



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

"Descubriendo la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares asociadas a dos sistemas de producción de cacao (*Theobroma cacao* L.)."

Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister en  
Biociencias Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento

Presentado por: Angela Pacheco Flores De Valgaz

Guayaquil – Ecuador, 2022

## **AGRADECIMIENTO**

*Mi inmensa gratitud al PhD. Milton Barcos Arias y MSc. Denisse Peña Tapia, directores y guías de esta investigación, por su brillante conducción académica y gran valentía al aceptar tan arduo desafío.*

*A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, por haberme brindado la oportunidad de cursar el Programa de Maestría en Biociencias Aplicadas.*

*A los Profesores Dres. Silvia Valencia, Lenin Galarza, Omar Ruiz y Sergio Hernández por su valiosa orientación.*

*Al Centro de Investigaciones Biotecnológico, de ESPOL, a sus directivos y técnicos, por toda la ayuda y noble actitud brindada en sus instalaciones y laboratorios.*

## **DEDICATORIA**

*Con profunda devoción al único y sabio Dios  
Todopoderoso, por toda la gracia y bondad que de Él  
he recibido.*

*A mi amado padre, Ángel Alejandro Pacheco Marín,  
por la nobleza de su espíritu y ejemplar hombría de  
bien.*

*A mi amada madre Yina Esterliz Flores De Valgaz  
Rosado, que, con su infinito amor, dedicación y  
abnegación, cultivó en mí las mayores virtudes morales,  
por su inquebrantable voluntad y perseverancia, para  
no dejarme claudicar en este desafío.*

*Para mis amados hermanos, Jonathan, Cristhian,  
Christofer y Melissa, como un legado de esfuerzo y  
sacrificio a emular.*

*Con amor a mi esposo José Luis Cabrera Macías, por  
su compañía y motivación  
en este proceso.*

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

**Julia Nieto Wigby, PhD.**  
Presidenta del Tribunal



Firmado electrónicamente por:  
**MILTON SENEN  
BARCOS ARIAS**

**Milton Barcos Arias, Ph.D.**  
Tutor



Firmado electrónicamente por:  
**DENISSE  
FABIOLA PENA  
TAPIA**

**Denisse Peña Tapia, M.Sc.**  
Cotutor



Firmado electrónicamente por:  
**LUIS LENIN  
GALARZA**

**Silvia Valencia Chamorro, Ph.D.**  
Evaluador

**Luis Galarza Romero, Ph.D.**  
Evaluador

## DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

ANGELA VANESSA  
PACHECO FLORES  
DE VALGAZ

Firmado digitalmente por  
ANGELA VANESSA PACHECO  
FLORES DE VALGAZ  
Fecha: 2022.08.03 15:49:38  
-05'00'

Ing. Angela Pacheco Flores De Valgaz

## RESUMEN

La importancia de las micorrizas arbusculares ha aumentado en la última década, debido a numerosos reportes de efectos benéficos sobre plantaciones y cultivares. Estos hongos pueden dispersarse a grandes distancias y la información de sus redes a escala local no proporciona una visión completa de sus interacciones y perturbaciones en la naturaleza. Por lo tanto, para considerar cómo los procesos de los ecosistemas locales están interrelacionados se debe estudiar sus redes a escala metacomunitaria. Pocos estudios han examinado redes de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas a plantaciones de cacao a escala metacomunitaria en el Ecuador. En el presente trabajo se pretende descubrir la diversidad de micorrizas arbusculares asociada a dos sistemas de producción de cacao (sin intervención y semi intervenido por fertilizantes sintéticos) mediante el uso de herramientas de metagenómica. Se llevó a cabo un muestreo con diseño experimental de arreglo factorial con interacción. Seguido de la selección de fincas y el almacenamiento de muestras recolectadas de la rizosfera. Se aisló esporas para la identificación morfológica de micorrizas arbusculares mediante tamizado en húmedo, decantación y extracción de esporas por gradientes de densidad. Luego, se maceró las muestras y se extrajo su ADN con kits para secuenciarles con la plataforma Illumina Miseq. Una vez obtenidas las secuencias se las analizó y procesó con QIIME2 Versión 2021.4 y Rstudio versión 4.1.1 (2021-08-10). El porcentaje de colonización de la raíz varió entre 34,7 y 66,5%, para las fincas sin intervención y entre el 13,3 y 46,2%, para fincas semi intervenidas. La densidad de esporas varió entre 387 y 472 esporas por 100 gramos de suelo sin intervención y entre 153 y 444 esporas por 100 gramos de suelo semi intervenido y fue mayor en las plantaciones viejas que las más jóvenes. La reducción en el porcentaje de colonización y la densidad de esporas en los sistemas sin intervención aportan a la disminución de las brechas de información en el sector agrícola cacaotero del litoral ecuatoriano, siendo parte de un bioindicador de la salud del suelo e intervención antropogénica. Por morfología, se encontró que el manejo sin intervención tuvo una mayor riqueza de géneros (12) en comparación con el manejo semi intervenido (11); el manejo sin intervención estuvo compuesto por 1 género exclusivo (*Racocetra*) y 11 compartidos con el manejo semi intervenido. Se identificaron un total de 1019 secuencias de ADN individuales o variantes de secuencia de amplicón (ASVs), de las cuales 18 ASVs correspondieron a HMA. La abundancia relativa de las secuencias obtenidas por identificación molecular entre las diferentes fincas revela en un 98% de abundancia relativa que los filos Ascomycota y Basidiomycota son los hongos rizosféricos más abundantes en general, asociados a la rizosfera de *T. cacao* en las zonas estudiadas. Por identificación molecular se reportan siete taxones nuevos para Ecuador y para los sistemas agroforestales de plantaciones de cacao, los cuales son: *P. scintillans*, *R. diaphanus*, *R. fasciculatus*, *R. custos*, *D.*

*disticha*, *M. perpusilla* y *D. bernensis*. Con los cebadores empleados, de los formadores de micorrizas arbusculares fueron encontrados asociados solo al sistema sin intervención los géneros: *Rhizophagus*, *Septoglomus*, *Kamienskia* y *Pacispora*, y asociados al sistema semi intervenido fueron encontrados los géneros: *Archaeospora*, *Diversispora* y *Dominikia*. La estructura de la comunidad de estos hongos obtuvo una variación significativa entre los sistemas de manejo agronómicos estudiados, pese que este cultivo no maneja productos agroquímicos en exceso en los sistemas semi intervenidos.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	IV
DECLARACIÓN EXPRESA	V
ABREVIATURAS	X
SIMBOLOGÍA	XI
CAPÍTULO 1	1
Introducción y objetivos	1
1.1 Antecedentes y justificación	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2	4
Marco Teórico	4
2.1 El cacao	4
2.2 Sistema de manejo	8
2.3 Actividad microbiana del suelo	8
2.4 Simbiosis micorrízica	10
2.4.1 Micorrizas arbusculares	12
2.5 Factores que influyen en su diversidad	14
2.6 Técnicas de identificación	15
CAPÍTULO 3	17
Metodología y materiales	17
3.1 Localización y descripción de las plantaciones de estudio.	17
3.2 Procesamiento de muestras y diseño experimental	18
3.3 Tinción y cuantificación de raíces colonizadas	19
3.4 Aislamiento de esporas e identificación de HMA	20
3.5 Extracción de ADN y secuenciación con la plataforma Illumina MiSeq	21
3.5 Análisis de secuencias	23

CAPÍTULO 4	25
Resultados y análisis	25
4.1 Análisis de las estructuras de los HMA en raíces	25
4.2 Análisis físico-químico del suelo	33
Macro y micro nutrientes	36
4.3 Análisis morfológico	45
4.4 Análisis Molecular	49
Análisis de secuenciación	50
4.5 Asignaciones taxonómicas basadas en secuencias ITS	53
CAPÍTULO 5	68
Conclusiones y recomendaciones	68
BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	78
ANEXO A: Cálculos Estadístico RStudio - Densidad de esporas.	78
ANOVA multifactorial: Densidad de Esporas, Provincia y Sistema.	78
ANOVA de 1 factor: Densidad de esporas y provincia.	78
Prueba de comparación de medias para densidad de esporas entre provincia.	78
ANOVA de 1 factor: Densidad de Esporas y Finca.	78
Prueba de comparación de medias para densidad de esporas entre finca.	78
ANEXO B: Cálculos Estadístico RStudio - Porcentaje de micorrización.	79
Anova multifactorial: Colonización, Provincia y Sistema.	79
ANOVA de 1 factor: Colonización y finca.	79
Prueba de comparación de medias para colonización entre finca.	79
ANOVA de 1 factor: Colonización y provincia.	79
Prueba de comparación de medias para colonización entre provincia.	80

## **ABREVIATURAS**

<b>ANECACAO</b>	Asociación Nacional de Exportadores de Cacao
<b>HMA</b>	Hongos micorrícicos arbusculares
<b>HFM</b>	Hongos formadores de micorrizas
<b>STD</b>	Desviación estándar
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>INEN</b>	Instituto Ecuatoriano de Normalización
<b>ITS</b>	Internal transcriptions spacer o espaciador transcrito interno
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>SSU</b>	Small subunit

## **SIMBOLOGÍA**

<b>Al</b>	Aluminio
<b>Ca</b>	Calcio
<b>CIC</b>	Capacidad de intercambio catiónico
<b>Cu</b>	Cobre
<b>B</b>	Boro
<b>Fe</b>	Hierro
<b>g</b>	Gramo
<b>h</b>	Hora
<b>K</b>	Potasio
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>Na</b>	Sodio
<b>NH<sub>4</sub></b>	Amonio
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>P</b>	Fósforo
<b>S</b>	Azufre
<b>tm</b>	Tonelada métrica

