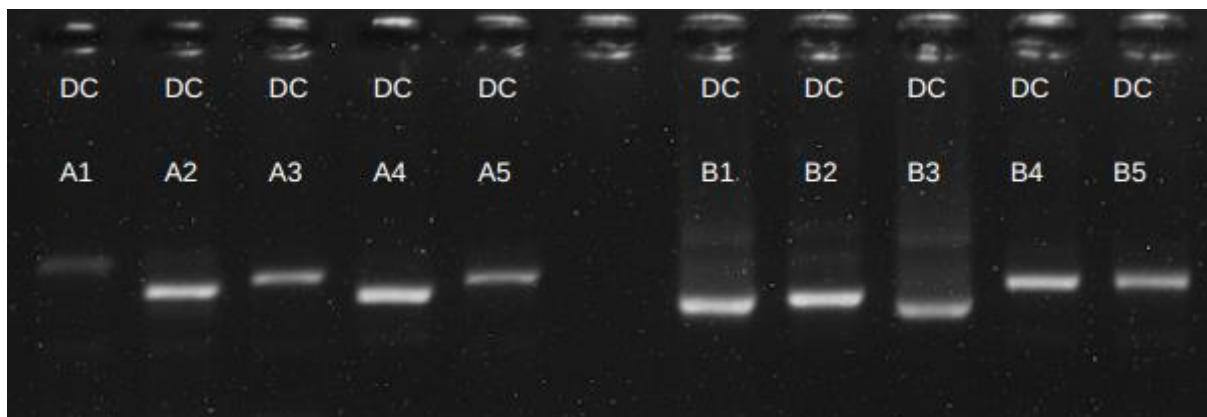
Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 2: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachá inchi correspondientes a la localidad Nuevo Progreso.



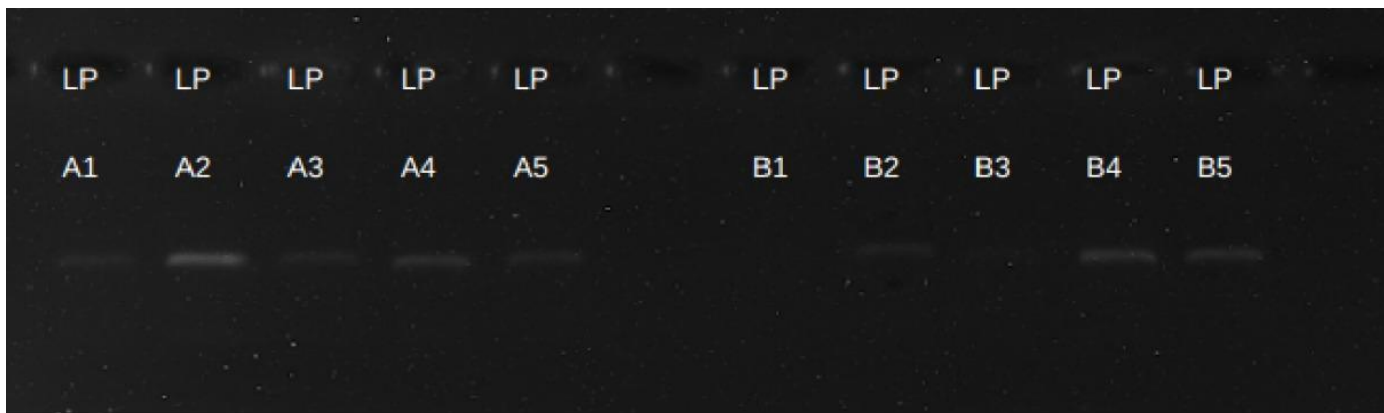
Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 3: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachu inchi correspondientes a la localidad Cashnahuasi.



