

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad Ciencias de la Vida

Estudio de la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares provenientes de dos sistemas agroforestales en plantaciones de cacao, un primer paso hacia la obtención de biofertilizante.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Thalía Vanessa Castillo Celi

Ángel Andrés Olaya Villavicencio

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mi familia por acompañarme en el transcurso de mi carrera y apoyarme en cada paso que he dado.

Thalía Castillo

Dedico este trabajo con mucho afecto a mi familia, por apoyarme, darme consejos, felicitarme por mis logros y ser mis pilares que me ayudan a mantenerme firme.

Ángel Olaya

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor Milton Barcos por confiar en mi para la realización de este proyecto, al co-tutor Jaime Naranjo por su apoyo incondicional y sus enseñanzas, a mi compañero y amigo Ángel Olaya por formar parte de este proyecto el cual hemos formado un gran equipo y a mis amigos por su apoyo.

Thalía Castillo

Agradezco a la vida por permitirme conocer personas maravillosas en el transcurso de la carrera universitaria, por mencionar algunos compañeros como Thalía Castillo de quien he recibido ayuda y buenas vibras para la realización de este proyecto igualmente agradezco a mis amigos, Angelyne Cucalón, Karla Barzallo y Carlos Bone, así como a mi tutor Milton Barcos y cotutor Jaime Naranjo por su disposición, ayuda y buenos consejos y a todos quienes me apoyaron en este triunfo.

Ángel Olaya

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Thalía Vanessa Castillo Celi y Ángel Andrés Olaya Villavicencio y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Thalía Vanessa Castillo
Celi

Ángel Andrés Olaya
Villavicencio

EVALUADORES

Diego Arturo Gallardo Polit M.Sc

PROFESOR DE LA MATERIA

Milton Senen Barcos Arias Ph.D

PROFESOR TUTOR

.....
Jaime Alberto Naranjo Morán M.Sc

PROFESOR COTUTOR

RESUMEN

En Ecuador, existe una baja productividad de los cultivos convencionales de cacao (*Theobroma cacao*), además una aplicación intensiva de fertilizantes y agrotóxicos, que perjudican a los productores a corto y largo plazo. Este estudio se enfocó en identificar la diversidad, de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que se encuentran asociados a dos agroecosistemas de cultivo de cacao, en el cantón Vinces provincia de Los Ríos.

Se escogió dos tipos de cultivo de cacao, uno orgánico hacienda “La Americana” y otro con aplicación de agrotóxicos hacienda “Edén”, en donde se determinó el porcentaje de micorrización, densidad de esporas presentes en el suelo, identificación taxonómica de esporas además análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo.

El porcentaje de colonización en raíces fue mayor en la hacienda La Americana, con un valor de 54.9%, mientras que en la hacienda Edén se obtuvo un valor de 8.3%. La densidad de esporas que se reportó para la hacienda La Americana fue 175.9 esporas/100 g de suelo a diferencia con la hacienda Edén con un valor de 61.5 esporas/ 100 g de suelo seco. Se identificaron 6 géneros y 26 especies: *Glomus* (12), *Acaulospora* (7), *Ambispora* (4), *Pacispora* (3), *Diversispora* (2), *Entrophospora* (1).

En las dos haciendas estudiadas existe una amplia diversidad de especies de esporas de HMA, lo que significa que ambos agroecosistemas pueden ser biodiversos. Existe mayor micorrización y densidad de esporas en la hacienda orgánica ya que está asociada a la forma de cultivo, estructura del suelo y composición.

Palabras Clave: micorrizas, simbiosis, hongos, cacao, bio-insumos.

ABSTRACT

In Ecuador, exist a low productivity of conventional cocoa crops (Theobroma cacao), as well as an intensive application of fertilizers and pesticides, which harm producers in the short and long term. This study focused on identifying the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that are associated with two cocoa cultivation agroecosystems, in the canton Vinces province of Los Ríos.

Were chosen two types of cocoa cultivation, one organic "Hacienda La Americana" and another with application of agrochemicals "Hacienda Eden", where the percentage of mycorrhization, density of spores present in the soil, taxonomic identification of spores and analysis were determined of the physicochemical properties of the soil.

The percentage of mycorrhization was higher in the Hacienda La Americana, with a value of 54.9%, while in the Eden farm a value of 8.3% was obtained. The density of spores that were reported for the La Americana farm was 175.9 spores / 100 g of soil unlike the Eden farm with a value of 61.5 spores / 100 g of dry soil. Were identified 6 genera and 26 species: Glomus (12), Acaulospora (7), Ambispora (4), Pacispora (3), Diversispora (2), Entrophospora (1). In the two farms studied there is a wide diversity of AMF spore species, which means that both agroecosystems can be biodiverse. There is greater mycorrhization and density of spores in the organic farm since it is associated with the form of cultivation, soil structure and composition.

Keywords: mycorrhizae, symbiosis, fungi, cocoa, bio-inputs.

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
Figura 2.1 Diagrama	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
CAPÍTULO 1.....	11
1. Introducción	11
1.1 Descripción del problema	12
1.2 Justificación del problema.....	12
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo general	12
1.3.2 Objetivos específicos	13
1.4 Marco teórico	13
1.4.1 Hongos micorrícicos arbusculares (HMA).....	13
1.4.2 Biología de los HMA.....	13
1.4.3 Clasificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	14
1.4.4 Cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	14
1.4.5 Agroecosistemas.....	16
1.4.6 Las micorrizas arbusculares en los agroecosistemas	16
1.4.7 Agroecosistemas en plantaciones de cacao de Ecuador.....	16
CAPÍTULO 2.....	17

2.	Metodología	17
2.1	Área de estudio.....	17
	Figura 2.1 Diagrama	17
2.2	Recolección de muestras.....	18
2.2.1	Muestras para observar la colonización en raíces	18
2.2.2	Muestras para cuantificar las esporas.....	18
	Figura 2.2 Diagrama para la obtención de muestras de las haciendas La Americana y Edén, Vinces – Los Ríos.....	18
2.3	Determinación del porcentaje de colonización de raíces	18
	Figura 2.3 Determinación el porcentaje de micorrización en cacao.....	19
2.4	Extracción de esporas de HMA	19
	Figura 2.4 Diagrama para extracción de esporas de HMA	20
2.5	Conteo e identificación de esporas de HMA.....	20
2.5.1	Conteo de esporas.....	20
	Figura 2.5 Diagrama para conteo e identificación de esporas de HMA	21
2.5.2	Identificación taxonómica	21
	CAPÍTULO 3.....	22
3.	Resultados Y ANÁLISIS.....	22
3.1	Porcentaje de colonización en raíces de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	22
	Tabla 3.1 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “La Americana”	22
	Tabla 3.2 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “Edén”	23
	Figura 3.1 Porcentajes de colonización de raíces en la hacienda La Americana y Edén	23
3.1.1	Micorrización en cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	23
	Figura 3.2 Micorrización de cacao en hacienda La Americana.....	24

Figura 3.3 Micorrización de cacao observado en hacienda Edén. Vesículas e hifas: a - f	25
3.2 Densidad de esporas en la hacienda “La Americana” y “Edén”	25
Tabla 3.3 Densidad de esporas en la hacienda “La Americana”	26
Tabla 3.4 Densidad de esporas en la hacienda “Edén”	26
Figura 3.4 Densidad de esporas en la hacienda La Americana y Edén	27
3.3 Identificación taxonómica de HMA	27
3.3.1 Identificación de HMA en la hacienda La Americana	27
	28
Figura 3.5 Identificación taxonómica de HMA en hacienda La Americana	28
3.3.2 Identificación de HMA en la hacienda Edén	28
Figura 3.6 Identificación taxonómica de HMA en la hacienda Edén. a) <i>Glomus</i> sp. [1], b) <i>Glomus</i> sp. [2], c) <i>Glomus</i> sp. [3], d) <i>Glomus</i> sp. [4], e) <i>Acaulospora longula</i> , f) <i>Glomus aureum</i> , g) <i>Ambispora</i> sp. [1], h) <i>Acaulospora denticulada</i> , i) <i>Ambispora</i> sp. [2], j) <i>Ambispora</i> sp. [3], k) <i>Acaulospora alpina</i> , l) <i>Entrophospora</i> , m) <i>Pacispora chimonobambusae</i> , n) <i>Acaulospora</i> sp. [1], ñ) <i>Glomus</i> sp. [5], o) <i>Glomus</i> sp. [6], p) <i>Acaulospora</i> sp. [2], q) <i>Pacispora</i> sp. [1], r) <i>Glomus</i> sp. [7], s) <i>Pacispora</i> sp. [2]. ...	29
3.4 Análisis nutricional del suelo de los agroecosistemas de cacao	29
Tabla 3.5 Parámetros fisicoquímicos del suelo en dos haciendas de distintos agroecosistemas	30
Tabla 3.6 Macro y microelementos del suelo en dos agroecosistemas	31
CAPÍTULO 4	32
4. Conclusiones Y Recomendaciones	32
4.1 Conclusiones	32
4.2 Recomendaciones	32
BIBLIOGRAFÍA	34
APÉNDICES	38

ABREVIATURAS

CIBE	Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador
ESPAE	Escuela de Negocios de la ESPOL
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FADCOM	Facultad de Arte, Diseño y Comunicación Audiovisual
HMA	Hongos Micorrícicos Arbusculares
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador

SIMBOLOGÍA

°C	Grado Celsius
µm	Micrómetro
E/ 100 g S	Esporas por cada cien gramos de suelo
E/ g S	Esporas por cada gramo de suelo
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
KOH	Hidróxido de potasio
meq/ mL	Miliequivalentes por cada mililitro
mL	Mililitro
PVLG	Polivinil alcohol-lacto-glicerol
rpm	Revoluciones por minuto
ug/ L	Microgramos por cada litro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Diagrama de zona de estudio en la provincia de Los Ríos – Ecuador.....	15
Figura 2.2 Diagrama para la obtención de muestras de las haciendas La Americana y Edén, Vinces – Los Ríos.....	16
Figura 2.3 Determinación el porcentaje de micorrización en cacao.....	17
Figura 2.4 Diagrama para extracción de esporas de HMA.....	18
Figura 2.5 Diagrama para conteo e identificación de esporas de HMA.....	19
Figura 3.1 Porcentajes de colonización de raíces en la hacienda La Americana y Edén.....	21
Figura 3.2 Micorrización de cacao en hacienda La Americana.....	22
Figura 3.3 Micorrización de cacao observado en hacienda Edén.....	23
Figura 3.4 Densidad de esporas en la hacienda La Americana y Edén.....	25
Figura 3.5 Identificación taxonómica de HMA en hacienda La Americana.....	26
Figura 3.6 Identificación taxonómica de HMA en la hacienda Edén.....	27 y 28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación actual de los hongos formadores de micorrizas arbusculares [Realizado a partir de Schüßler et al., 2010]	14
Tabla 3.1 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “La Americana”	20
Tabla 3.2 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “Edén”	21
Tabla 3.3 Densidad de esporas en la hacienda “La Americana”	23
Tabla 3.4 Densidad de esporas en la hacienda “Edén”	23
Tabla 3.5 Parámetros físicos químicos del suelo en dos haciendas de distintos agroecosistemas	27
Tabla 3.6 Macro y microelementos del suelo en dos agroecosistemas	28

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) representa el primer eslabón de la cadena agroindustrial a nivel global (Banco de Desarrollo de América Latina, 2019) superando los 4.5 millones de toneladas distribuidas en África, América, Asia y Oceanía (International Cocoa Organization, s.f.). En el Ecuador produce aproximadamente 253000 toneladas de cacao la cual el 70% de la producción corresponde al cacao fino y de aroma (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, s.f.). Su producción y exportación ha generado una actividad económica muy significativa en diferentes zonas de la Costa ecuatoriana (ESPAE Graduate School of Management, 2016). En el último reporte del Banco Central del Ecuador (2019) se ha presentado cifras positivas en el 2017, alcanzando el 14% del volumen de producción de cacao. Sin embargo, en el año 2018, alcanzó solo el 3% del volumen de la producción debido a la presencia de enfermedades fitosanitarias, factores climáticos adversos y el uso indiscriminado de químicos.