**Zn**  
**Σ Bases**

**Zinc**  
**Suma de bases**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Clasificación de los HFM de acuerdo a su clase, características y tipos planta que colonizan.	11
<b>Tabla II.</b> Clasificación taxonómica actualizada de los HMA	12
<b>Tabla III.</b> Procedimiento de ensayos en análisis de suelos.	19
<b>Tabla IV.</b> Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.	21
<b>Tabla V.</b> Cebadores o primers utilizados para este estudio.	22
<b>Tabla VI.</b> Número de esporas por 100 gramos de suelo perteneciente a cada finca cacaotera.	26
<b>Tabla VII.</b> Resultados promedios de los tipos de colonización en las raíces de cada finca cacaotera.	26
<b>Tabla VIII.</b> Resultados de análisis de suelos correspondientes a los cantones de Chone, Milagro y Vinces, Ecuador. Febrero, 2021.	34
<b>Tabla IX.</b> Géneros de HFMA identificados morfológicamente en las tres provincias.	49
<b>Tabla X.</b> Rendimiento de ADN y rango de pureza de los tres tipos de muestra.	49
<b>Tabla XI.</b> Resumen de los valores p de los factores respecto a sus índices de diversidad	53
<b>Tabla XII.</b> Abundancias totales para los HMA. (E= Espora, R = Raíz, S = Suelo).	59
<b>Tabla XIII.</b> Abundancia total de los HMA identificados con la base de datos UNITE.	60
<b>Tabla XIV.</b> Identificación taxonómica de los ASVs predominantes correspondiente a los mapas de calor y puntuación LDA.	66
<b>Tabla XV.</b> Matriz de correlación de Pearson.	80

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Banda geográfica con países productores de cacao.	4
<b>Figura 2.</b> Mazorca de cacao CCN-51.	6
<b>Figura 3.</b> Partes del cacao.	7
<b>Figura 4.</b> Asociación rizosférica. La raíz, la rizosfera y su microbiota forman una asociación compacta entre sí que, en última instancia, afecta el crecimiento de la planta tanto positiva como negativamente (Singh et al., 2017).	9
<b>Figura 5.</b> Estructuras principales de los HMA involucrados en la simbiosis con la raíz del hospedero (Fernández, 2008).	14
<b>Figura 6.</b> Resumen esquemático de diferentes combinaciones de cebadores utilizadas en la investigación de HMA. Las flechas grises indican los genes; líneas finas los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Para mayor claridad, el gen LSU no se muestra en toda su longitud. Los triángulos muestran el sitio y la dirección del iniciador (Stockinger, Krüger & Schübler, 2010).	16
<b>Figura 7.</b> Recolección de muestras de las fincas agrícolas cacaoteras.	17
<b>Figura 8.</b> Provincias y cantones de las localidades donde están ubicadas las fincas cacaoteras.	18
<b>Figura 9.</b> Placas portaobjeto con raicillas de cacao teñidas con azul de tripano.	20
<b>Figura 10.</b> Conteo de esporas con estereoscopio.	21
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las regiones del ADN ribosómico nuclear estudiadas. Los triángulos indican las posiciones y direcciones de los cebadores que se usaron como bordes para los análisis.	23
<b>Figura 12.</b> Imágenes representativas de las estructuras correspondientes a la infección por hongos micorrícicos arbusculares. a–c) Raíces colonizadas por vesículas, d–e) raíces colonizadas por hifas y f) arbusculos.	25
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de micorrización de raíces de cacao de las seis fincas.	27
<b>Figura 14.</b> Densidad de esporas de la rizosfera del cacao de las seis fincas.	28
<b>Figura 15.</b> Gráfica con RStudio de Medias de la interacción provincia, porcentaje de colonización y sistema.	29

- Figura 16.** Gráfica con RStudio de Medias de la Interacción del tipo de colonización, su porcentaje y provincia. 30
- Figura 17.** Gráfica con RStudio de Medias de la interacción tipo de colonización, porcentaje de colonización y sistema. 31
- Figura 18.** Gráfica con RStudio de Medias de la interacción de densidad de esporas, provincia y sistema. 32
- Figura 19.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados en relación a la MO y el pH. 35
- Figura 20.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes primarios en relación con la colonización micorrícica. 37
- Figura 21.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes primarios en relación con la densidad de esporas. 38
- Figura 22.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes secundarios en relación con la colonización. 40
- Figura 23.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes secundarios en relación con la densidad de esporas. 41
- Figura 24.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de micronutrientes en relación con la densidad de esporas. 42
- Figura 25.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de micronutrientes en relación con la colonización micorrícica. 43
- Figura 26.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de la sumatoria de bases en relación con la colonización micorrícica y su densidad de esporas. 44
- Figura 27.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia del Guayas – Milagro, “Finca San José”. 1) *Glomus*, 2) *Scutellospora*, 3) *Acaulospora*, 4) *Pacispora*, 5) *Ambispora* y 6) *Racocetra*. 45

**Figura 28.** Identificación de géneros de HMA de la provincia de Guayas – Milagro, hacienda Virginia. 1) *Entrophospora*, 2) *Pacispora*, 3) *Archaeospora*, 4) *Paraglomus*, 5) *Scutellospora*, 6) *Ambispora*, 7) *Glomus*. 46

**Figura 29.** Identificación de géneros de la provincia de Los Ríos en hacienda “La Americana”. 1) *Acaulospora*, 2) *Glomus*, 3) *Acaulospora*, 4) *Pacispora*, 5) *Diversispora*, 6) *Ambispora*. 46

**Figura 30.** Identificación de géneros de la provincia de Los Ríos en la hacienda “Edén”. 1) *Acaulospora*, 2) *Pacispora*, 3) *Entrophospora*, 4) *Ambispora*, 5) *Glomus*. 47

**Figura 31.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia de Manabí. Hacienda “Berto Zambrano”. 1) *Acaulospora*, 2) *Ambispora*, 3) *Intraspora*, 4) *Archaeospora*, 5) *Gigaspora*, 6) *Glomus*, 7) *Pacispora*, 8) *Paraglomus*, 9) *Entrophospora*, 10) *Diversispora*, 11) *Scutellospora*. 47

**Figura 32.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia de Manabí - “Hacienda San José de Olla Vieja”. 1) *Acaulospora*, 2) *Ambispora*, 3) *Diversispora*, 4) *Entrophospora*, 5) *Glomus*, 6) *Gigaspora*, 7) *Intraspora*, 8) *Pacispora*, 9) *Paraglomus*, 10) *Scutellospora*, 11) *Archaeospora*. 48

**Figura 33.** Electroforesis en gel de agarosa de muestras de suelo, esporas y raíz. 50

**Figura 34.** Alfa diversidad utilizando Shannon a nivel de ASV. Cada diagrama de caja representa la distribución de la diversidad de hongos dentro del factor experimental: a) Origen, b) Provincia, c) Finca, d) Intervención y e) pH. 51

**Figura 35.** Distancia de Bray-Curtis de las comunidades de hongos procedentes de esporas raíces y suelo. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de acuerdo al: a) Origen, b) Provincia, c) Finca y d) Intervención. 52

**Figura 36.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes filos por origen de muestra. 54

**Figura 37.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de las diferentes clases por origen de muestra. 55

**Figura 38.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes órdenes por origen de muestra. 56

**Figura 39.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de las diferentes familias por origen de muestra. 57

**Figura 40.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes géneros por origen de muestra. 58

**Figura 41.** Mapa de calor que representa los hongos más abundantes que se encuentran en a) suelo b) raíz y c) esporas de la rizosfera del cacao. El color de cada rectángulo del mapa de calor indica la abundancia de la unidad taxonómica operativa (OTU) de hongos correspondiente, como se muestra en la leyenda. 62

**Figura 42.** Gráfico de barras de las puntuaciones de LDA calculadas para los a) ASVs y b) géneros con características diferencialmente abundantes entre el tipo de muestra. 64

## CAPÍTULO 1

### Introducción y objetivos

#### 1.1 Antecedentes y justificación

Ecuador es un país agrícola por tradición, siendo el cacao uno de sus principales productos de exportación (Lourdes et al., 2018). A nivel mundial, es considerado como el primer productor de cacao fino y de aroma, con un aporte aproximado del 63%, seguido por Indonesia con el 10% del total mundial (Saravia-Matus, Rodríguez & Saravia, 2020). En el 2014, el volumen promedio de producción de cacao en Ecuador fue de: 230.000 toneladas métricas (Balladares Grazzo, 2015). Cada año, en el país se cultivan alrededor de 350 000 hectáreas, de las cuales el Guayas, Los Ríos y Manabí suman un rendimiento promedio nacional de 0,42 tm/Ha de cacao seco.

El tamaño promedio de un cacaotal es de 3 Ha y cada árbol de cacao normalmente alcanza una altura entre 4 a 8 m, con excepción del cacao Nacional, que puede alcanzar hasta 12 m de altura (Apolo, 2020). Su raíz principal tiende a crecer hacia abajo hasta 2 m de profundidad, y las secundarias se desarrollan en la capa superior húmica entre los primeros 20 cm de profundidad y se extienden horizontalmente hasta 6 m alrededor de su tronco (Barro Nieves, 1981).

Los requisitos de nutrientes importantes para el cultivo de cacao no han podido determinarse con exactitud por los distintos resultados obtenidos y la falta de estudios entre regiones, campos e incluso árboles, sin embargo, una revisión de datos de varios estudios alrededor del mundo resume el contenido de ciertos minerales en el árbol: un rango de 104-438 kg de nitrógeno, de 10-57 kg de fósforo y entre 53-633 kg de potasio por Ha (Hartemink, 2005).