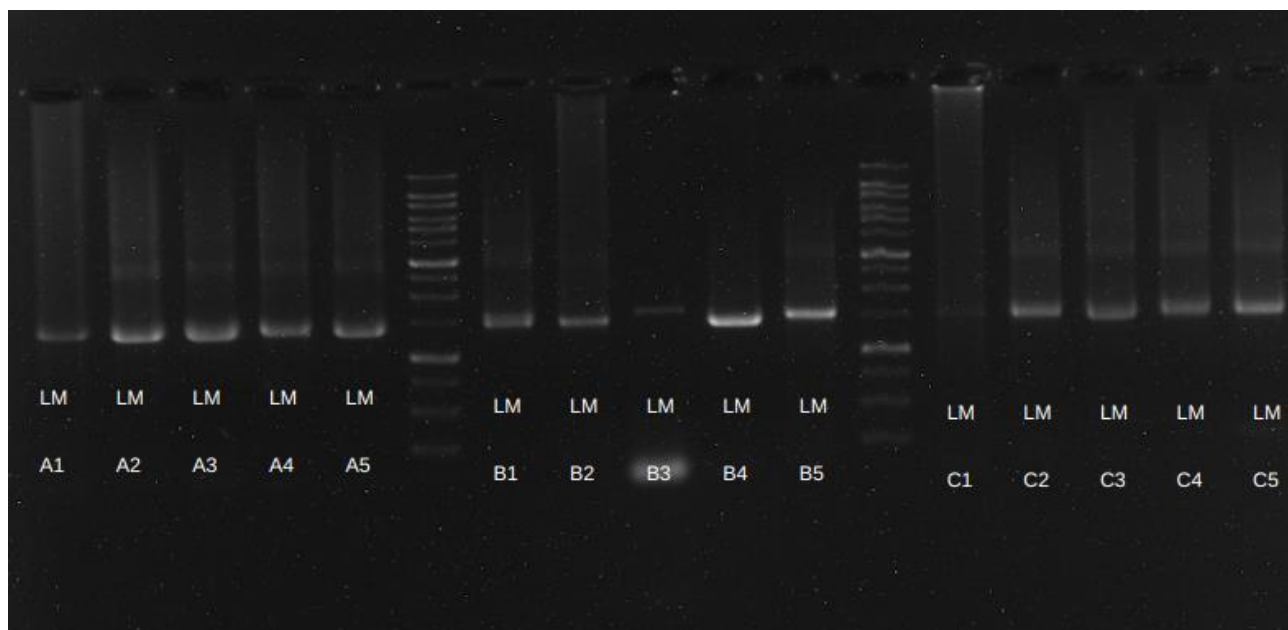
Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 4: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de sachá inchi correspondientes a la localidad de Paucarpata.



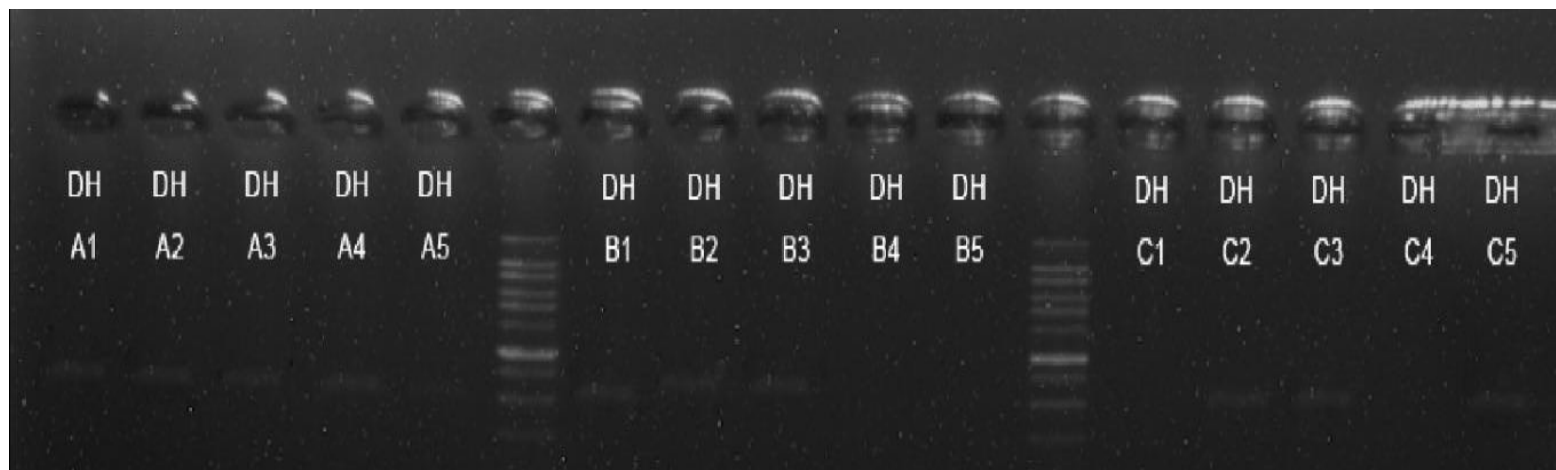
Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 5: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a la localidad El Mirador.