En consecuencia, es necesario buscar alternativas ambientales que aporten a mejorar la nutrición del suelo, tanto en su composición física, química y biológica, denominada biota que conforma diversidad de microorganismos. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son los microorganismos más usados en el suelo ya que realizan una asociación simbiótica mutualista interactuando sólo con el 80% de las plantas terrestres (Rojas et al., 2014).

La interacción de las micorrizas arbusculares y la rizosfera se ve fortalecida por un proceso simbiótico, donde el hongo se ve favorecido (Cuadros et al., 2011), mientras que la planta se provee de nutrientes captados por las micorrizas, además le ayuda con la prevención temprana contra patógenos en las raíces (Camarena-Gutiérrez et al., 2012).

La información que se tiene acerca de la diversidad de HMA en las plantaciones de cacao a nivel país es limitada, por lo que surge la necesidad de realizar esta investigación para buscar información que permita optimizar los procesos de producción orgánica en el sector cacaotero, implementando opciones más amigables con el medio ambiente y ofrecer productos con menos uso de fertilizante químico.

1.1 Descripción del problema

En Ecuador, las nuevas tendencias de aplicación de biotecnologías asociadas al uso de hongos micorrícicos arbusculares en las industrias agroforestales cada vez van en aumento para una mejor producción sostenible y sustentable, sin embargo, en la producción del cacao (*Theobroma cacao*) la información que se tiene acerca de la diversidad de los hongos micorrícicos arbusculares es escasa.

1.2 Justificación del problema

En nuestro país, contamos con una amplia gama de especies que nos ha posicionado en uno de los países con mayor biodiversidad del planeta, sin embargo, todas las áreas no han sido incursionado a profundidad, este es el caso de las micorrizas, que emplean un papel fundamental tanto nutricional como de protección frente a los agentes patógenos a las plantas asociadas a ellas.

Las zonas productoras durante muchos años han usado agroquímicos para obtener mejores resultados de productividad, pero actualmente las técnicas de cultivo orgánico se han ido implementado poco a poco, por cumplir con normativas internacionales para productos de exportación y con la finalidad de garantizar alimentos que durante su cultivo hayan tenido poca o nula exposición a pesticidas o fertilizantes.

El cultivo de cacao en Ecuador genera una amplia fuente de empleo que engloba a pequeños y grandes productores dedicados a esta actividad, debido a esto es importante establecer alternativas que ayuden a mejorar la productividad de sus cultivos, como es el uso de microorganismos eficientes como las micorrizas que favorecen la nutrición de las plantas. Por lo que en esta investigación se propuso estudiar la diversidad de micorrizas arbusculares en dos agroecosistemas de producción de cacao que emplean la variedad nacional y el clon CCN51.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Comparar la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en dos agroecosistemas de producción de cacao (*Theobroma cacao*) en el cantón Vinces.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia e intensidad de colonización en las raíces del cacao (*Theobroma cacao*) en base al número de componentes de HMA presentes en los 100 campos de observación.
2. Cuantificar las esporas de hongos micorrícicos arbusculares en suelos procedentes de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao*)
3. Aislar y analizar la taxonomía de esporas de hongos micorrícicos arbusculares autóctonos mediante la caracterización básica de su composición.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Son agrupaciones mutualistas entre hongos del phylum *Glomeromycota* y los grandes grupos de plantas (cultivadas y silvestres) (C et al., 2011), debido a que la interacción simbiótica le permite al hongo invadir el interior de la raíz. Las micorrizas son tan antiguas al igual que las plantas ya que sus asociaciones establecen un carácter ancestral de las especies vegetales. Al hallar registros fósiles en plantas del Devónico (aproximadamente 460 millones de años). Su intervención fue importante en el proceso de colonización en el medio terrestre por parte de las plantas (Ramos Zapata et al., s.f.).

1.4.2 Biología de los HMA

Las HMA proceden de hifas que provienen de propágulos existente en el suelo. La hifa al estar conectada con la superficie de una célula epidérmica de la raíz, forma un apresorio que en seguida, surge la hifa colonizadora, la cual penetrará dicha célula o atraviesa el espacio intercelular. En la zona interna, las hifas penetran intracelularmente la corteza de la raíz formando arbusculos que ayuda al intercambio de nutrientes entre los participantes de la simbiosis (Morelos et al., 2011). En otros géneros de estos hongos, se ha observado formación de estructuras conocidas como vesículas que están conformadas de lípidos y se encuentran intercelularmente en la corteza de la raíz la cual actúan como reservorios de nutrientes para el hongo (Gómez et al., 2007).

1.4.3 Clasificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se clasifican en nueve familias (Tabla 1.1). Actualmente, se han definido a nivel mundial cerca de 200 especies, sin embargo, no se ha conseguido determinar un mayor número de especies debido al ser simbiontes obligados, necesita para su reproducción la colaboración de plantas hospedadoras. Con todo, se prevé que aumente el número de especies de micorrizas arbusculares (Ramos Zapata et al., s.f.).

Tabla 1.1 Clasificación actual de los hongos formadores de micorrizas arbusculares [Realizado a partir de Schüßler et al., 2010]

Phylum: Glomeromycota Clase: Glomeromycetes		
Orden	Familia	Género
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
		<i>Funneliforme</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>
Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i> <i>Racocetra</i>
	Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> , <i>Kuklospora</i>
	Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i> , <i>Otopora</i> , <i>Redeckera</i>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
Archaeosporales	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> , <i>Intraspora</i>

1.4.4 Cacao (*Theobroma cacao*)

Theobroma cacao pertenece al género *Theobroma* es la única en esta sección. Se distribuye desde la región de la cuenca del Amazonas y las Guayanas hasta el

sur de México. Sin embargo, la llegada de los europeos a América, el cultivo de cacao se ha propagado al Caribe, Asia y África convirtiéndose en la actualidad pantropical, particularmente cultivado entre 10°N y 10°S. A partir de esto, los mayores productores son Costa de Marfil, Ghana e Indonesia (Dostert et al., 2012). Es un árbol o arbusto semicaducifolio de talla pequeña que alcanza hasta 12 m de altura pero en cultivo se mantiene entre 4 – 8 m. El tallo es glabro o parcialmente pubescente en ejes jóvenes (Rice & Greenberg, 2000). La corteza presenta en lo externo un color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada. En cambio, la parte interna muestra un color castaño claro, sin sabor (*Theobroma cacao*, s. f.).

1.4.4.1 Interacción biológica

El cacao realiza una simbiosis obligada con hongos micorrícicos, principalmente con *Scutellospora calospora* y *Glomus mosseae*. Estas micorrizas les aporta una ventaja competitiva especialmente en los suelos pobres en nutrientes (*Theobroma cacao*, s. f.).

1.4.4.2 Cultivo de cacao

Las plantaciones de cacao pueden ser monocultivo o plantaciones forestales o frutales intercalados. Se cultivan a la sombra de bosques raleados o en remanentes de bosque conservando la estructura natural del bosque. El cultivo se lo desarrolla a principios del periodo de lluvia con suficiente humedad en el suelo. La distancia entre plantas de cacao se relaciona fuertemente con el tipo de cultivo oscilando entre 2.5 x 2.5 m y 5 x 5 m (Dostert et al., 2012).

1.4.4.3 Zonas productoras de cacao en Ecuador

La región costa presenta la mayor superficie cosechada de cacao según el reporte (Guerrero López, 2015) registrándose en el año 2009 el 80% de la superficie total a nivel Nacional. Las provincias que contribuyen a este porcentaje son Manabí, Los Ríos y Guayas seguido de Esmeraldas y el Nororiente de El Oro. Por otra parte, en la región Sierra, las provincias que participan en menor cantidad son Cotopaxi, Bolívar y Cañar. En cuanto a la región Oriente, la provincia de Orellana, Sucumbíos y Napo se ha estimado un incremento de 20000 ha de cacao de tipo Nacional contribuyendo en algunos años a la exportación. Referente a la provincia

de Zamora Chinchipe se encuentra en desarrollo en plantaciones de cacao (Guerrero López, 2015).

1.4.5 Agroecosistemas

Los ecosistemas agrícolas son sistemas intervenidos, esto significa que su origen y mantenimiento están relacionados a la actividad del hombre cambiando su naturaleza para adquirir recursos de ella, principalmente alimentos (Sans, 2007). Esto incluye numerosas modalidades, de lo más natural del pigmeo en su selva hasta otras muy artificiales conservando grandes contribuciones energéticas (Montserrat & Villar Pérez, 1995).

La organización de los agroecosistemas está conformada por cuatro niveles epigeos y el quinto hipogeo, favoreciendo a la restauración de la fertilidad mediante los reciclados: a) geofísico, con suelo y atmósfera, b) productor por la fotosíntesis favorecida y la respiración frenada, c) consumidor con fitófagos gregarios y d) ecológico y cultural, de hombres asociados, usufructuarios de la información acumulada. Las limitaciones ecológicas están representadas en cada uno de estos niveles demostrando con claridad las posibilidades agronómicas estableciendo lo que pueden realizar tanto las plantas productoras como animales dependientes o el hombre dominante (Montserrat & Villar Pérez, 1995).