Grandes cantidades de nutrientes se reciclan dentro de los sistemas de cacao, principalmente a través de la caída de hojarasca y poda (van Vliet & Giller, 2017). Aun así, existen pérdidas por agotamiento gradual de los nutrientes del suelo y por cosecha, limitando el rendimiento de este cultivo (Wrigley, Akehurst & Blackburn, 2001). Dado al creciente interés en satisfacer las demandas de alimentos, la mejora de los rendimientos y la resistencia al estrés, los esfuerzos gubernamentales se han visto estimulados a buscar alternativas (Sessitsch et al., 2012).

Por otro lado, la importancia de las endomicorrizas o micorrizas arbusculares ha aumentado en la última década debido a numerosos reportes de efectos benéficos sobre plantaciones (Powell y Bagyaraj, 1984; Allen et al., 2003). Estos hongos están

presentes en el 90% de las familias de plantas de la tierra y sostienen los ecosistemas terrestres a través de asociaciones simbióticas mutualistas (Watkinson, 2016).

Cuando se establece la interacción, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) modifican la morfología de la raíz, colonizando intracelularmente su corteza por medio de hifas que generan estructuras especializadas, que actúan como órganos de intercambio de nutrientes entre la célula vegetal y el huésped (Nakano, Takahashi & Kimura, 2001). Sus hifas se pueden extender más allá de zonas de agotamiento, incrementando el área de absorción de minerales y su contenido en la planta, explorando un mayor volumen de suelo que el que podría alcanzar el crecimiento de la raíz por sí sola (Aguilera Gómez, 2007). También, expertos han reportado que los diferentes sistemas o prácticas de cultivo a corto y largo plazo influyen en la abundancia y diversidad de los mismos (Gosling et al., 2010; Oehl et al., 2010; Symanczik, Gisler, Thonar, & Schlaeppli, 2017).

Por las razones habituales de plasticidad y convergencia entre cepas no afines, la morfología no es un indicador robusto de la relación entre tipos de HMA (Cué & Torres García, 2010).

El advenimiento de las técnicas moleculares ha revelado una diversidad de HMA mucho mayor de la conocida hace unos años. Los métodos moleculares de identificación son muy necesarios en los estudios de HMA porque su morfología proporciona información insuficiente para distinguir la gama completa de diversidad comunitaria de los distintos cultivos (Watkinson, Boddy, & Money, 2016). Tecnologías de secuencias de ADN de alto rendimiento han puesto a disposición información de las comunidades de hongos asociados a las plantas, de tal modo que han hecho posible encontrar especies microbianas entre cientos o miles de especies dentro de una red para la comprensión de fenómenos a escala de ecosistema (Sessitsch et al., 2012).

Dado que los hongos pueden dispersarse a grandes distancias con esporas, conidios, propágulos y vectores humanos o animales, la información de las redes a escala local por sí sola no proporciona una visión completa de sus interacciones y perturbaciones en la naturaleza. Por lo tanto, para considerar cómo los procesos de los ecosistemas locales están interrelacionados por la dispersión de HMA, se debe tener en cuenta las redes de asociaciones a escala metacomunitaria (Toju, Tanabe & Sato, 2018).

Pese a su potencial en microbiología básica y aplicada, pocos estudios han examinado redes de HMA asociadas a plantaciones de cacao a escala metacomunitaria en el Ecuador.

Por lo antes expuesto, en esta investigación se plantea los siguientes objetivos.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Descubrir la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociada a dos sistemas de producción de cacao, sin intervención y semi intervenido, mediante el uso de herramientas de metagenómica.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- 1) Determinar la influencia de las condiciones del suelo (pH, fósforo, porcentaje de materia orgánica) sobre las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares (HMA).
- 2) Caracterizar la comunidad de HMA en suelo, esporas y raíces de cacao por identificación molecular (metagenómica) y convencional (microscopía).
- 3) Evaluar las comunidades de hongos en los cultivos de tres sectores cacaoteros del litoral, para identificar la influencia del sistema de producción.

## CAPÍTULO 2

### Marco Teórico

#### 2.1 El cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L), pertenece a la familia Malvaceae (Balladares Grazzo, 2015). Es una planta originaria de Centro y Suramérica que data sus inicios en las márgenes de ríos de la costa, específicamente en las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas, extendiéndose luego a lo largo de las provincias de El Oro, Los Ríos y Guayas (Espinel, 2016).



**Figura 1.** Banda geográfica con países productores de cacao.

Elaborado por: autor

Crece en zonas húmedas y sombreadas, en una banda geográfica que no supera los 23° de latitud norte y sur de la línea ecuinoccial (Balladares Grazzo, 2015). Se considera una planta exigente en nutrientes, siendo estos afectados por factores tales como el material genético, sombra, edad de la planta, control de plagas, enfermedades y drenaje del suelo, entre otros factores (López et al., 2007).

A comienzos del siglo XIX, Ecuador se convirtió en el productor más grande de cacao, seguido por Honduras, Guatemala y el Caribe, alcanzando una producción mundial

aproximada de 135 000 Tm a base de la variedad conocida como Nacional (Susana et al., 2008; Espinel, 2016). En esos años, la explotación cacaotera y su comercio mundial creció, volviéndose de gran importancia para la economía latinoamericana por ser un rubro de alto ingreso. Su auge se mantuvo hasta finales del primer cuarto del siglo XX, cuando entró en crisis por efecto de la Primera Guerra Mundial y por la aparición de enfermedades fúngicas como la monilia y la escoba de la bruja.

Al presente constituye una base fundamental de la economía familiar costera, amazónica y hasta de las estribaciones de los Andes del país (Ochoa, 2019). Según la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (Anecacao), el cultivo de cacao en el país está representado en un 70% por pequeños productores, en un 20% por productores medianos y en un 10% por grandes productores.

El cacao se clasifica en tres grupos principales: Forastero, Trinitario y Criollo o Nacional (Viets, 1964; Apolo, 2020; Burgos et al., 2020). En Ecuador sobresalen dos variedades: el Nacional también conocido como “Fino y de Aroma” o “Sabor Arriba” y Colección Castro Naranjal o CCN51; este último surge como cruce estratégico para combatir enfermedades (Lourdes et al., 2018).

El cacao Fino y de Aroma es uno de los cultivos permanentes con mayor longevidad en los huertos. En algunos sectores cacaoteros, agricultores mantienen arboles élite que datan de 100 a 150 años, con sistemas sin intervención y con un conservado rendimiento productivo (Campaña, Hidalgo, & Sigcha, 2016).

Por otro lado, en general el árbol comienza a producir frutos después de 2 - 6 años de haber sido cultivado dependiendo de la variedad y ubicación y mantiene su producción durante décadas (Viets, 1964). El fruto es una mazorca o baya alargada que nace del tallo, tiene forma de calabacín alargado y puede medir entre 10 a 30 cm de largo y 7 a 10 cm de ancho con un peso entre 450 y 500 g cuando madura. Las mazorcas contienen de 20 a 40 almendras, de donde se obtiene el famoso chocolate o cacao (Balladares Grazzo, 2015; Villamizar, Rodríguez & León, 2017).



**Figura 2.** Mazorca de cacao CCN-51.

Su fruto es de gran atractivo porque es materia prima de semielaborados como el licor o pasta, manteca, polvo, la cáscara y su grano. Este último representa el 10% del peso del fruto y es el de mayor importancia, ya que sirve para preparar chocolates distintivos y gourmets con propiedades nutritivas que le hacen calificar como el mejor del mundo, generando alta demanda en los mercados internacionales (Vargas Jentzsch et al., 2016; Villamizar, Rodríguez & León, 2017).



**Figura 3.** Partes del cacao.

Elaborado por: autor

Ambas variedades se exportan en grano, semielaborados como licor, manteca, torta, polvo, y producto terminado como barras, tabletas, bombones, coberturas, polvo, relleno, baños y un sin fin de manufacturas más obtenidos a partir de mezclas con otros productos o frutos secos. Se estima que, del total de la exportación ecuatoriana, el 80% corresponde al cacao Nacional y el restante a otras variedades, entre esas destaca el CCN51. Esto se debe a que el comercio de cacao se realiza en base a su calidad, sobresaliendo el fino de aroma, de las variedades originales de Criollo y los corrientes, que corresponden a Forastero más los híbridos desarrollados por el hombre.

En el 2017, la exportación del cacao producido en Ecuador se dividió de la siguiente manera: el 87% en grano, 12% semielaborados y un 0.8% correspondió a productos terminados (Lourdes et al., 2018).

Durante 2018, las cifras variaron un poco, las exportaciones de semielaborados representaron el 6.33% del suministro exportable total de cacao. Los principales destinos fueron la Unión Europea y Estados Unidos (Ochoa, 2019). Siendo así, una planta de alto interés económico del país.

## **2.2 Sistema de manejo**

La química del suelo, la diversidad de cultivos de cobertura y las prácticas agronómicas tienen incidencia sobre sus propiedades edáficas y su componente microbiano. Tanto así que la combinación de sistemas apropiados de manejo y su vegetación de cobertura pueden mejorar la salud del suelo y promover la sostenibilidad en los agroecosistemas tropicales (Buyer et al., 2017). Una de las causales de mejorías en la producción de cacao es su eficiencia en sus ciclos de nutrientes.

Existe una diferencia marcada entre los sistemas agroforestales y los sistemas de monocultivo en la partición, la sincronía del uso de los recursos y la capacidad de cada especie para capturar y reciclar los nutrientes dando como resultado diferentes niveles de diversidad microbiana.