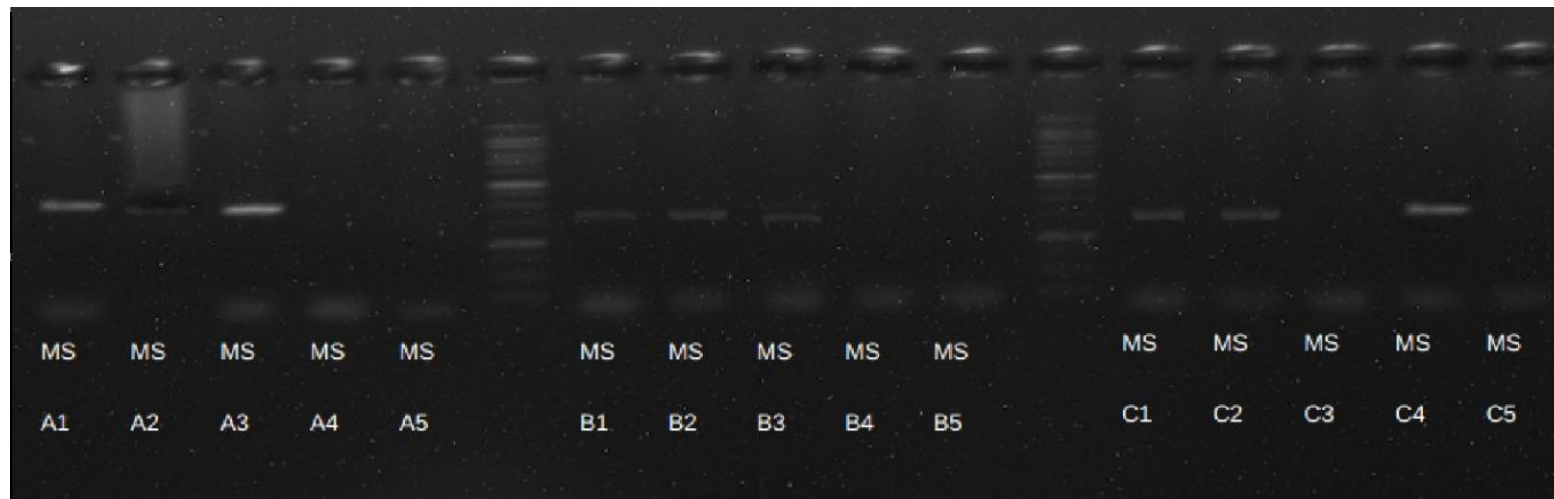
Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 6: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a localidad de Cashnahuasi



Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

Anexo 7: Productos PCR de los primers SSUCmf y LSUmBr (1500 pb) de café correspondientes a localidad de Shucshuyacu