1.4.6 Las micorrizas arbusculares en los agroecosistemas

Los HMA juega un rol importante en los agroecosistemas ya que por medio de las simbiosis las plantas favorecen de manera tales como, adquirir nutrientes minerales del suelo, optimizar su tolerancia a estrés biótico y abiótico, minimizar la competencia entre plantas mediante la transferencia de carbono a través de las hifas extraradicales, y a su vez, modular la diversidad y productividad de las plantas. Además, es sustancial conocer el papel de la comunidad de plantas en la estructura y diversidad de la comunidad de HMA (C et al., 2011).

1.4.7 Agroecosistemas en plantaciones de cacao de Ecuador

La participación de sistemas de producción ha alcanzado a mantener características de diversidad genética al interior del cultivo, al mismo tiempo, el mantenimiento de una alta diversidad de especies de plantas y animales. Así mismo, los sistemas agroforestales de cacao por su compleja estructura y gran

diversidad son significativos para la conservación de especies en países megadiversos como México, Ecuador, Perú, Tanzania, Indonesia y Australia. En Ecuador, es muy tradicional el cultivo de cacao, dado que forma parte de los rubros más importantes en el sector campesino, puesto que su sistema de producción agroforestal empírico genera escasos ingresos al productor en todo el año. En cuanto a su diversidad, aporta significativamente a la seguridad alimentaria de las familias que viven de este cultivo (Navarrete et al., 2018).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

El muestreo se realizó en dos haciendas de cultivos de cacao, desarrollados en el cantón Vinces en la Provincia de Los Ríos las cuales presentaron dos agroecosistemas diferentes; la hacienda denominada “La Americana” posee un cultivo orgánico con variedades de cacao nacional fino de aroma con una edad de 25 años, mientras que la hacienda “Edén” posee un cultivo convencional con la variedad CCN-51 y presenta una edad de 8 años. El estudio se lo realizó en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL) entre los meses de octubre 2019 y enero 2020.

La hacienda Edén se encuentra ubicada a una latitud de $1^{\circ}38'23.84''S$ y longitud de $79^{\circ}48'14.86''O$.

La hacienda La Americana se encuentra ubicada a una latitud de $1^{\circ}38'47.12''S$ y longitud de $79^{\circ}49'8.02''O$.

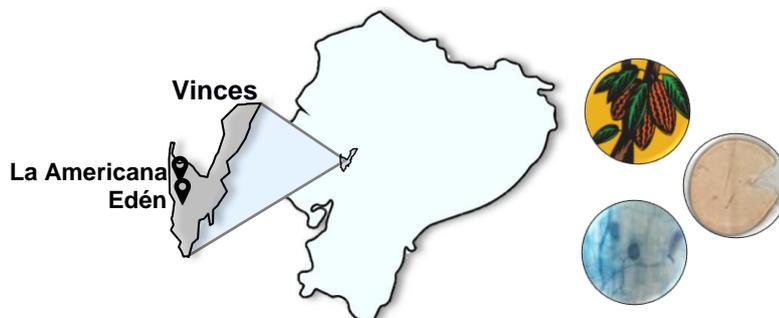


Figura 2.1 Diagrama de la zona de estudio en la provincia de Los Ríos - Ecuador

2.2 Recolección de muestras

2.2.1 Muestras para observar la colonización en raíces

En cuanto a la colecta de raíces de árboles o arbustos se tomaron aquellas que son objeto de estudio ya que en el campo es común encontrar raíces de otras especies. Razón por la cual se debe seguir las raíces principales desde el tronco. Se seleccionan las raíces secundarias más finas para observar las estructuras de los HMA.

2.2.2 Muestras para cuantificar las esporas

La extracción del suelo se la realizó entre 0 – 20 cm en la zona radicular de la especie en estudio y fueron almacenadas en bolsas o contenedores.

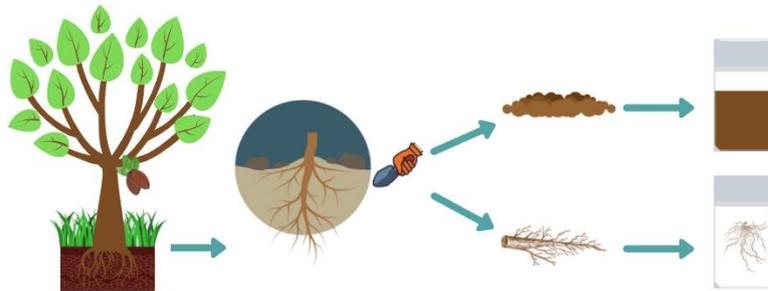


Figura 2.2 Diagrama para la obtención de muestras de las haciendas La Americana y Edén, Vinces – Los Ríos

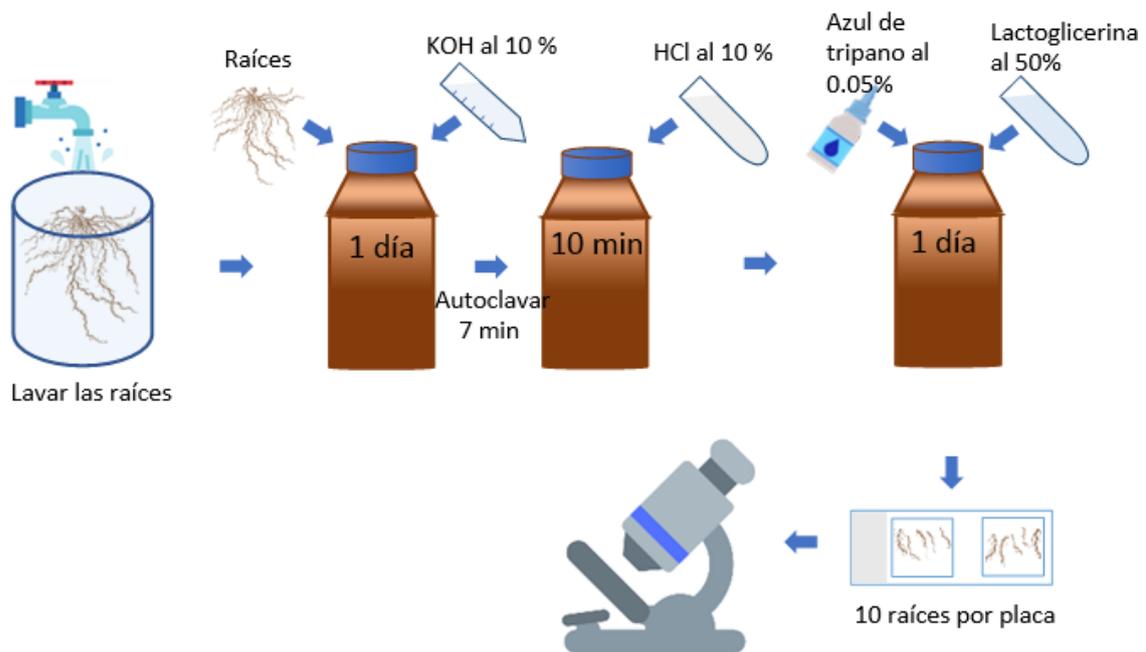
2.3 Determinación del porcentaje de colonización de raíces

Las raíces de cada muestra fueron lavadas con abundante agua y se las colocó encima de papel absorbente para secarlas. Posterior a esto, se las introdujo en frascos de vidrio de color ámbar, la cual se las cubrió con solución KOH (Hidróxido de potasio) al 10% por un día con la finalidad de clarificar las raíces. Las raíces fueron autoclavadas por 7 minutos a 25°C (15 lb de presión). Se desechó el KOH con abundante agua y se le agregó HCl al 10% durante 10 minutos. Luego se retiró el HCl (no se enjuaga con agua) y se adicionó el tinte azul de tripano al 0.05% con lactoglicerol al 50% por un día. La tinción se la realizó según el protocolo de Phillips & Hayman (1970).

Para la evaluación, se colocó 30 trozos de las raíces procesadas en tres portaobjetos de manera paralela adicionándole unas gotas de acetoglicerol o ácido láctico a cada portaobjeto se divide en dos grupos. Luego, se estableció el

porcentaje de colonización de raíces mediante arbusculos, hifas y vesículas en base al número presentes en los 360 campos de observación. El análisis se lo realizó en un microscopio óptico y se aplicó la fórmula de Sieverding (1984) para determinar el porcentaje de micorrización en cada submuestra mencionada a continuación:

$$\text{Porcentaje de micorrización (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ campos infectados (hifas, vesículas y arbusculos)}}{\text{Total de campos observados}}$$



Protocolo de Phillips & Hayman (1970)

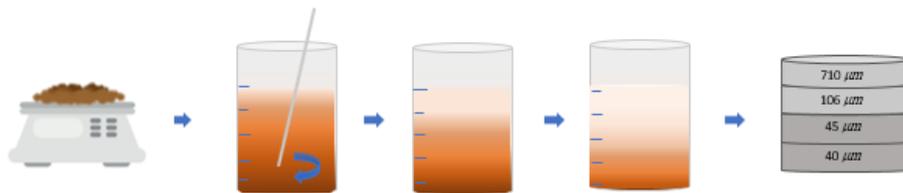
Figura 2.3 Determinación del porcentaje de micorrización en cacao

2.4 Extracción de esporas de HMA

Con respecto al proceso de colección de esporas de HMA se aplicó el método de cribado y decantado húmedo por Gerdemann y Nicolson (1963), la cual consiste en homogenizar la muestra de suelo que a su vez es pesada 100 g y se la colocó en un vaso de precipitación de 1000 mL añadiéndole agua hasta el límite del recipiente. Luego se mezcló el suelo con una varilla de vidrio por 20 segundos y se deja reposar 2 minutos para permitir que las partículas más pesadas y el material orgánico se asienten, para así, los remanentes de la raíz-suelo-esporas

queden en suspensión. El agua con las partículas suspendidas se vertió en los tamices de 40 y 45 μm las cuales deben ir colocadas de mayor a menor. Se llena de nuevo el vaso de precipitación con la presión del agua en la llave para suspender las partículas finas y así vaciar de nuevo el contenido en dichos tamices. La operación se repite las veces que sea necesario hasta que la suspensión de partículas en el agua sea casi nula y se muestre el recipiente casi transparente.

Los tamices considerados para procesar las esporas son 40 y 45 μm .