Por su lado, se ha determinado que los sistemas agroforestales pueden desempeñar un papel importante en la mejora de la fertilidad del suelo al secuestrar carbono orgánico, aumentar la fijación de nitrógeno, reducir la erosión, reciclar los nutrientes a través de la caída de hojarasca y su recuperación en el suelo. En adición, los niveles de luz y las condiciones del suelo afectan la disponibilidad de nutrientes y la nutrición del árbol de cacao, a diferencia de los cultivados en dosel abierto. Además, experimentan una exportación de sus nutrientes del sistema a través de la cosecha, la lixiviación y la escorrentía.

Al contrario de los monocultivos, el cultivo sin intervención de cacao fino no utiliza productos químicos de manera intensa y recibe una fertilización mínima o nula, evitando así la contaminación de la tierra y del agua, y los daños sanitarios a la fauna e individuos (Espinel, 2016). Se ha demostrado que el monocultivo de cacao es menos sostenible y más propenso a enfermedades fúngicas cuando se expone directamente al sol que cuando se mantiene a sombra (Buyer et al., 2017).

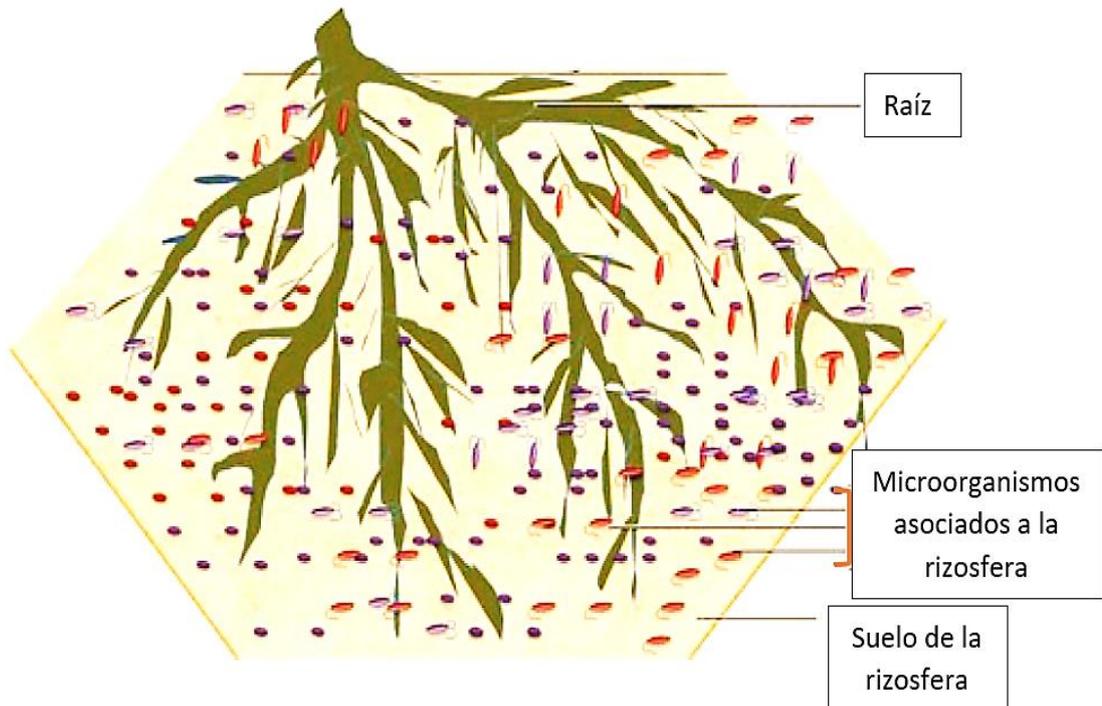
En las últimas décadas, las prácticas agrícolas están siendo evaluadas integralmente, considerando no sólo el rendimiento del cultivo y la disponibilidad de nutrientes en el suelo, sino la composición y comportamiento de su biota, a fin de no inhibir sus procesos biológicos ni estimular la dependencia de insumos externos en estos sistemas (López et al., 2007).

## **2.3 Actividad microbiana del suelo**

Las prácticas agronómicas en plantaciones de cacao incluyen la aplicación de fertilizantes inorgánicos para incrementar su producción, cubrir sus requerimientos

nutricionales e incrementar la fertilidad química o disponibilidad de macronutrientes del suelo circundante, subestimando el componente biológico (López et al., 2007).

Sin embargo, parte de la producción sostenible del cacao depende de los servicios ecosistémicos que proporcionan la comunidad microbiana al suelo, como su agregación, ciclo de nutrientes hasta la supresión de patógenos (Buyer et al., 2017).



**Figura 4.** Asociación rizosférica. La raíz, la rizosfera y su microbiota forman una asociación compacta entre sí que, en última instancia, afecta el crecimiento de la planta tanto positiva como negativamente (Singh et al., 2017).

Como se mencionó antes, varios estudios afirman que los procesos agrícolas y el manejo de los recursos vegetales inciden sobre el componente microbiano del suelo afectando tanto a su biodiversidad como su densidad poblacional implicada.

La sostenibilidad de un agroecosistema es proporcional a su independencia a fertilizantes y pesticidas químicos, dado que el sistema radicular de las plantas está asociado tanto a un ambiente abiótico, compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas, como a una vasta comunidad de microorganismos metabólicamente activos (Morales & Durango, 2008).

## **2.4 Simbiosis micorrízica**

La micorriza es una asociación simbiótica mutualista no patogénica que ocurre entre algunos hongos y las raíces de las plantas (Honrubia, 2009).

Su constitución se caracteriza por hifas que penetran las raíces intercelularmente y que se ramifican en el suelo para formar una extensa red que interconecta subterráneamente las raíces de plantas de la misma o de diferentes especies (Garzón, 2015) permitiendo un mayor y libre flujo de nutrientes minerales y el agua que éstos necesitan para crecer (Viera et al., 2017). En otras palabras, los hongos formadores de micorrizas (HFM) aumentan la capacidad de absorción de nutrientes a través de un nexo vivo dentro de la raíz de la planta. Además, mientras intercambian nutrientes por productos fotosintéticos establecen protección contra patógenos (Wang, 2017).

Por su grosor logran extenderse y desarrollarse entre los microporos del suelo donde no pueden entrar las raíces por su anchura, y a través de sus silos llegan a distancias más lejanas para absorber minerales atrapados, bloqueados o lejanos. En consecuencia, el uso de estos hongos incrementa la adaptación y genera una fertilización más eficiente, siendo una alternativa para el ahorro de cantidades importantes de fertilizantes minerales mientras logran la absorción de los nutrientes biodisponibles (Prieto et al., 2012). Las plantas micorrizadas pueden tolerar ambientes bióticos (ataques de patógenos, cambios microbianos en la rizosfera) y abióticos adversos (metales pesados, salinidad) (López et al., 2007; Medina García, 2016).

**Tabla I.** Clasificación de los HFM de acuerdo a su clase, características y tipos planta que colonizan.

Tipos	Ectomicorriza	Endomicorriza					
		Ectendomicorriza	Arbustoide	Monotropoide	Ericoides	Orquidioide	Arbuscular
<b>Caracteres</b>	Manto hifal rodeando la raíz. El hongo no penetra más allá de los espacios intercelulares de la corteza. Nunca entra a la célula.	Puede o no estar presente el manto hifal rodeando la raíz. Forma ovillos espirales dentro de las células. De no estar presente el manto hifal rodeando la raíz.	Manto hifal presente. Forma ovillos espirales dentro de las células.	Manto hifal presente. Forma haustorios sin ramificación dentro de las células. Micelio casi incoloro.	Manto hifal ausente. Forma ovillos espirales dentro de las células.	Manto hifal ausente. Forma haustorio sin ramificación u ovillos espirales dentro de las células. Micelio casi incoloro.	Sin manto hifal. Forma haustorio de fina ramificación u ovillo espiral dentro de las células. Forma vesículas en o entre las células.
<b>Clases de hongos</b>	Ascomicetos, Ficomicetos y Basidiomicetos	Ascomicetos y Basidiomicetos	Basidiomicetos	Basidiomicetos	Ascomicetos y Basidiomicetos	Basidiomicetos	Glomeromycetes
<b>Hospederos</b>	Árboles y arbustos	Árboles y arbustos	Ericales	Monotropaceae	Ericales	Orchidaceae	Árboles, arbustos, gramíneas, herbáceas, algas, bryophytas y pteridophytas

**Fuente:** (Fernández, 2008)

### 2.4.1 Micorrizas arbusculares

Dentro de la clasificación de las micorrizas están las arbusculares (HMA) cuyo filo es el Glomeromycota. Este grupo forman asociaciones mutualistas con las raíces de la gran mayoría (90%) de las plantas terrestres. Son considerados uno de los más importantes microorganismos del suelo por su abundancia, biomasa y papel clave en el funcionamiento del ecosistema (Watkinson, 2016).

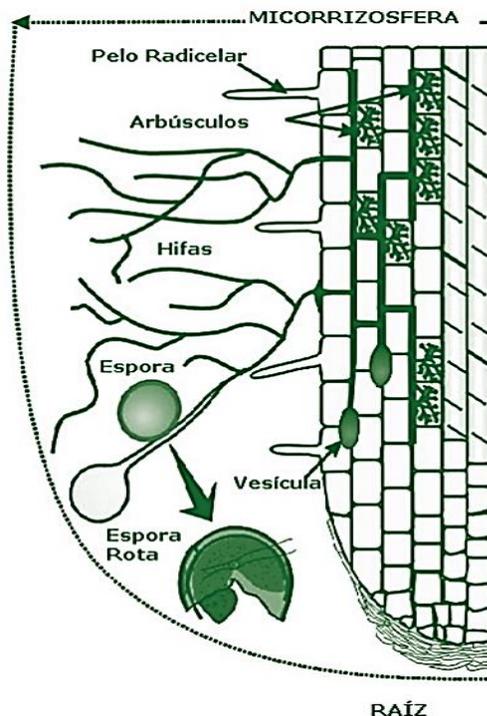
**Tabla II.** Clasificación taxonómica actualizada de los HMA.