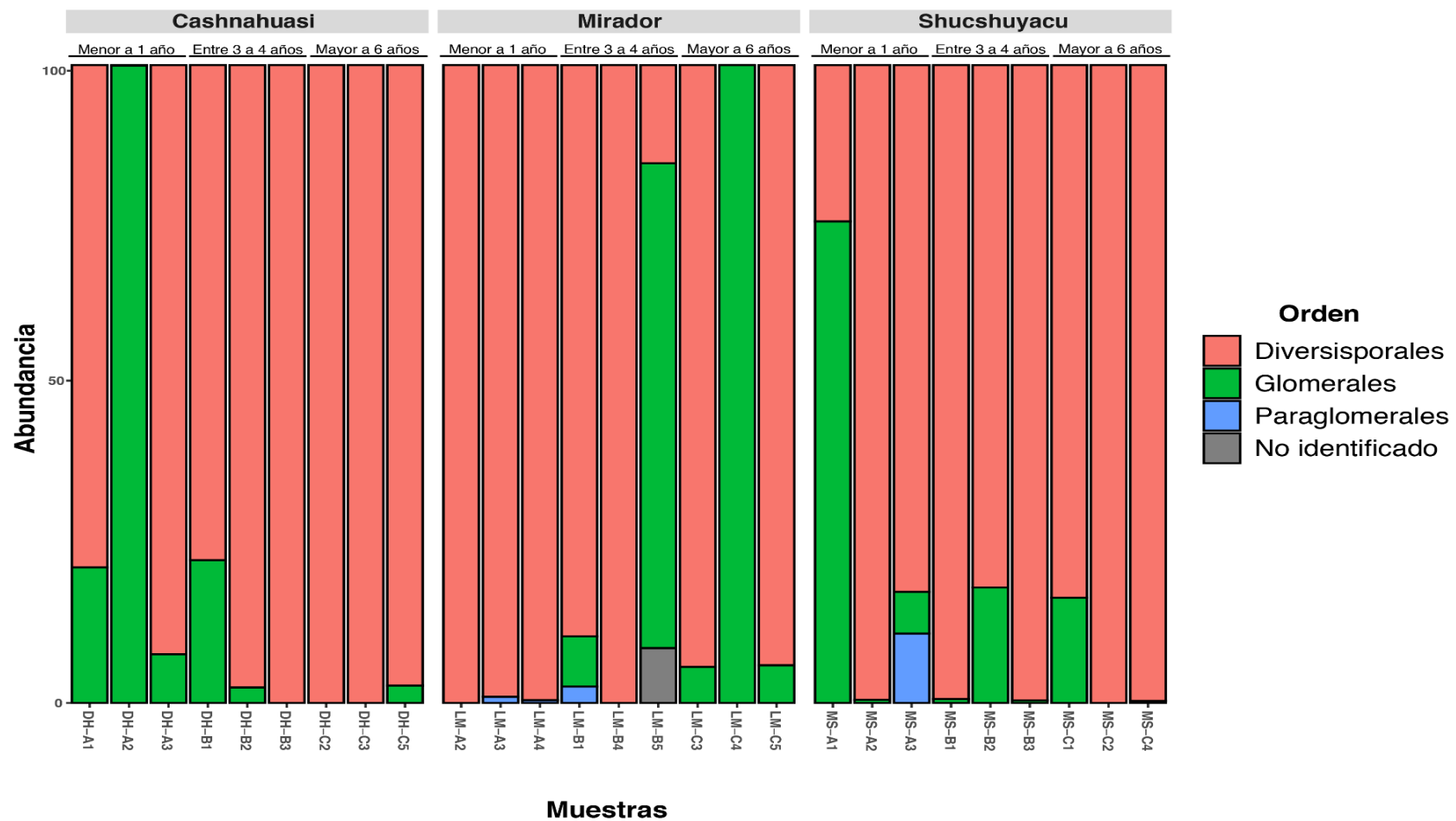


Nota: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El tamaño de las bandas es de aproximadamente 1500 pb.