Método de cribado y decantado por Gerdemann y Nicolson (1963)

Figura 2.4 Diagrama para extracción de esporas de HMA

2.5 Conteo e identificación de esporas de HMA

2.5.1 Conteo de esporas

El material colectado en los tamices, se lo depositó en tubos falcón de 15 ml. Para cada tamiz de las dos muestras, se vació el contenido en tres tubos falcón distribuidos en partes iguales. Se le agrega agua al tubo alrededor de $\frac{3}{4}$ parte del área total para que haya un equilibrio dentro de la centrífuga.

Se los colocó en la centrífuga a 5000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 20°C para separar algunos residuos de baja densidad del material usado. Se desecha el agua después de la centrifugación sin descartar el suelo y se le adicionó sacarosa 72% + Tween (Polisorbato) 80 en la misma cantidad en la que se le agrego el agua. Se removió el suelo con un agitador de tubos para centrifuga que ayude a suspenderse en la sacarosa. Se lo colocó en la centrífuga a 3000 rpm por 10 minutos con la finalidad de suspender las esporas en la parte superior. Se vertió el sobrenadante en un nuevo tubo falcón.

Para el conteo de esporas se vertió el contenido del tubo falcon en una caja Petri y se cuantificó mediante un cuadrante con 8 campos colocado en el

estereoscopio. El valor se expresó como esporas/100 g de suelo seco, utilizando la ecuación propuesta por Sieverding (1983):

$$No. \text{ esporas} = \left(\frac{\text{esporas contadas}}{\text{peso de la muestra}} \right) \times \frac{pi}{pf} \times 100$$

Donde:

pi: peso inicial de la muestra usada para determinar humedad.

pf: peso final de la muestra para determinar humedad.

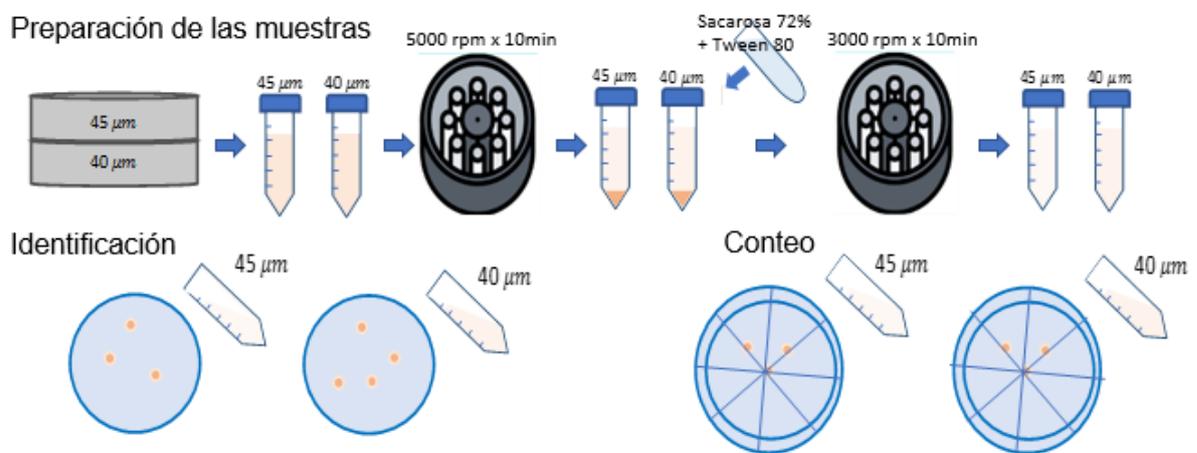


Figura 2.5 Diagrama para conteo e identificación de esporas de HMA

2.5.2 Identificación taxonómica

En relación con la identificación de las esporas, se toma las muestras del conteo y se extraen mediante el uso de una jeringa, las distintas esporas, para luego ser colocadas en portaobjetos en solución Polivinil alcohol-lacto-glicerol (PVLG) para después ser fotografiadas. Cabe mencionar que en cada portaobjeto se coloca 10 esporas, que posteriormente se comparan con el manual de la Universidad de Nuevo León -México del 2011.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Porcentaje de colonización en raíces de cacao (*Theobroma cacao*)

El porcentaje de colonización en raíces de cacao, se determinó a partir de la observación en microscopio de 9 campos por raíz y 10 segmentos de raíces por muestra, con triplicado de 5 submuestras por hacienda. Se analizó; hifas, vesículas y arbusculos dependiendo la micorrización, sea; superficial, media e inferior.

La hacienda La Americana, se caracteriza por ser de cultivo orgánico, el mayor porcentaje de colonización fue de hifas con una media de 95.8%, seguido de vesículas con 58.0% y arbusculos con 10.9%, la media total del porcentaje de micorrización de esta hacienda fue 54.9% (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “La Americana”

Porcentaje de micorrización en las raíces de cacao				
Árboles muestreados	Hifas (%)	Vesículas (%)	Arbusculos (%)	Porcentaje total de colonización de raíces (%)
1	100.0	100.0	42.2	80.7
2	87.8	46.7	5.6	46.7
3	95.6	50.0	0.0	48.5
4	97.8	73.3	6.7	59.3
5	97.8	20.0	0.0	39.3
Media	95.8	58.0	10.9	54.9
Desviación estándar	4.7	30.1	17.8	16.1
Error estándar	2.1	13.5	8.0	7.2

En la hacienda Edén los resultados se muestran en la tabla 3.2, aquella de cultivo no orgánico, no se observó colonización de arbusculos, la micorrización de hifas

fue 20.7%, de vesículas 4.2% y un total de 8.3%, en general los resultados de esta hacienda son mucho menores que La Americana.

Tabla 3.2 Datos de media, desviación y error estándar de colonización de raíces en la hacienda “Edén”.

Porcentaje de micorrización en las raíces de cacao				
Árboles muestreados	hifas (%)	Vesículas (%)	Arbúsculos (%)	Porcentaje de micorrización Total (%)
1	58.9	20	0	26.3
2	28.9	1.1	0	10
3	0	0	0	0
4	4.4	0	0	1.5
5	11.1	0	0	3.7
Media	20.7	4.2	0	8.3
Desviación estándar	10.7	4	0	4.8
Error estándar	24	8.8	0	10.8

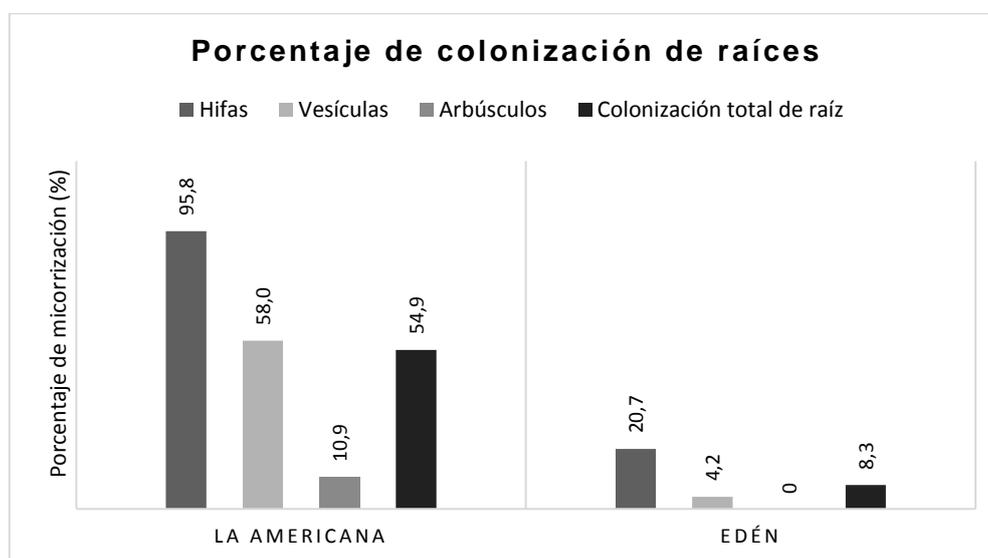


Figura 3.1 Porcentajes de colonización de raíces en la hacienda La Americana y Edén

3.1.1 Micorrización en cacao (*Theobroma cacao*)

La micorrización está presente en los dos cultivos de cacao (nacional fino de aroma y en la variedad CCN-51). La asociación simbiótica entre HMA y las plantas

de cacao sirve para el intercambio de nutrientes y agua hacia la planta desde el hongo, mientras que la planta provee vitaminas e hidratos de carbono, esto se realiza a través de sus estructuras como lo son: hifas, vesículas y arbuscúlos que se pueden observar en base al protocolo de Phillips & Hayman (1970).