<b>Filo: Glomeromycota</b>			
<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>
Glomeromycetes	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
			<i>Funneliformis</i>
			<i>Dominikia</i>
			<i>Funneliglomus</i>
			<i>Kamienskia</i>
			<i>Septoglomus</i>
			<i>Microdominikia</i>
			<i>Microkamienskia</i>
			<i>Nanoglomus</i>
			<i>Oehlia</i>
			<i>Orientoglomus</i>
			<i>Septoglomus</i>
			<i>Simiglomus</i>
			<i>Sclerocarpum</i>
	<i>Rhizophagus</i>		
	<i>Sclerocystis</i>		
		Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>
	Gigasporales	Scutellosporaceae	<i>Bulbospora</i>
			<i>Scutellospora</i>
			<i>Orbispora</i>
Gigasporaceae		<i>Gigaspora</i>	
Dentiscutataceae		<i>Dentiscutata</i>	
		<i>Fuscutata</i>	
		<i>Quatunica</i>	
	Intraornatosporaceae	<i>Intraornatospora</i>	

			<i>Paradentiscutata</i>	
		Racocetraceae	<i>Racocetra</i> <i>Cetraspora</i>	
		Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> <i>Kuklospora</i>	
	Diversisporales	Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i> <i>Viscospora</i> <i>Albahypha</i> <i>Claroideoglopus</i>	
			Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
			Sacculosporaceae	<i>Sacculospora</i>
			Diversisporaceae	<i>Corymbiglopus</i> <i>Redeckera</i> <i>Tricispora</i> <i>Otopora</i> <i>Desertispora</i> <i>Diversispora</i>
		Paraglomeraceae		<i>Paraglopus</i> <i>Innospora</i>
Paraglomeromycetes				Paraglomerales
	Archaeosporomycetes	Archaeosporales	<i>Geosiphon</i>	
			Ambisporaceae	<i>Ambispora</i> <i>Intraspora</i> <i>Palaeospora</i> <i>Archaeospora</i>
		Archaeosporaceae		

Fuente: (Alberto et al., 1991; Baltruschat et al., 2019; Raya Montaña et al., 2019)

Los HMA suministran nutrientes minerales, como el fósforo, a las plantas hospedantes a través de una red de hifas, recibiendo a cambio carbohidratos de las plantas (Nakano, Takahashi & Kimura, 2001). Además, influyen en el crecimiento y la reproducción de la planta huésped y protegen a su huésped de los patógenos (Colombo et al., 2014). Los residuos de raíces micorrizadas son considerados un importante reservorio de inóculo (Rodríguez, 2001).



**Figura 5.** Estructuras principales de los HMA involucrados en la simbiosis con la raíz del hospedero (Fernández, 2008).

### 2.5 Factores que influyen en su diversidad

Los factores ecológicos que afectan la composición de la comunidad de los HMA son complejos. La composición de la comunidad de HMA puede estar muy influenciada por la especie huésped a través de efectos diferenciales sobre el crecimiento y la esporulación de las hifas. A cambio, la comunidad vegetal puede verse fuertemente influenciada por la composición específica de los HMA asociados y la eficacia de cada una de las especies de hongos para promover su crecimiento (Droh et al., 2016).

Así mismo, Colombo et al. (2014) añade que no solo la identidad de la planta hospedante sino también el tipo de suelo, la fragmentación del hábitat y la estacionalidad afectan las estructuras de la comunidad de estos hongos.

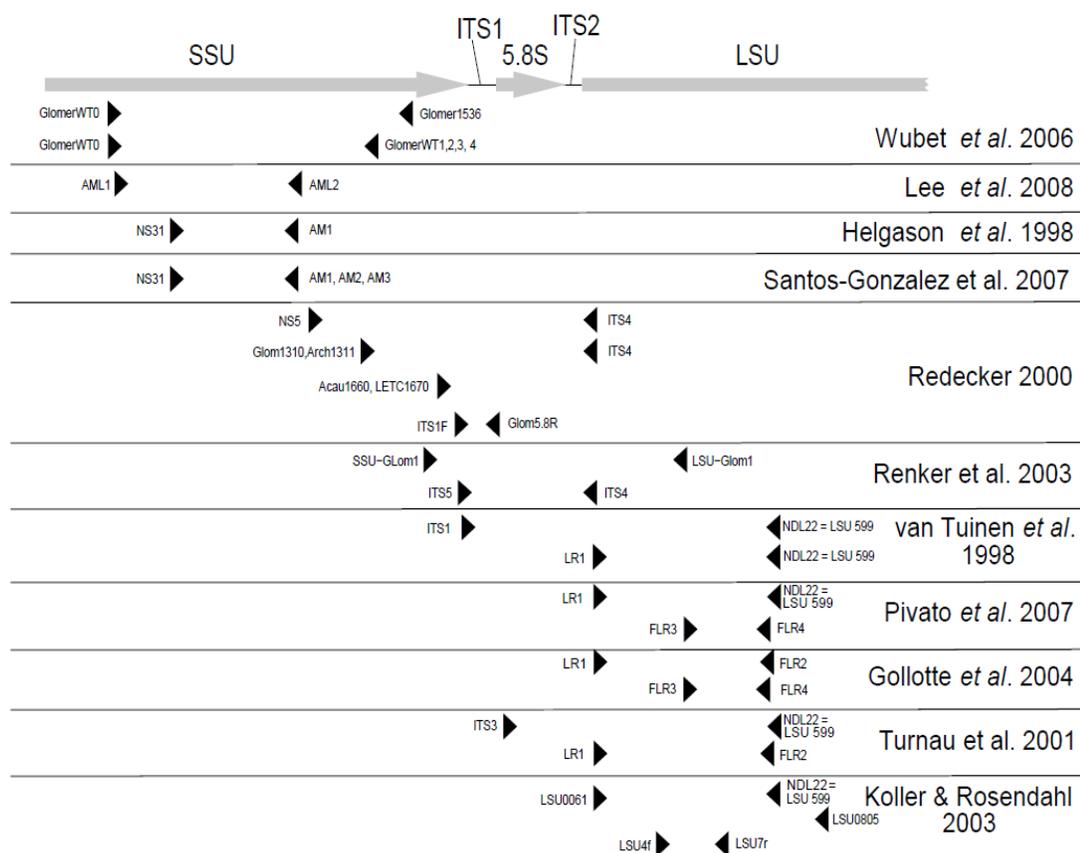
## 2.6 Técnicas de identificación

Se cree que hay una diversidad de más de 200 especies de HMA. Hace unas décadas atrás el enfoque de la taxonomía de estos hongos era solo el tradicional, basado en la morfología (caracteres fenotípicos) de las esporas, lo cual considera su forma, tamaño, color, número de paredes, existencia de conexión hifal, su reacción con Melzer y la textura de la espora. Sin embargo, el uso de esta metodología ha presentado limitaciones en cuanto al estudio de su diversidad dada la dificultad al identificar las esporas recolectadas en campo, la presencia de HMA no esporulantes y las complicaciones al distinguir entre la diversidad funcional y morfológica, generando un cuello de botella para la comprensión de su ecología (Colombo et al., 2014).

Con el surgimiento de tecnologías de secuenciación de segunda generación se han desarrollado herramientas útiles para identificar HMA en muestras ambientales. La aplicación de metagenómica basada en las nuevas generaciones de tecnologías de secuenciación provee nuevos alcances en el estudio de los componentes de las comunidades de HMA (Fernández Bidondo et al., 2018).

En la actualidad, el tipo de estudio de todo el componente de la comunidad microbiana se ha denominado ADN barcoding (metabarcoding) usando un código de barras de un fragmento de ADN (SSU ADNr o ITS) a fin de que identifique grupos de organismos (Martin et al., 2011), mediante la comparación de una secuencia desconocida con una base de datos de secuencias, como la base de datos internacional de secuencias (Centro Nacional de Información Biotecnológica, GenBank, NCBI; el Archivo Europeo de Secuencias de Nucleótidos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular, EMBL; y el banco de datos de ADN de Japón, DDBJ) o UNITE (base de datos de ectomicorrizas ITS nórdica), e identifica especies en función de la similitud de secuencia (Raja et al., 2017).

Diferentes investigadores han probado cebadores para pirosecuenciación cuyos resultados han mostrado alta especificidad para amplificar secuencias de todos los taxa de HMA (Fig. 6) (Colombo et al., 2014; Esposito et al., 2016; Qin et al., 2020). Para la identificación a nivel de especie, el ITS es la región más útil, ya que es la parte del cistrón de ARNr que evoluciona más rápidamente. Debido a su facilidad de amplificación, uso generalizado y brecha de código de barras apropiadamente grande (es decir, la diferencia entre variación interespecífica e infraespecífica), un consorcio de micólogos eligió el ITS como el código de barras oficial para hongos (Raja et al., 2017).



**Figura 6.** Resumen esquemático de diferentes combinaciones de cebadores utilizadas en la investigación de HMA. Las flechas grises indican los genes; líneas finas los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). Para mayor claridad, el gen LSU no se muestra en toda su longitud. Los triángulos muestran el sitio y la dirección del iniciador (Stockinger, Krüger & Schüßler, 2010).