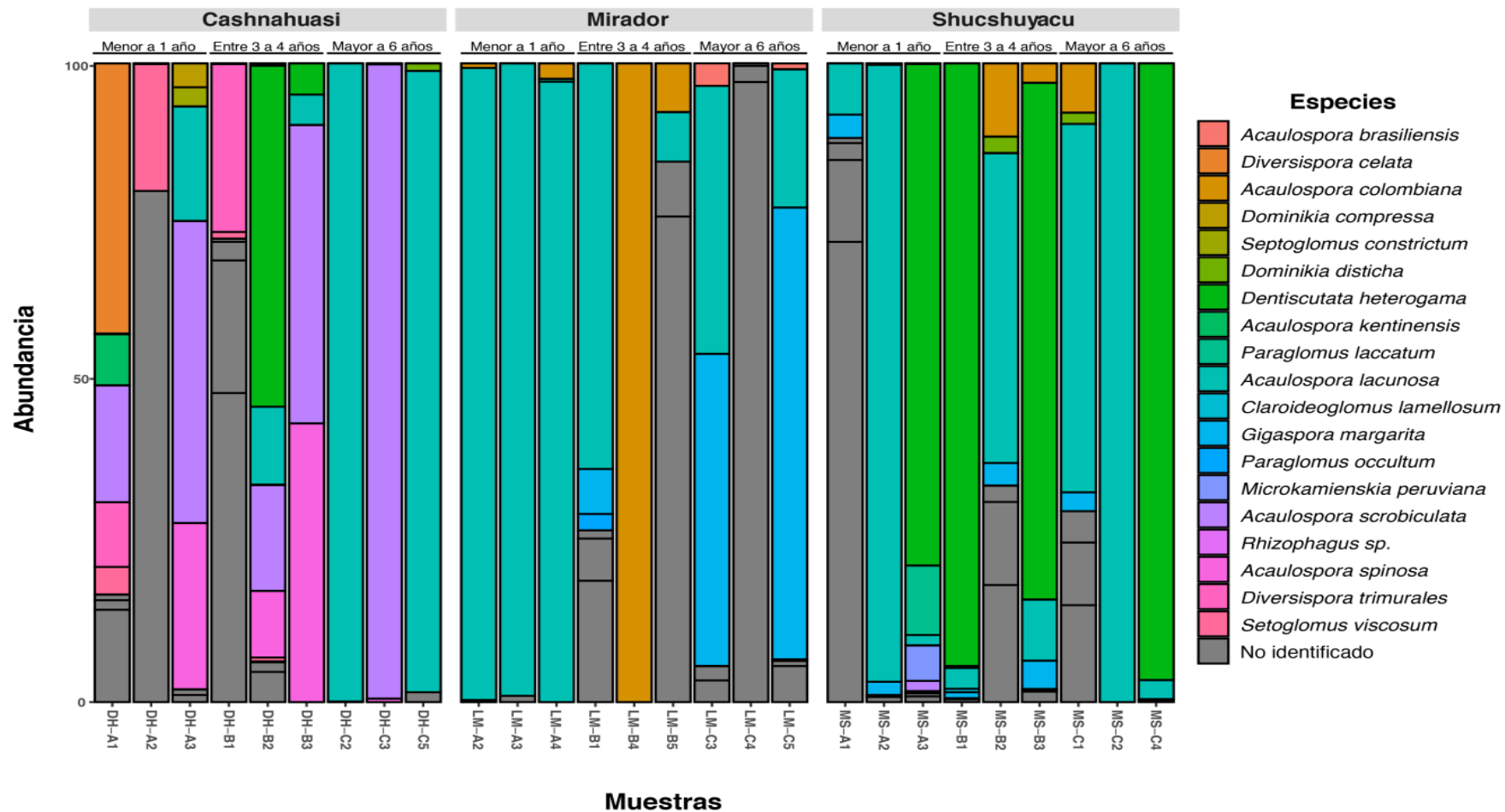
Anexo 9: Archivos fastq de las 51 muestras de café y sachá inchi

```
(base) inia@inia-MS-7A78:~/HMA_fastq/fastq$ ls
barcode.txt          DC-A4_S21_L001_R2_001.fastq.gz  DH-B3_S29_L001_R2_001.fastq.gz  LM-B5_S46_L001_R2_001.fastq.gz  LP-B5_S2_L001_R2_001.fastq.gz  MS-C4_S40_L001_R2_001.fastq.gz
BP-A1_S7_L001_R1_001.fastq.gz  DC-B1_S22_L001_R1_001.fastq.gz  DH-C2_S30_L001_R1_001.fastq.gz  LM-C3_S47_L001_R1_001.fastq.gz  MS-A1_S32_L001_R1_001.fastq.gz  PS-A1_S13_L001_R1_001.fastq.gz
BP-A1_S7_L001_R2_001.fastq.gz  DC-B1_S22_L001_R2_001.fastq.gz  DH-C2_S30_L001_R2_001.fastq.gz  LM-C3_S47_L001_R2_001.fastq.gz  MS-A1_S32_L001_R2_001.fastq.gz  PS-A1_S13_L001_R2_001.fastq.gz
BP-A2_S8_L001_R1_001.fastq.gz  DC-B2_S23_L001_R1_001.fastq.gz  DH-C3_S31_L001_R1_001.fastq.gz  LM-C4_S48_L001_R1_001.fastq.gz  MS-A2_S33_L001_R1_001.fastq.gz  PS-A4_S14_L001_R1_001.fastq.gz
BP-A2_S8_L001_R2_001.fastq.gz  DC-B2_S23_L001_R2_001.fastq.gz  DH-C3_S31_L001_R2_001.fastq.gz  LM-C4_S48_L001_R2_001.fastq.gz  MS-A2_S33_L001_R2_001.fastq.gz  PS-A4_S14_L001_R2_001.fastq.gz
BP-A3_S9_L001_R1_001.fastq.gz  DC-B3_S24_L001_R1_001.fastq.gz  DH-C5_S51_L001_R1_001.fastq.gz  LM-C5_S49_L001_R1_001.fastq.gz  MS-A3_S34_L001_R1_001.fastq.gz  PS-A5_S15_L001_R1_001.fastq.gz
BP-A3_S9_L001_R2_001.fastq.gz  DC-B3_S24_L001_R2_001.fastq.gz  DH-C5_S51_L001_R2_001.fastq.gz  LM-C5_S49_L001_R2_001.fastq.gz  MS-A3_S34_L001_R2_001.fastq.gz  PS-A5_S15_L001_R2_001.fastq.gz
BP-B3_S10_L001_R1_001.fastq.gz  DH-A1_S25_L001_R1_001.fastq.gz  LM-A2_S41_L001_R1_001.fastq.gz  LP-A2_S4_L001_R1_001.fastq.gz  MS-B1_S35_L001_R1_001.fastq.gz  PS-B1_S16_L001_R1_001.fastq.gz