3.1.1.1 Micorrización en raíces de cacao observada en la hacienda “La Americana”

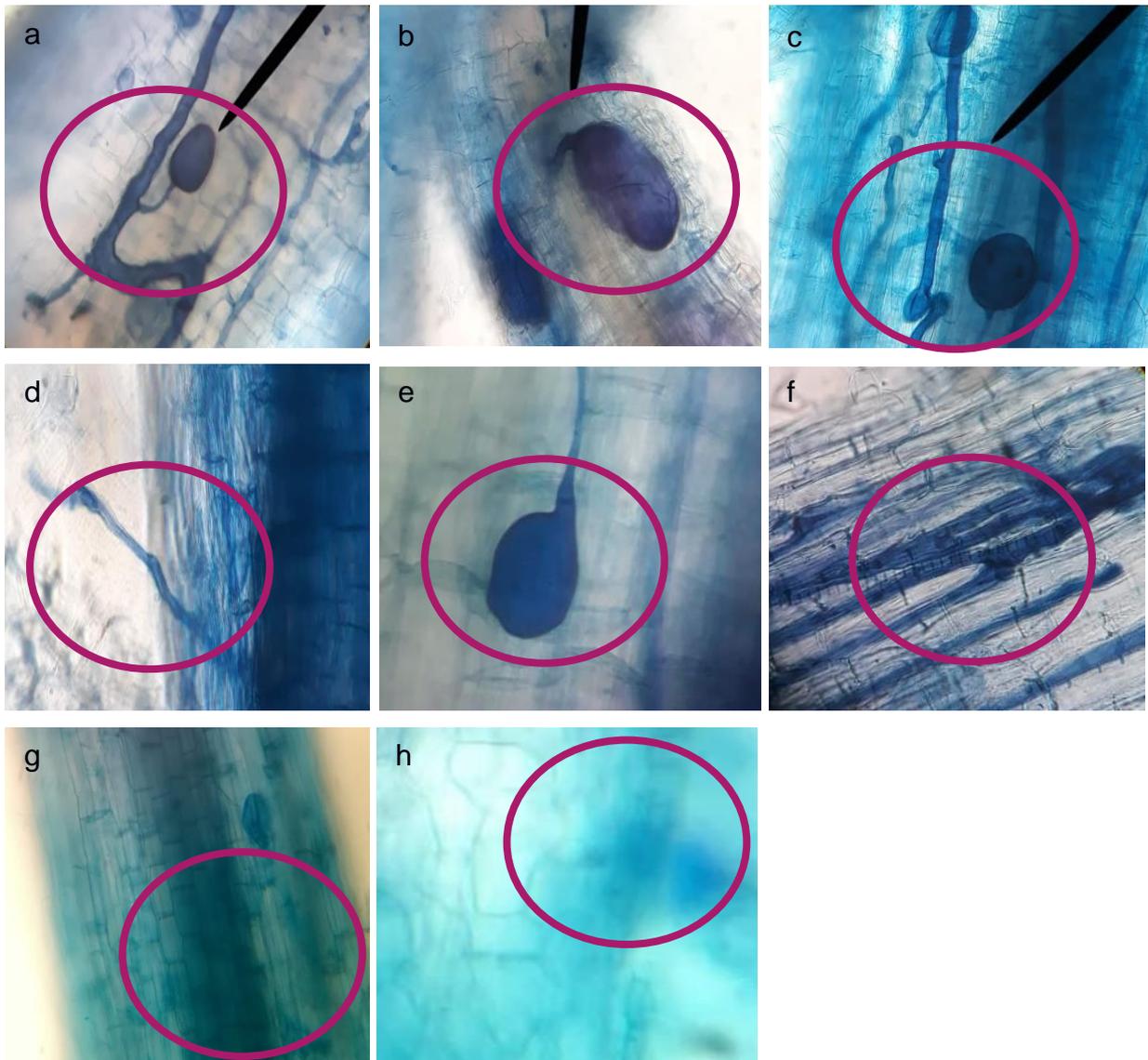


Figura 3.2 Micorrización de cacao en hacienda La Americana. a) vesícula con hifas, b) vesículas, c) vesícula con hifas, d) hifa, e) vesícula e hifa, f) hifas, g) arbuscúlos, h) arbuscúlos.

3.1.1.2 Micorrización en raíces de cacao en hacienda Edén

No se observaron estructuras de arbuscúlos.

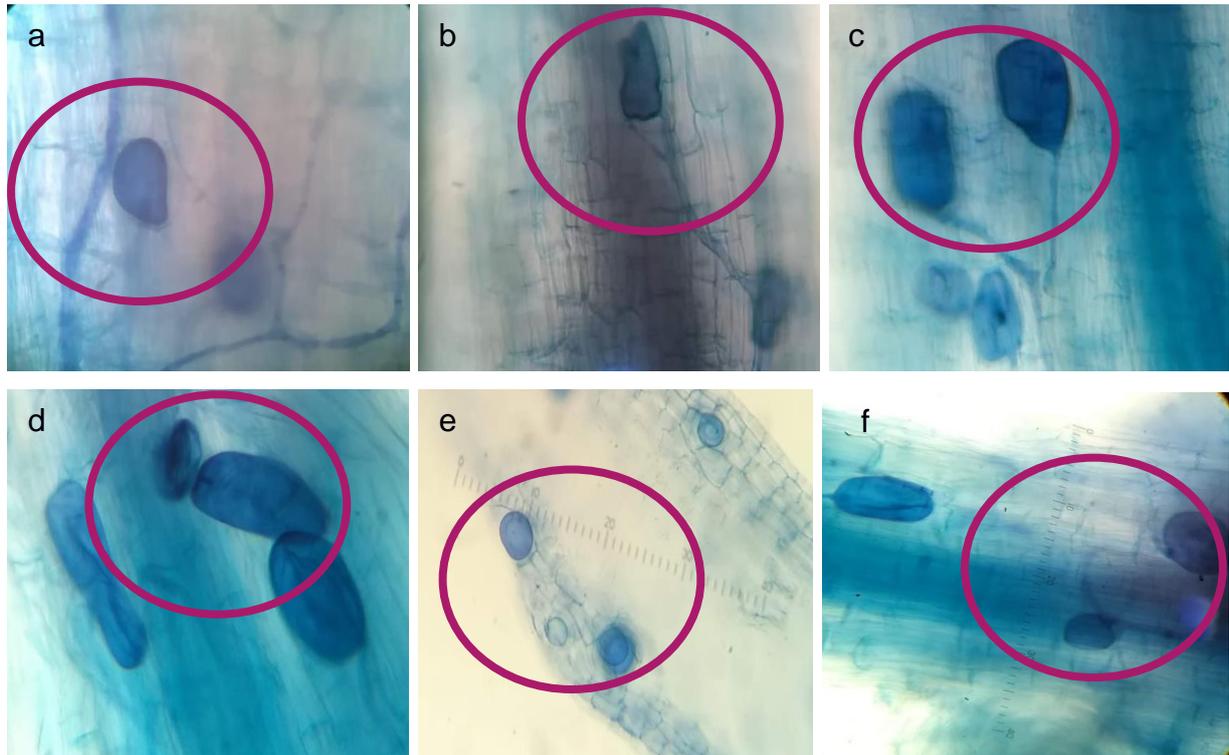


Figura 3.3 Micorrización de cacao observado en hacienda Edén. Vesículas e hifas: a - f

3.2 Densidad de esporas en la hacienda “La Americana” y “Edén”

La densidad de HMA en ambas haciendas esta medida por número de esporas sobre un gramo de suelo. Se catalogó a la densidad de esporas por este criterio; densidad baja < 1 espora / gramo de suelo, densidad media 1 a 10 esporas / gramo de suelo y densidad alta > 10 esporas / gramo de suelo. Tal como se observa en la tabla 3.3.

La densidad de esporas en la hacienda “La Americana” obtuvo una densidad media, las submuestras oscilan entre 1.44 esporas / gramo de suelo y 1.92 esporas / gramo de suelo, con una media de 1.76 esporas / gramo de suelo.

Tabla 3.3 Densidad de esporas en la hacienda “La Americana”

Árboles muestreados	Total de esporas	No. E/ 100 g S	No. E/ 1 g S	Densidad
1	1419	191.7	1.92	Media
2	1300	175.6	1.76	Media
3	1378	186.1	1.86	Media
4	1351	182.5	1.82	Media
5	1065	143.8	1.44	Media
Media	1302.6	175.9	1.76	Media
Error estándar	139.7	18.9		
Desviación estándar	62.5	8.4		

E /100 g S = esporas sobre 100 gramos de suelo

En Edén la densidad de esporas se ubicó en una densidad baja, las submuestras oscilan entre 0.42 esporas / gramo de suelo y 0.77 esporas / gramo de suelo, con una media de 0.62 esporas / gramo de suelo. Ver tabla 3.4.

Tabla 3.4 Densidad de esporas en la hacienda “Edén”

Árboles muestreados	Total de esporas	No. E/100 g S	No. E /1 g S	Densidad
1	508	68.0	0.68	Baja
2	450	60.2	0.60	Baja
3	579	77.4	0.77	Baja
4	467	62.5	0.62	Baja
5	296	39.6	0.40	Baja
Media	460	61.5	0.62	Baja
Error estándar	104.3	14.0		
Desviación estándar	46.6	6.2		

E /100 g S = esporas sobre 100 gramos de suelo

Representación de los datos de esporas sobre 100 gramos de suelo seco (E/ 100 g S). La Americana con densidad media y Edén con densidad baja. Existen diferencias entre la primera correspondiente a una hacienda de cultivo orgánico, comparando con Edén de cultivo no orgánico con aplicación de agrotóxicos (figura 3.4).

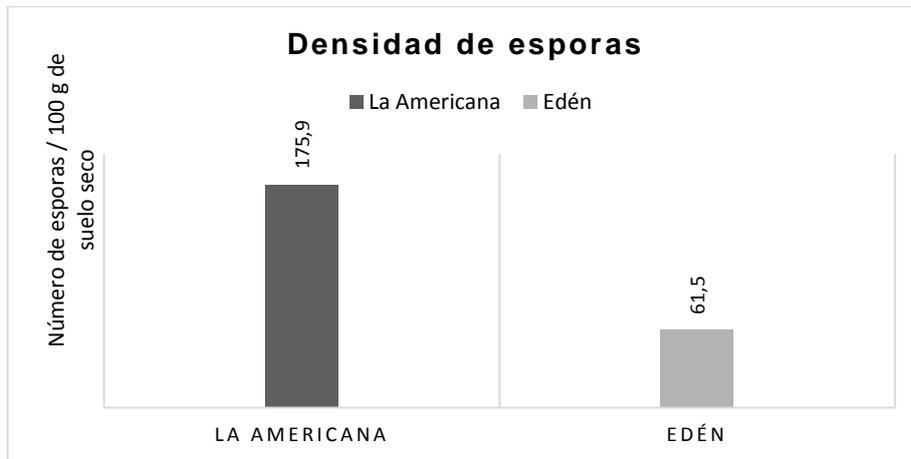


Figura 3.4 Densidad de esporas en la hacienda La Americana y Edén

3.3 Identificación taxonómica de HMA

Con respecto a la identificación taxonómica, se pudo identificar en las dos haciendas; 6 géneros y 29 especies:

Glomus (12), *Acaulospora* (7), *Ambispora* (4), *Pacispora* (3), *Diversispora* (2), *Entrophospora* (1).

3.3.1 Identificación de HMA en la hacienda La Americana

En el agroecosistema de la hacienda La Americana se identificaron 5 géneros de HMA; *Glomus*, *Acualospora*, *Ambispora*, *Pacispora* y *Diversispora*.

Se reconocieron 9 especies; *Glomus* (2), *Acualospora* (2), *Ambispora* (1), *Pacispora* (2) y *Diversispora* (2).