Las mejoras en los métodos de secuenciación están proporcionando conocimientos revolucionarios sobre la biodiversidad fúngica. Sin embargo, sigue siendo difícil obtener estimaciones precisas de la riqueza o del número de especies de hongos y sus abundancias relativas en una muestra ambiental (Taylor *et al.*, 2016).

En su estudio Colombo, *et al.* (2014) concluyó que ambas metodologías se complementan y completan entre sí en un estudio de su ecología fúngica tras la comparación de los resultados obtenidos de la técnica de pirosecuenciación de amplicones con los del enfoque tradicional de taxonomía basada en la morfotipificación de esporas.

## CAPÍTULO 3

### Metodología y materiales

#### 3.1 Localización y descripción de las plantaciones de estudio.

La recolección se realizó entre los meses de octubre y diciembre del 2020 en tres cantones estratégicos de producción cacaotera: Milagro, Vinces y Calceta. De cada cantón se seleccionó cinco árboles de cacao cultivados con sistema semi intervenido y cinco sin intervención, para extraerles porciones de raíces y suelo de la capa superior húmica entre los primeros 20 cm de profundidad. Las zonas se caracterizaron por ser áreas agrícolas de plantaciones de cacao, naranja y verde, entre otras plantas asociadas a este agroecosistema.



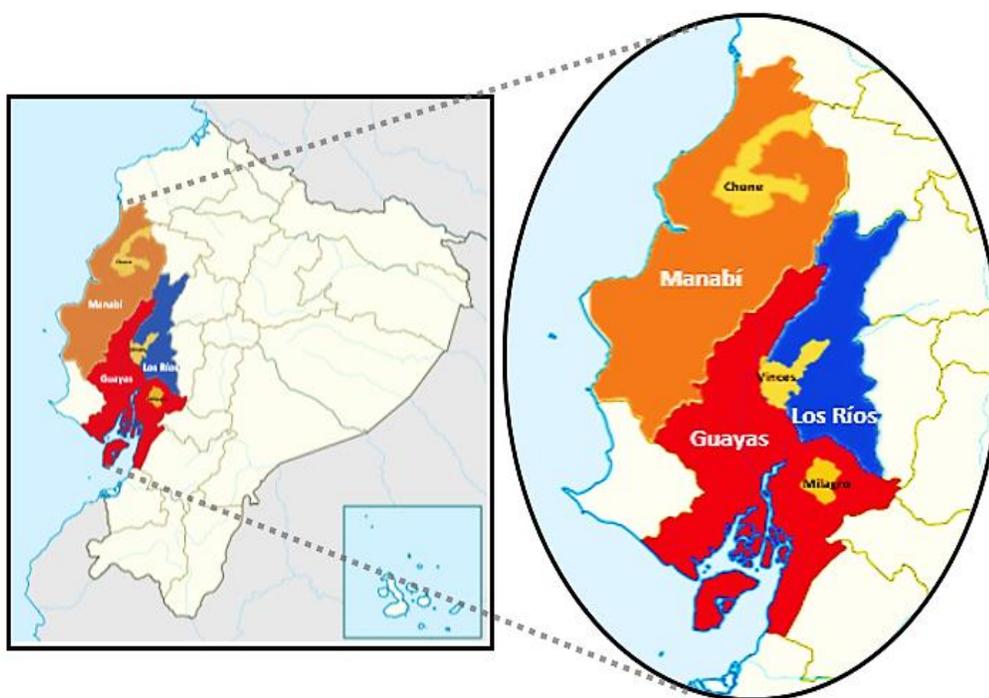
**Figura 7.** Recolección de muestras de las fincas agrícolas cacaoteras.

En el cantón Vinces de la provincia de Los Ríos, se seleccionaron dos fincas: una en la localidad La Americana, de cacao agroforestal de 30 años llamada “La Americana”, cuyas coordenadas geográficas son: 79°48'14.86" de latitud Oeste y 1°38'23.84" de longitud Sur, y otra en la localidad Antonio Sotomayor, de cacao CCN-51, de 8 años llamada Edén, cuyas coordenadas son: 79°49'8.02" de latitud Oeste y 1°38'47.12" de longitud Sur.

En el cantón Chone de la provincia de Manabí, se seleccionaron dos fincas: una en la localidad Canuto, de cacao CCN-51 de 20 años de plantación llamada Berto Zambrano, cuyas coordenadas geográficas son: 0°47'52.04" de latitud Sur y 80° 8'3.70" de longitud Oeste, y otra en la localidad Canuto, hacienda denominada San José de Olla Vieja, de cacao

Agroforestal, de 40 años, cuyas coordenadas son:  $0^{\circ}47'52.46''$  de latitud Sur y  $80^{\circ}5'36.79''$  de longitud Oeste.

En el cantón Milagro de la provincia del Guayas, se seleccionaron dos fincas: una en la localidad Karlita de la parroquia Mariscal Sucre, de cacao Agroforestal de 70 años de plantación llamada Virginia, cuyas coordenadas geográficas son:  $0^{\circ}47'52.04''$  de latitud Sur y  $80^{\circ}8'3.70''$  de longitud Oeste, y otra en la localidad Manga de Jején en la parroquia Roberto Astudillo, de cacao Agroforestal, de 40 años llamada San José, cuyas coordenadas son:  $0^{\circ}47'52.46''$  de latitud Sur y  $80^{\circ}5'36.79''$  de longitud Oeste.



**Figura 8.** Provincias y cantones de las localidades donde están ubicadas las fincas cacaoteras.

Elaborado por: autor

### 3.2 Procesamiento de muestras y diseño experimental

Las muestras se almacenaron en frío, para luego tomar dos porciones; una porción para realizar una identificación taxonómica por morfología a través de microscopía

(identificación, cuantificación del número de esporas HMA por gramo de suelo, determinación del porcentaje de micorrización total de las raíces) y otra porción para caracterización molecular. El trabajo incluye una evaluación de las variables del suelo (pH, conductividad, porcentaje de materia orgánica y fósforo) para ser relacionada con la predominancia de la comunidad de micorrizas. Estos parámetros se analizaron en el Laboratorio de Suelos, Tejidos Vegetales y Aguas de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP (**Tabla III**).

**Tabla III.** Procedimiento de ensayos en análisis de suelos.

<b>Determinación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Extractante</b>
pH, Cl	Volumetría Potenciométrica	Pasta Saturada Suelo: agua (1:2,5)
NH <sub>4</sub> , P	Colorimetría	Olsen Modificado pH 8,5
K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn	Absorción Atómica	
S	Turbidimetría	Fosfato de Ca Monobásico
B	Colorimetría	
M.O.	Walkey Black	Dicromato de K

### 3.3 Tinción y cuantificación de raíces colonizadas

La identificación por microscopía para evaluar la colonización de HMA se observó a través de un microscopio binocular (40 x) las raíces fueron procesadas por el método modificado de Phillips y Hayman (1970), blanqueadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, limpiadas con KOH (10 % w/v, 15 min, 110 °C) y teñidas con azul de tripano en ácido láctico (0.02 %, 10 min, 110 °C). La colonización radical por árbol fue cuantificada examinando 30 secciones (1 cm largo) de raíces tomadas al azar. La frecuencia fue calculada como el porcentaje de segmentos de raíz con hifas, arbusculos o vesículas (Declerck et al., 2004).



**Figura 9.** Placas portaobjeto con raicillas de cacao teñidas con azul de tripano.

### **3.4 Aislamiento de esporas e identificación de HMA**

Para el aislamiento de esporas, se usó la metodología de tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963), y se continuó con la extracción por gradientes de densidad (Furlan et al., 1980). El sobrenadante final fue disuelto en agua para lavar las esporas, y el criterio para determinar la densidad de esporas HMA es el siguiente: densidad baja corresponde  $< 1$  esporas/g de suelo; densidad media corresponde  $1 - 10$  esporas/g de suelo; y densidad alta corresponde  $> 10$  esporas/g de suelo (Guerra y Chacon 2012).

La identificación de los géneros predominantes de HMA se basó en las características morfológicas de las esporas, es decir, su color, forma, textura, el tamaño, características de sus paredes (número, grosor, color, presencia de ornamentaciones y reacción Melzer), capas que recubren a la espora, la cantidad de cicatrices presentes, y la unión de la hifa suspensoria a la espora (Peña-Venegas et al., 2007). Las características fueron examinadas empleando manuales morfológicos de libre acceso de Morton (2003), Blaszkowski (2003), Cortés (2012) e IBG (2003).