BP-B3_S10_L001_R2_001.fastq.gz  DH-A1_S25_L001_R2_001.fastq.gz  LM-A2_S41_L001_R2_001.fastq.gz  LP-A2_S4_L001_R2_001.fastq.gz  MS-B1_S35_L001_R2_001.fastq.gz  PS-B1_S16_L001_R2_001.fastq.gz
BP-B4_S11_L001_R1_001.fastq.gz  DH-A2_S50_L001_R1_001.fastq.gz  LM-A3_S42_L001_R1_001.fastq.gz  LP-A4_S6_L001_R1_001.fastq.gz  MS-B2_S36_L001_R1_001.fastq.gz  PS-B2_S17_L001_R1_001.fastq.gz
BP-B4_S11_L001_R2_001.fastq.gz  DH-A2_S50_L001_R2_001.fastq.gz  LM-A3_S42_L001_R2_001.fastq.gz  LP-A4_S6_L001_R2_001.fastq.gz  MS-B2_S36_L001_R2_001.fastq.gz  PS-B2_S17_L001_R2_001.fastq.gz
BP-B5_S12_L001_R1_001.fastq.gz  DH-A3_S26_L001_R1_001.fastq.gz  LM-A4_S43_L001_R1_001.fastq.gz  LP-A5_S5_L001_R1_001.fastq.gz  MS-B3_S37_L001_R1_001.fastq.gz  PS-B3_S18_L001_R1_001.fastq.gz
BP-B5_S12_L001_R2_001.fastq.gz  DH-A3_S26_L001_R2_001.fastq.gz  LM-A4_S43_L001_R2_001.fastq.gz  LP-A5_S5_L001_R2_001.fastq.gz  MS-B3_S37_L001_R2_001.fastq.gz  PS-B3_S18_L001_R2_001.fastq.gz
DC-A2_S19_L001_R1_001.fastq.gz  DH-B1_S27_L001_R1_001.fastq.gz  LM-B1_S44_L001_R1_001.fastq.gz  LP-B2_S1_L001_R1_001.fastq.gz  MS-C1_S39_L001_R1_001.fastq.gz
DC-A2_S19_L001_R2_001.fastq.gz  DH-B1_S27_L001_R2_001.fastq.gz  LM-B1_S44_L001_R2_001.fastq.gz  LP-B2_S1_L001_R2_001.fastq.gz  MS-C1_S39_L001_R2_001.fastq.gz
DC-A3_S20_L001_R1_001.fastq.gz  DH-B2_S28_L001_R1_001.fastq.gz  LM-B4_S45_L001_R1_001.fastq.gz  LP-B4_S3_L001_R1_001.fastq.gz  MS-C2_S38_L001_R1_001.fastq.gz
DC-A3_S20_L001_R2_001.fastq.gz  DH-B2_S28_L001_R2_001.fastq.gz  LM-B4_S45_L001_R2_001.fastq.gz  LP-B4_S3_L001_R2_001.fastq.gz  MS-C2_S38_L001_R2_001.fastq.gz
DC-A4_S21_L001_R1_001.fastq.gz  DH-B3_S29_L001_R1_001.fastq.gz  LM-B5_S46_L001_R1_001.fastq.gz  LP-B5_S2_L001_R1_001.fastq.gz  MS-C4_S40_L001_R1_001.fastq.gz
```