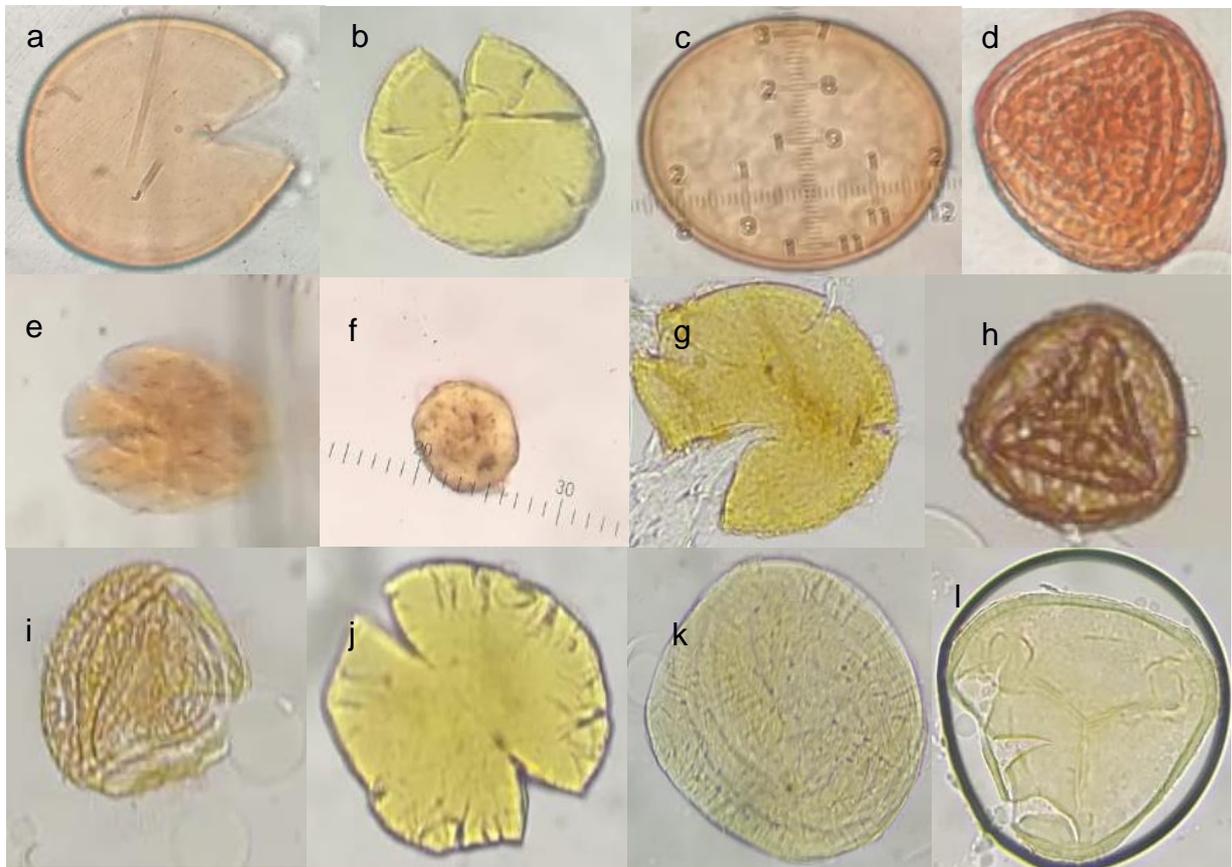
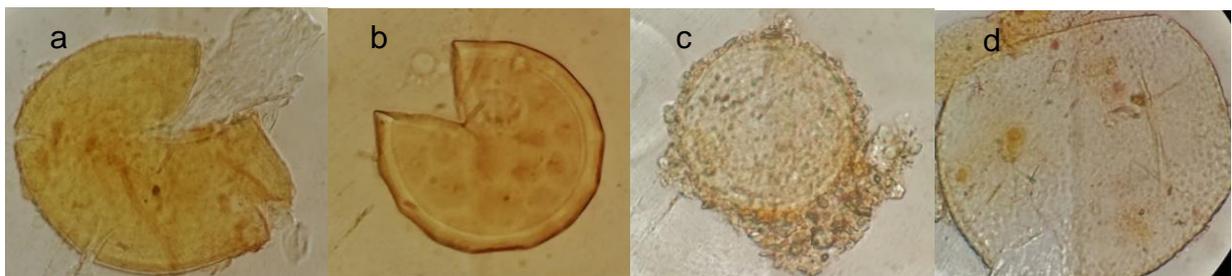


Figura 3.5 Identificación taxonómica de HMA en hacienda La Americana. a) *Acaulospora longula*, b) *Pacispora* sp. [1], c) *Acaulospora longula*, d) *Acaulospora alpina* e) *Diversispora* sp. [1] f) *Diversispora* sp. [2], g) *Ambispora* h) *Acaulospora alpina*, i) *Acaulospora alpina*, j) *Pacispora* sp. [2], k) *Glomus* sp. [1], l) *Glomus* sp. [2].

3.3.2 Identificación de HMA en la hacienda Edén

En el agroecosistema de la hacienda Edén se identificaron 5 géneros; *Glomus*, *Acaulospora*, *Ambispora*, *Pacispora* y *Entrophospora*. Se observaron 20 especies de HMA, correspondientes a; *Glomus* (10), *Acaulospora* (5), *Ambispor* (3), *Pacispora* (1) y *Entrophospora* (1).



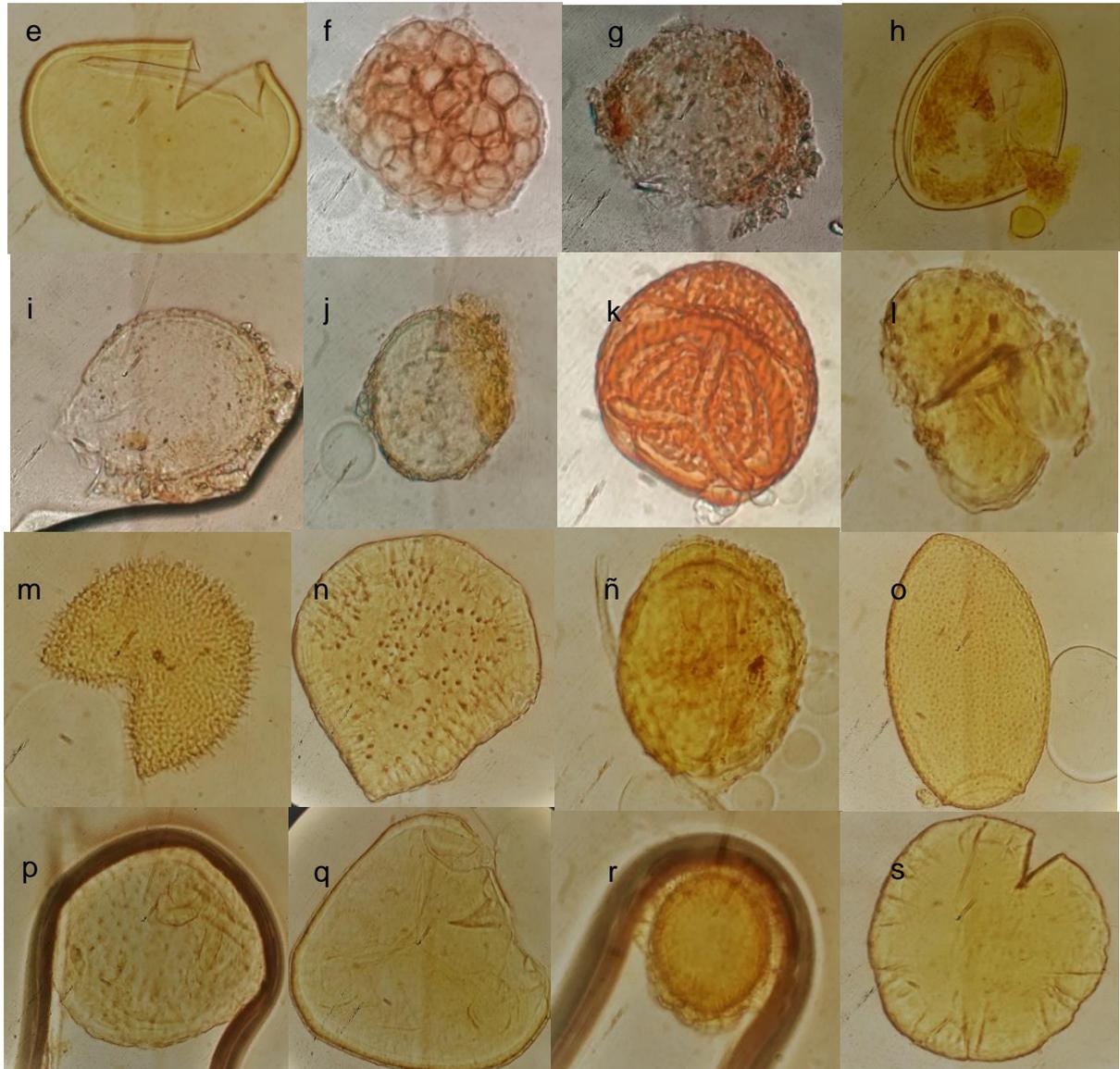


Figura 3.6 Identificación taxonómica de HMA en la hacienda Edén. *Glomus* sp. [a, b, c, d, ñ, o, r], e) *Acaulospora longula*, f) *Glomus aureum*, *Ambispora* sp. [g, i, j], h) *Acaulospora denticulada*, k) *Acaulospora alpina*, l) *Entrophospora*, m) *Pacispora chimonobambusae*, *Acaulospora* sp. [n, p], *Pacispora* sp. [q, s].

3.4 Análisis nutricional del suelo de los agroecosistemas de cacao

El suelo de los agroecosistemas presentó un pH de 6.7 para la hacienda Edén (agricultura convencional) y 6.2 para la hacienda La Americana (agricultura orgánica) lo que denota que la absorción de los nutrientes puede ser diferente debido a su tendencia hacia la neutralidad y acidez respectivamente. Según Leiva Rojas (2012) recomienda

que el pH debe encontrarse en un rango de 6.0 a 7.5 en la capa superficial indicando que no sea tan ácido ni tan alcalino. Expresando que el pH en estos dos agroecosistemas son ideales para una mejor productividad de cacao. En materia orgánica, en la hacienda La Americana y Edén obtuvieron valores de 8.9 y 2.4% respectivamente, mostrando alto contenido de nutrientes para la hacienda La Americana, favoreciendo el crecimiento de las plantas de cacao.

En el contenido de bases intercambiables (Ca, Mg y K), se observó diferencias para ambos agroecosistemas presentando una suma de bases de 31.16 meq/100ml y 20.56 meq/100ml para la hacienda La Americana y Edén respectivamente (ver tabla 3.5), lo que significa, que la hacienda La Americana presenta una alta disponibilidad de nutrientes en el suelo (Molina, 2012).

Tabla 3.5 Parámetros fisicoquímicos del suelo en dos haciendas de distintos agroecosistemas

Parámetros	Unidades	La Americana	Edén
pH		6.2	6.7
M.O*	%	8.9	2.4
K		0.67	1.10
Ca	meq/100ml	25.8	14.5
Mg		4.71	5.01
Σ Bases*		31.16	20.56

*Sumatoria del equilibrio de bases presentes en el suelo, M.O = materia orgánica

Con respecto a los macroelementos, la hacienda La Americana obtuvo mayor cantidad de N, Ca y S mientras que en microelementos se obtuvo mayor cantidad en Mn y B (ver tabla 3.6). En lo que concierne a la hacienda Edén, se obtuvo mayor cantidad de los macronutrientes N, P, K y Mg mientras que, en micronutrientes se obtuvo mayor concentración de Zn, Cu y Fe. Lo que quiere decir, que, pese a la gran cantidad de nutrientes observados en los agroecosistemas, el impacto de la actividad agrícola es diferente y tiene una influencia directa sobre los microorganismos presentes en el suelo. Estos resultados evidencian que el tipo de agricultura tiene un impacto directo en los HMA del el suelo ya que son clave para determinar la diversidad y densidad de esporas

en los suelos de los agroecosistemas facilitando la presencia de agentes aglutinantes temporales como raíces y redes de micelios micorrícicos sobre el suelo (Sánchez, 2015).