**Figura 10.** Conteo de esporas con estereoscopio.

### 3.5 Extracción de ADN y secuenciación con la plataforma Illumina MiSeq

La extracción de ADN se realizó de la siguiente manera: Las muestras de raíces se maceraron con nitrógeno líquido, para luego utilizar el kit DNeasy mericon Food de la marca Qiagen para su aislamiento de ADN. En el caso de las muestras de suelo y esporas se empleó directamente el kit DNeasy Power Soil Pro de Qiagen. Se verificó la calidad y cantidad de ADN mediante espectrofotometría (Nanodrop) y electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

**Tabla IV.** Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.

Técnica de Análisis	Ratio	Valor	Criterio de Pureza	Referencias
Espectrofotometría	260/280	1.8-2	ADN de pureza óptima	(Sousa-hitzler & Geary, 2008; Quality Control Platform of Saint-Louis, 2009; Banco Nacional de ADN Carlos III-Universidad de
		1.6-1.8	ADN pureza aceptable	
		<1.6	Presencia de compuestos aromáticos	
		>2.1	Contaminación de ARN	
	260/230	2-2.2	ADN de pureza óptima	
		1.8-2	ADN pureza aceptable	
		1.5-1.8	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles	

<1.5	Altamente contaminado con sales, carbohidratos, fenoles	Salamanca, 2016; Robles & Valeria, 2020)
------	---	--

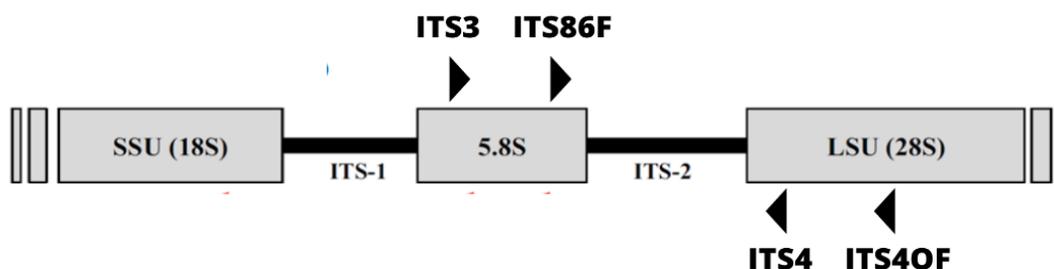
Para asegurar que se cuenta con la cantidad suficiente de ADN para la generación de las librerías correspondientes, se realizó la extracción por triplicado y se enviaron muestras compuestas o pools los cuales consisten en el ADN de las 3 extracciones, las cuales se homogenizaron en un solo tubo.

Al final se contó con un total de 18 muestras a secuenciar del sistema de cultivo tradicional y 18 del cultivo sin intervención de los 3 sectores de colecta (Vinces, Milagro, Calceta).

**Tabla V.** Cebadores o primers utilizados para este estudio.

Región	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'a 3')	Amplicón	Referencia
ITS	ITS86F	<i>GTGAATCATCGAATCTTTGAA</i>	ITS86F/ITS4	(Qin et al., 2020)
	ITS4	<i>TCCTCCGCTTATTGATATGC</i>		
	ITS3	<i>GCATCGATGAAGAACGCAGC</i>	ITS3/ ITS4OF	(Esposito et al., 2016)
	ITS4OF	<i>GTACTAGGGGAATCCTTGTT</i>		

Las muestras de ADN se enviaron a la empresa de secuenciación Biosequence, ubicada en Quito - Ecuador donde se realizó la preparación, construcción de librerías y secuenciación de la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS) descrito en la **tabla V**. La secuenciación se llevó a cabo utilizando la plataforma Miseq de Illumina en el formato demultiplexado (paired-end) de Casava 1.8 con una longitud de lectura de 300 pares de bases.



**Figura 11.** Representación esquemática de las regiones del ADN ribosómico nuclear estudiadas. Los triángulos indican las posiciones y direcciones de los cebadores que se usaron como bordes para los análisis.

### 3.5 Análisis de secuencias

Para el análisis de secuencias se utilizará el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2 Versión 2021.4).

La modalidad de secuenciación demultiplexado (paired-end) de Casava 1.8 genera lecturas del fragmento amplificado en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5'), es decir, hay dos archivos de formato fastq.gz para cada muestra de estudio, que contienen las lecturas hacia adelante (forward) o hacia atrás (reverse) para esa muestra. Cada archivo contiene un nombre que incluye el identificador de su muestra. El artefacto de salida incluye las secuencias demultiplexadas. Se observó el resumen de la distribución de las cualidades de la secuencia en cada posición de los datos de los resultados de la demultiplexación.

Para el control de calidad de las secuencias se empleó el complemento de DADA2 y se obtuvo una tabla de frecuencias de características de cada secuencia única en cada muestra en el conjunto de datos, y un artefacto QIIME 2, que mapea identificadores de características en las secuencias que representan. Este complemento detecta y corrige errores en la secuenciación, elimina las secuencias correspondientes a los iniciadores utilizados en la amplificación del fragmento ITS, así como el filtrado y eliminación de quimeras.

Con el fin de realizar análisis de diversidad filogenética, se utilizó el complemento q2-phylogeny para generar un árbol filogenético y se empleó el complemento q2-diversity para realizar los análisis de alfa (diversidad o riqueza en una muestra) y beta (diversidad o riqueza entre las muestras) diversidad.

Se estimó los índices de ecología microbiana para la alfa diversidad, los cuales comprenden: Índice de diversidad de Shannon, que trata de una medida cuantitativa de la riqueza de la comunidad, utiliza un muestreo al azar y define el nivel de diversidad utilizando el porcentaje de composición de las especies presentes (Peet, 1975). El índice de diversidad filogenética de Faith (PD), una medida cualitativa de la riqueza de la comunidad que incorpora relaciones filogenéticas entre las características, e índice de uniformidad de Pielou, una medida de uniformidad comunitaria.

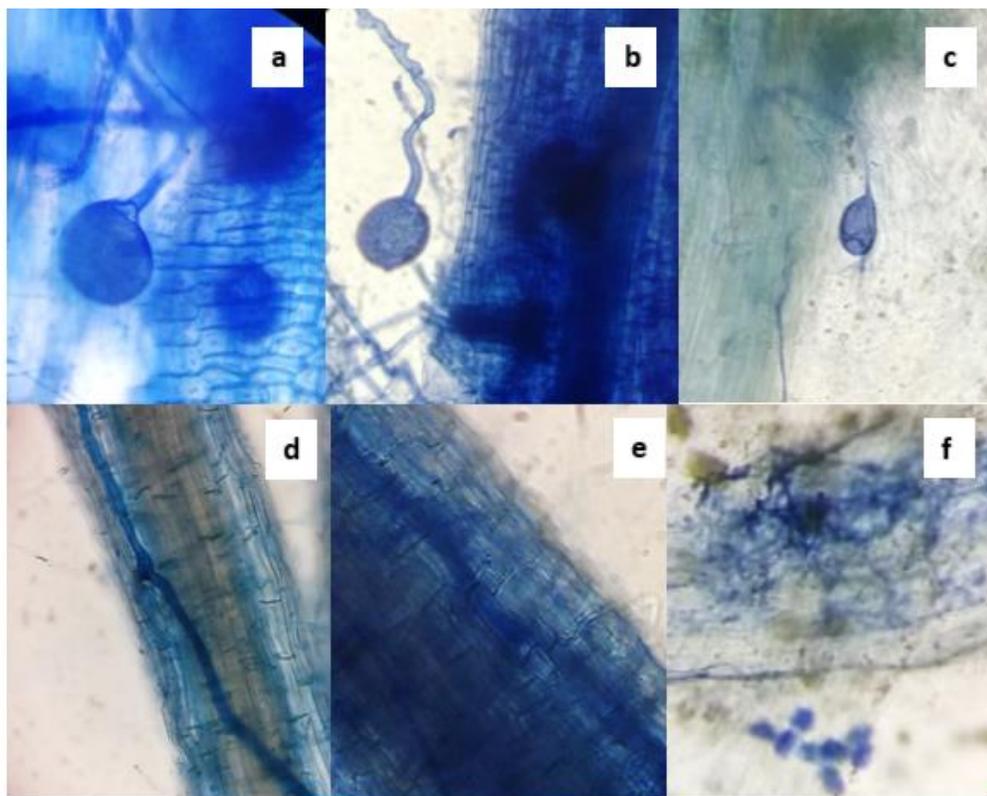
Para los análisis de beta diversidad, se utilizó el algoritmo de medición con base en las diferencias filogenéticas de las muestras denominado como UniFrac. Se determinó la distancia de Jaccard, la cual es una medida cualitativa de la disimilitud de la comunidad y la distancia de Bray-Curtis, una medida cuantitativa de la disimilitud de la comunidad. Se graficó el análisis de coordenadas principales (PCoA) con el fin de observar el agrupamiento de las muestras utilizando el paquete qiime2R en el lenguaje de programación estadístico R versión 3.5.1 (R Core Team, 2018). Luego, se calculó una curva de rarefacción con un muestreo de 15000 secuencias por muestra para determinar si la profundidad de secuenciación fue lo suficiente para observar toda la diversidad presente en las muestras. Finalmente, para el análisis taxonómico se generó un clasificador con la base de datos UNITE versión 8,3 empleando el archivo dinámico de umbrales de agrupamiento acorde a los primers correspondientes a las secuencias.

## CAPÍTULO 4

### Resultados y análisis

#### 4.1 Análisis de las estructuras de los HMA en raíces

Los HFM forman simbiosis con plantas terrestres a través de esporas, arbuscúlos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan. Mediante la tinción de raíces fue posible observar estas microestructuras. Todas las raíces de las distintas fincas analizadas presentaron colonización micorrícica con al menos una estructura; se evidencian estructuras como hifas y vesículas, siendo menos frecuente la presencia de los arbuscúlos en ambos sistemas de manejo (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Imágenes representativas de las estructuras correspondientes a la infección por hongos micorrícicos arbusculares. a-c) Raíces colonizadas por vesículas, d-e) raíces colonizadas por hifas y f) arbuscúlos.

El porcentaje de estas estructuras de micorrización y la cantidad de esporas muestran una diferencia marcada entre los sistemas de manejo de cultivo de las dos fincas pertenecientes a cada provincia (**tablas VI y VII**). Las fincas sin intervención presentaron valores más altos de porcentaje de micorrización total respecto a las semi intervenidas (**tabla VII**).