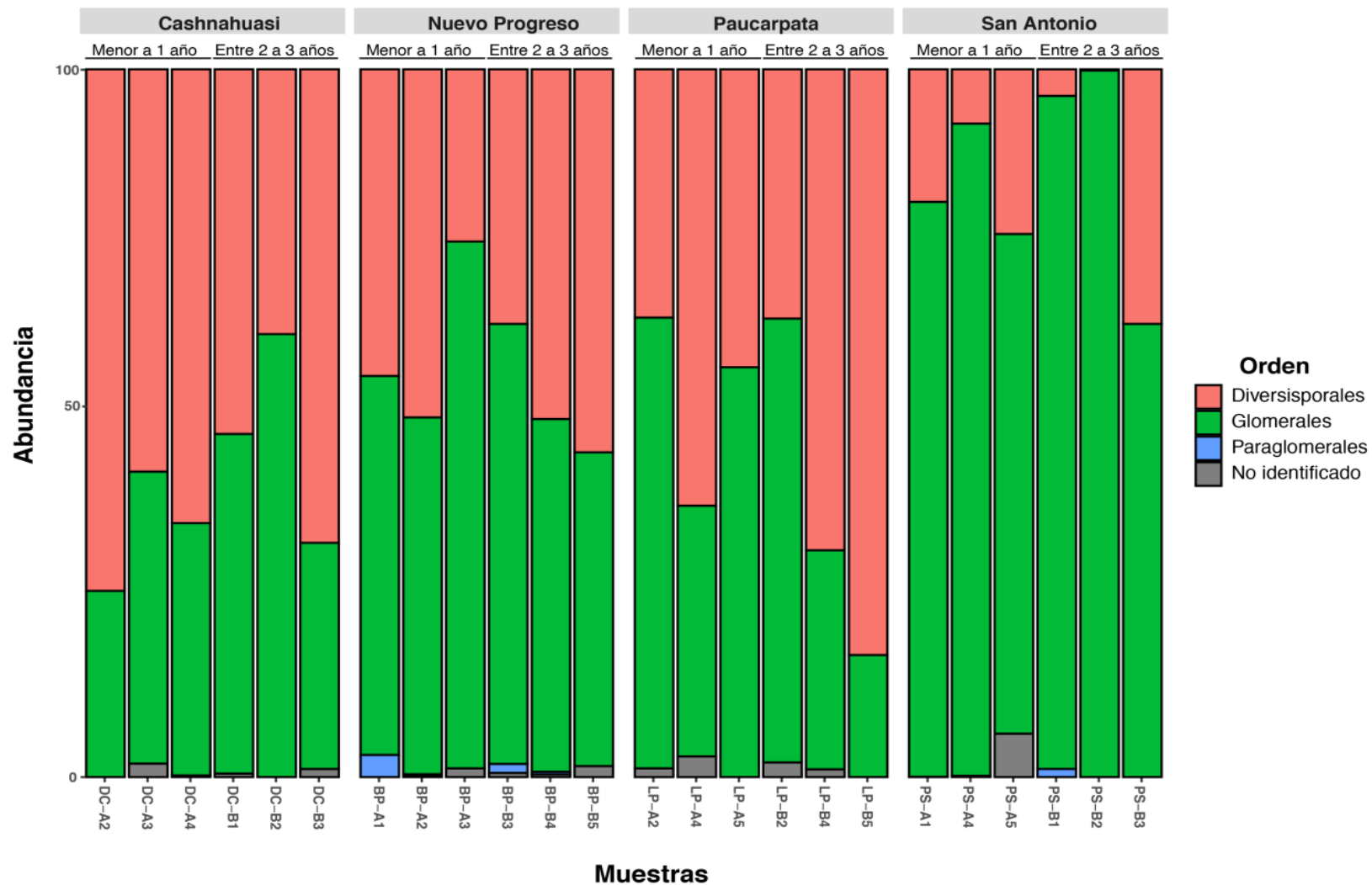

Anexo 10: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a café (Nivel taxonómico: Orden)



Anexo 11: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a café (Nivel taxonómico: Especie)



Anexo 12:: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a sachu inchi (Nivel taxonómico: Orden)



Anexo 13: Composición taxonómica de las muestras de HMA asociadas a sachá inchi (Nivel taxonómico: Especie)