Tabla 3.6 Macro y microelementos del suelo en dos agroecosistemas

Elementos	Unidad	La Americana	Edén
NH ₄		53	14*
P		30	157
K		262	428
Ca		5156	2891
Mg		574	611
S	ug/ml	33	16
Zn		6.3	7.8
Cu		7.2	17.2
Fe		110	559
Mn		33	30
B		1.39	0.29*

*Valores bajos de elementos presente en el suelo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

1. En las dos haciendas estudiadas existe una amplia diversidad de especies de esporas de HMA, lo que significa que ambos agroecosistemas pueden ser biodiversos.
2. El porcentaje de micorrización fue mayor para la hacienda La Americana con respecto a la hacienda Edén lo cual podría deberse al sistema de producción agrícola que se desarrolla en estos cultivos.
3. La densidad de esporas en las dos haciendas presentó diferencias al estar afectada por factores del suelo tales como estructura del suelo, textura, composición y otros.
4. La taxonomía presente en las dos haciendas son distintas debido a que la especialización de los HMA junto con la composición florística de ambos agroecosistemas difieren significativamente.
5. Al ser un proyecto multidisciplinario esta identificación de HMA, permite a los estudiantes de FADCOM (Facultad de Arte, Diseño y Comunicación Audiovisual), crear una aplicación con la que puedan identificar el tipo de hongos con una imagen fotográfica, sirviendo como una herramienta base para investigaciones futuras.

4.2 Recomendaciones

1. Analizar las muestras con reactivo Melzer para una identificación bioquímica de las esporas.
2. Determinar el índice de diversidad de las especies observadas en cada agroecosistema.
3. Realizar identificación molecular de los HMA encontrados en ambos agroecosistemas de cacao.
4. Analizar la fauna que permite la dispersión horizontal y vertical de esporas de micorrizas en los agroecosistemas de cacao.

5. Evaluar plantas trampas adecuadas para la reproducción masiva de las micorrizas arbusculares como futura fuente de fertilizante especializado para el cultivo de cacao.

BIBLIOGRAFÍA

- Banco Central del Ecuador. (2019). REPORTE DE COYUNTURA SECTOR AGROPECUARIO (N° 91 – IV T – 2018). Recuperado de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201804.pdf>
- Banco de Desarrollo de América Latina. (2019). OBSERVATORIO DEL CACAO FINO Y DE AROMA PARA AMÉRICA LATINA (Boletín N°5). Recuperado de <http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1408/Iniciativa%20Latinoamericana%20del%20Cacao-Bolet%C3%ADn%205.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- C, A. P., S, J. R., & V, D. M. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: Una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 366-385. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n2.2011.412>
- Dostert, N., Roque Gamarra, J., Echeverría, A., Torre, M., & Weigend, M. (2012). *Hoja botánica: Cacao - Theobroma cacao L.* <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31228.44165>
- ESPAE Graduate School of Management. (2016). ESTUDIOS INDUSTRIALES ORIENTACIÓN ESTRATÉGICA PARA LA TOMA DE DECISIONES. Recuperado de <http://www.espae.espol.edu.ec/wp-content/uploads/2016/12/industriacacao.pdf>
- Gerdemann J. W., Nicolson T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46, 235-244.

- Gómez, L., Alonso, R., Portugal, V., & Rubí-Arriaga, M. (2007). Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo Sum*, 14.
- Guerrero López, A. (2015). Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador—Año 2012-2014. *Superintendencia de Control del Poder de Mercado*, 34.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (s.f.). [Cacao]. Recuperado de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcafec/rcacao>
- International Cocoa Organization. (s.f.). [Statistics-Cocoa Prices- ICCO Monthly Averages of Daily Prices]. Recuperado de <https://www.icco.org/statistics/cocoa-prices/monthly-averages.html>
- Leiva Rojas, E. (2012). ASPECTOS PARA LA NUTRICIÓN DEL CACAO *Theobroma cacao* L. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/50450/1/ednaivonneleivarojas.2012.pdf>
- Menéndez, H., Olalde, V & Marmolejo, V. (2011). Manual para la identificación de hongos micorrizicos arbusculares. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Molina, E. (2012). ANÁLISIS DE SUELOS Y SU INTERPRETACIÓN. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/50450/1/ednaivonneleivarojas.2012.pdf>
- Montserrat, P., & Villar Pérez, L. (1995). *Los agroecosistemas*. CSIC - Instituto Pirenaico de Ecología (IPE). <https://digital.csic.es/handle/10261/54409>
- Morelos, V. H., Soto-Estrada, A., Negreros-Castillo, P., & Perez, J. (2011). Los hongos micorrízicos arbusculares y su implicación en la producción y manejo de especies neotropicales forestales, con énfasis en meliáceas. *Interciencia*, 36, 564-569.
- Navarrete, E. T., Navarrete, A. T., & Laíño, A. S. (2018). Agro-ecosistemas tradicionales con cacao: Análisis de casos de pequeños productores en Los Ríos, Ecuador. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 7(2), 95-95.

- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–161. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Rice, R., & Greenberg, R. (2000). Cacao Cultivation and the Conservation of Biological Diversity. *Ambio*, 29, 167-173. [https://doi.org/10.1639/0044-7447\(2000\)029\[0167:CCATCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0044-7447(2000)029[0167:CCATCO]2.0.CO;2)
- Rojas, K., Melgar, C., Díaz, M., Montejo, D., Cubillas, P., & Sieverding, E. (2014). *HONGOS DE MICORRIZA ARBUSCULAR EN TRES AGROECOSISTEMAS DE CACAO (Theobroma cacao L.) EN LA AMAZONÍA PERUANA. Volumen 23*, 149-156. <https://doi.org/10.24841/fa.v23i2.20>
- Ramos Zapata, J., Marrufo Zapata, D., Guadarrama Chávez, P., & Carrillo Sánchez, L. (s.f.). Hongos micorrízico-arbusculares. Recuperado de <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/07%20Hongos%20micorrozicos.pdf>
- Sans, F. (2007). La diversidad de los agroecosistemas. *Ecosistemas*, 16.
- Theobroma cacao*. (s. f.). Recuperado 8 de diciembre de 2019, de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf
- Schüßler, A., & Walker, C. (2010). The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University, 19.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Palmira: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Valle del Cauca. 121 p.

Sieverding, E. (1984). Investigaciones sobre micorrizas en Colombia, Memorias del I Curso Nacional sobre Micorrizas. In Aspectos básicos de la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular (pp. 1–14). Palmira: Universidad Nacional.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Análisis de suelo de las dos haciendas en INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador)



ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR
"DR. ENRIQUE AMPUERO PAREJA"
LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS
Km. 26 Vía Duram - Tambo Apdo. Postal 09-01-7069 Yaguachi - Guayas - Ecuador
Teléfono: 042724260 fax: 042724261 e-mail: labstuelos.eels@iniap.gob.ec

DATOS DEL PROPIETARIO		DATOS DE LA PROPIEDAD		DATOS DE LA MUESTRA	
Nombre	ANGRI OLAYA VILLAVICENCIO	Nombre	EDEN	Informe N°	22721
Dirección	CDLA. QUISQUIS	Provincia	GUAYAS	Resp/ Muestreo	CLIENTE
Ciudad	GUAYAQUIL	Cantón	GUAYAQUIL	Fecha/Análisis	14/01/2020
Teléfono	0992174590	Parroquia	CDLA. QUISQUIS Y CON	Fecha/Emisión	16/01/2020
Fax	N/E	Ubicación	CDLA. QUISQUIS Y CON	Fecha/Impresión	16/01/2020
				Cond. Ambientales	T°C: 25 %H 56 Cultivo Actual CACAO

N° Laboral.	Identificación del Lote	pH	ug/ml											
			* NH4	* P	K	* Ca	* Mg	* S	* Zn	Cu	* Fe	* Mn	* B	* Cl
71682	EDEN	6.7 PN	14	157	428	2891	611	16	7.8	17.2	559	30	0.29	
71683	LA AMERICANA	6.2 LAC	53	30	262	5156	574	33	6.3	7.2	110	33	1.39	

Interpretación	pH
NiH, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Fe, Mn, B, Cl	N = Neutro LAI = Lig. Alcalino MeAl = Med. Alcalino Al = Alcalino RC = Requiere Cal
B = Bajo M = Medio A = Alto	Mac = Muy Acido Ac = Acido MeAc = Med. Acido LAc = Lig. Acido PN = Prnc. Neutro

Determinación	Metodología	Extractante
NiH, P	Colorimetría	Oliven Modificado
K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn	Absorción Atómica	pH 8.5
S	Turbidimetría	Forfato de Ca
B	Colorimetría	Monobásico
Cl	Volumetría	Pasta saturada Suelo:
pH	Potenciométrica	Agua (1:2.5)

Niveles de Referencia Óptimos	
NiH 20-40	Mg 121.5-243 Fe 20-40
P 10-20	S 10-20 Mn 5-15
K 78-156	Zn 2.0-7.0 B 0.5-1.0
Ca 800-1600	Cu 1.0-4.0 Cl 17-34


Responsable Técnico del Laboratorio

N/E = No entregado
 <LAC = Menor al Límite de Cuantificación
 Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo
 Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación solicitado al SAE
 Las opiniones, interpretaciones, etc, que se indican a continuación, están fuera del alcance de acreditación solicitado al SAE
 ** Ensayo subcontratado
 Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a copiar que sea en su totalidad



ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR
 ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR
 LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS
 Km. 26 Vía Duran - Tambo Apdo. Postal 09-01-7069 Yaguachi - Guayas - Ecuador
 Teléfono: 042724269 fax: 042724261 e-mail: lab_suelos_ecls@iniap.gob.ec

DATOS DEL PROPIETARIO	
Nombre	: ANGEL OLAYA VILLAVICENCIO
Dirección	: CDLA. QUISQUIS
Ciudad	: GUAYAQUIL
Teléfono	: 0992174590
Fax	: N/E

DATOS DE LA PROPIEDAD	
Nombre	: EDEN
Provincia	: GUAYAS
Cantón	: GUAYAQUIL
Parroquia	: CDLA. QUISQUIS Y CONSTAN
Ubicación	: CDLA. QUISQUIS Y CONSTAN

DATOS DE LA MUESTRA	
Informe N°	: 22704
Factura N°	: 7207
Responsable Muestra	: CLIENTE
Fecha de Analisis	: 14/01/2020
Fecha de Emisión	: 16/01/2020
Fecha de Ingreso	: 18/12/2019
Fecha de Impresión	: 16/01/2020
Condiciones Ambientales	: T°C: 25 %H: 56 Cultivo Actual : CACAO

N° Laboral.	Identificación	* Textura (%)		* Clase Textural		mg/100ml		mS/cm		C.E.		C.E.		mg/100ml		mg/100ml		Ca+Mg	
		Arena	Limo	Arella	* A+H	* Al	* Na	* Ca	* Mg	* M.O	* K	* Na	* Ca	* Mg	* Bases	Ca	Mg	K	K
71682	EDEN									2.4	1.10	14.5	5.01	20.56	2.89	4.57	17.77		
71683	LA AMERICANA									8.9	0.67	25.8	4.71	31.16	5.48	7.02	45.45		

Interpretación	
A+H+Al+Na	C.E.
AD = Adecuado	MS = No Salino
LT = Ligero Tóxico	LS = Lig. Salino
T = Tóxico	S = Salino
	MS + Muy Salino

Abreviaturas	
C.E.	Conductividad Eléctrica
M.O.	Materia Orgánica
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico

Determinación	Métodología	Exposante
M.O.	Walkley Black	Dicromato de K
CIC		Acetato de amonio
Na		Cloruro de Barrio
C.E.	Extracto de Pasta Saturada	Agua

Niveles de Referencia	
Lig. Tóxico mg/100ml	Medio
A+H 0.51 - 1.5	Ca/Mg 2.0 - 8.0
Al 0.3 - 1.0	Medio(%)
Na 0.5 - 1.0	M.O. 3.1 - 5.0
	(Ca+Mg)/k
	12.5 - 50.
	Mg
	1 - 2

N/E = No entregado
<L.C = Menor al Límite de Cuantificación
 Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo
 Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación solicitado al SAE
 Las opiniones, interpretaciones, etc. que se indican a continuación, están fuera del alcance de acreditación solicitado al SAE
 ** Ensayo subcontratado
 Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a copiar que sea en su totalidad

[Firma]
 Responsable Técnico del Laboratorio

APÉNDICE B



Fig. 1 Recolección de muestras de suelo en la hacienda La Americana.
Foto propia.

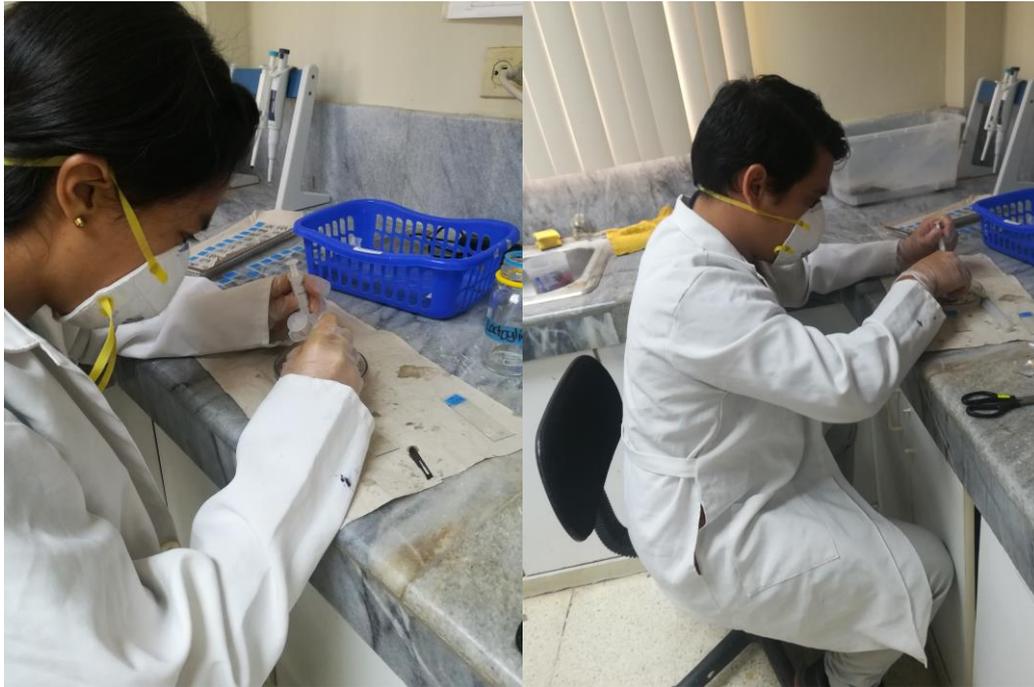


Fig. 2 Montaje de raíces secundarias en portaobjetos. Foto propia.

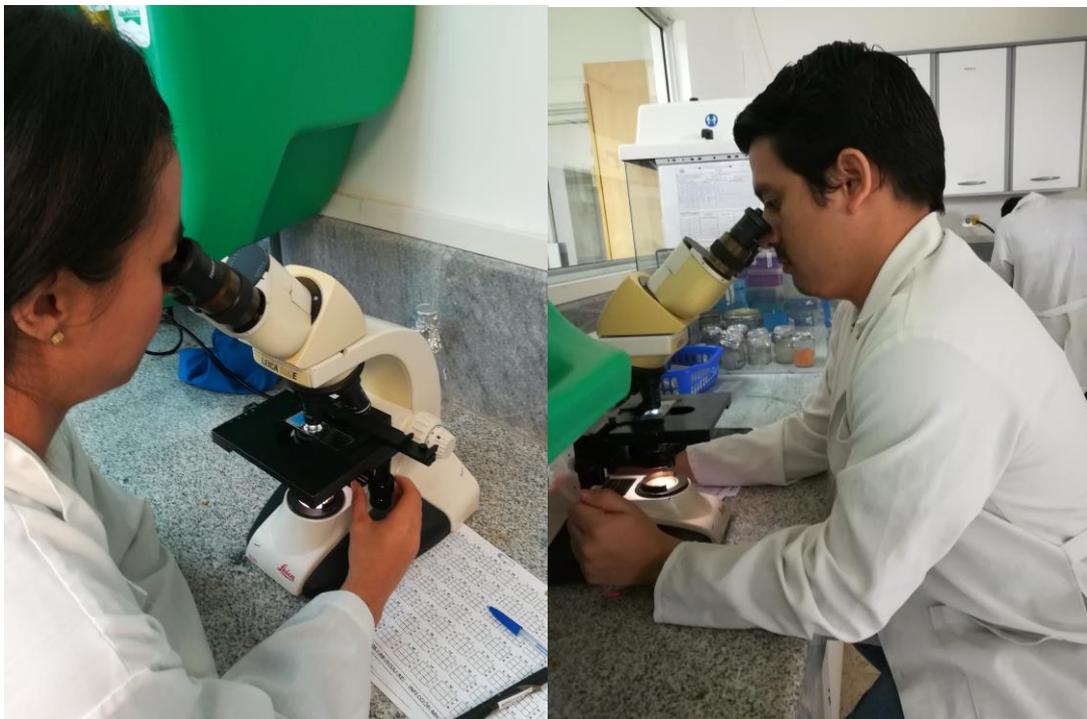


Fig. 3 Observación de colonización en raíces. Foto propia.

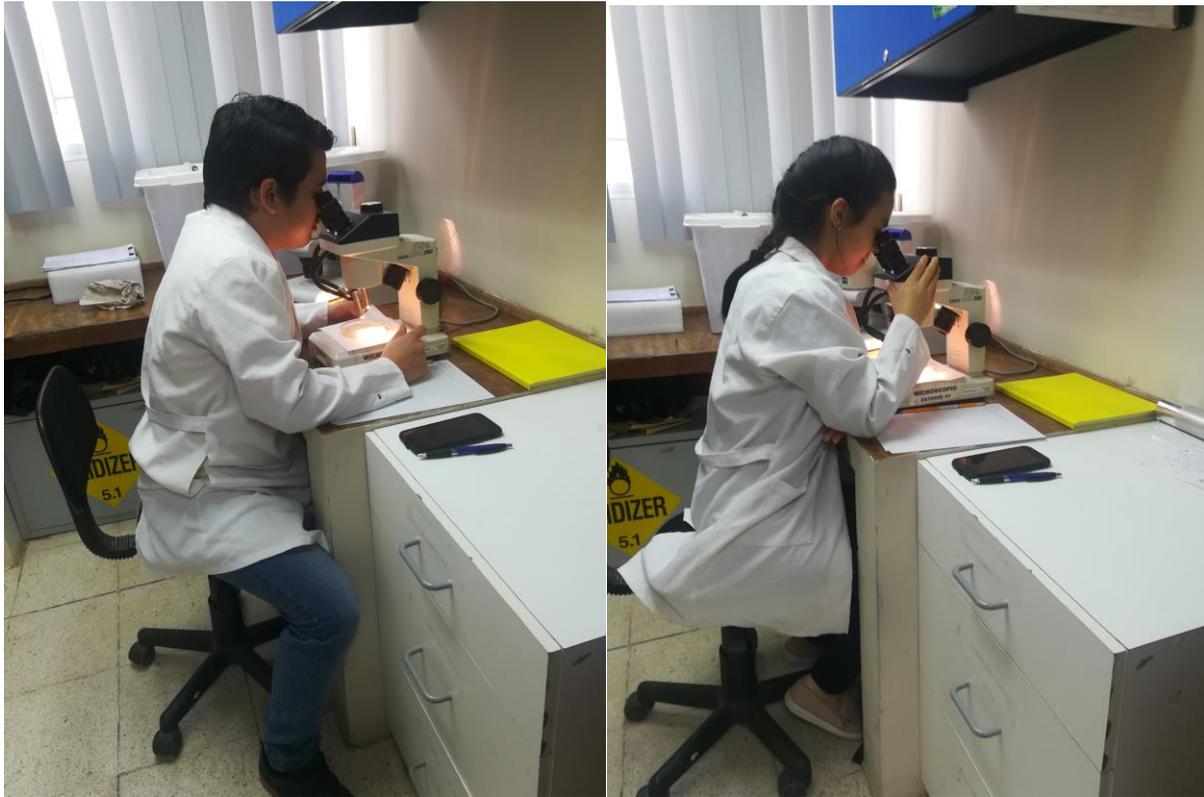


Fig. 4 Conteo de esporas. Foto propia.