**Tabla VI.** Número de esporas por 100 gramos de suelo perteneciente a cada finca cacaotera.

Provincia	Manabí		Los Ríos		Guayas	
	Sin intervención	Semi intervenido	Sin intervención	Semi intervenido	Sin intervención	Semi intervenido
Réplica	Olla Vieja	Berto Zambrano	La Americana	Edén	San José	Virginia
1	320	548	400	169	365	831
2	336	431	497	165	326	453
3	771	480	522	174	322	302
4	537	593	472	149	385	121
5	423	358	466	165	354	214
6	230	472	362	137	411	402
7	445	381	468	269	436	398
8	344	291	446	125	439	311
9	736	235	464	186	441	507
10	727	315	460	170	371	425
11	622	568	468	168	388	608
12	196	492	424	129	399	368
13	146	536	332	91	424	167
14	751	501	375	125	406	255
15	496	453	358	80	342	140
<b>Promedio</b>	472	443,6	434	153	387	367
<b>STD</b>	212	107	56	44	40	189

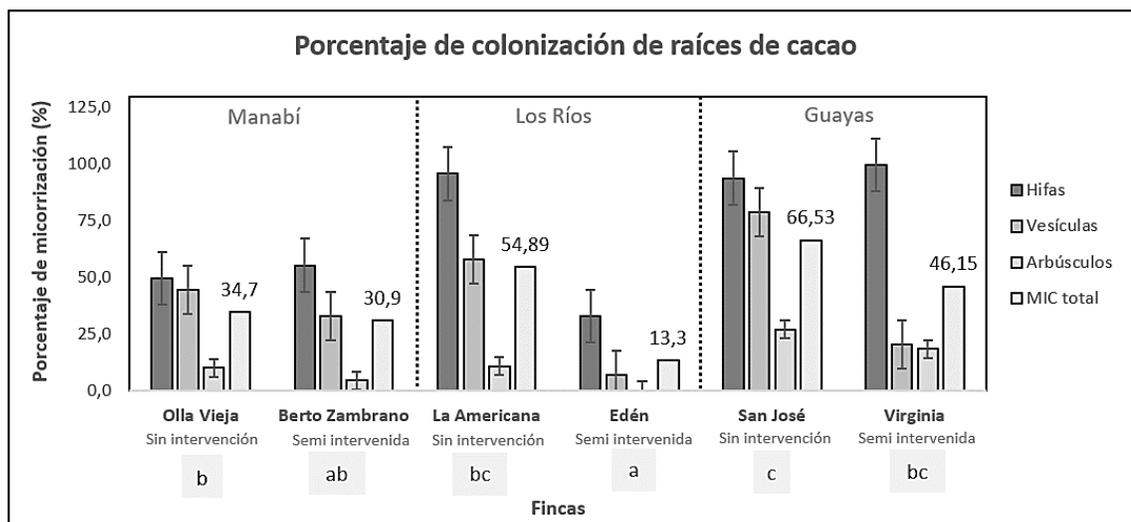
\* **STD: desviación estándar**

**Tabla VII.** Resultados promedios de los tipos de colonización en las raíces de cada finca cacaotera.

Provincia	Manabí				Los Ríos				Guayas			
	Sin intervención		Semi intervenido		Sin intervención		Semi intervenido		Sin intervención		Semi intervenido	
Finca	Olla Vieja	STD	Berto Zambrano	STD	La Americana	STD	Edén	STD	San José	STD	Virginia	STD
<b>Hifa</b>	49,6	4,9	55,3	3,8	95,8	2,0	33,0	7,9	93,8	1,5	99,6	0,5
<b>Vesícula</b>	44,4	4,2	32,9	1,8	58,0	10,1	7,0	2,7	78,7	2,4	20,4	3,6
<b>Arbúsculo</b>	10,0	2,4	4,4	0,6	10,9	4,9	0,0	0,0	27,1	2,2	18,4	4,0
<b>MIC total</b>	34,7	11,1	30,9	5,2	54,9	12,5	13,3	5,4	66,5	3,6	46,2	6,4

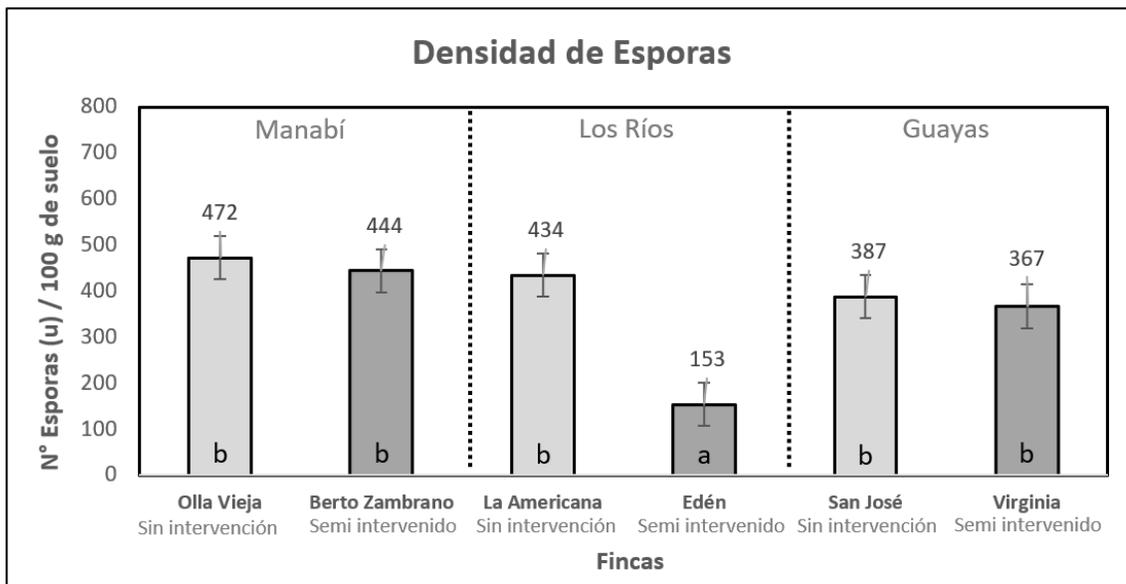
\* **STD: desviación estándar**

Los resultados del análisis de varianza (95 % de confianza), muestran que existe al menos cinco fincas diferentes, debido a la variación en el porcentaje de colonización en las raíces (**Fig. 13**).



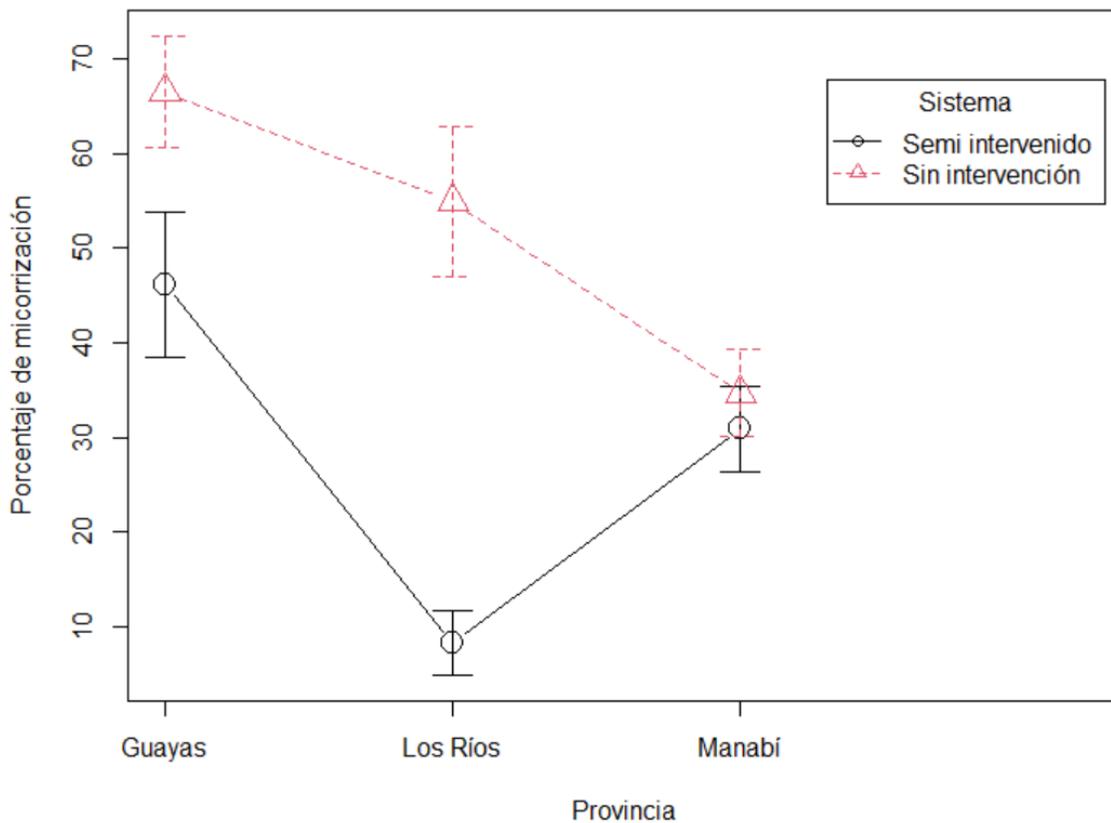
**Figura 13.** Porcentaje de micorrización de raíces de cacao de las seis fincas.

En Manabí se registran las densidades más altas de esporas, la provincia del Guayas presenta valores intermedios respecto a las otras fincas. y la finca El Edén, Los Ríos registra las densidades promedio más bajas. Los resultados del análisis de varianza (95 % de confianza) muestran que existe al menos una finca diferente (Edén), debido a la baja densidad de esporas en suelo (**Fig. 14**).



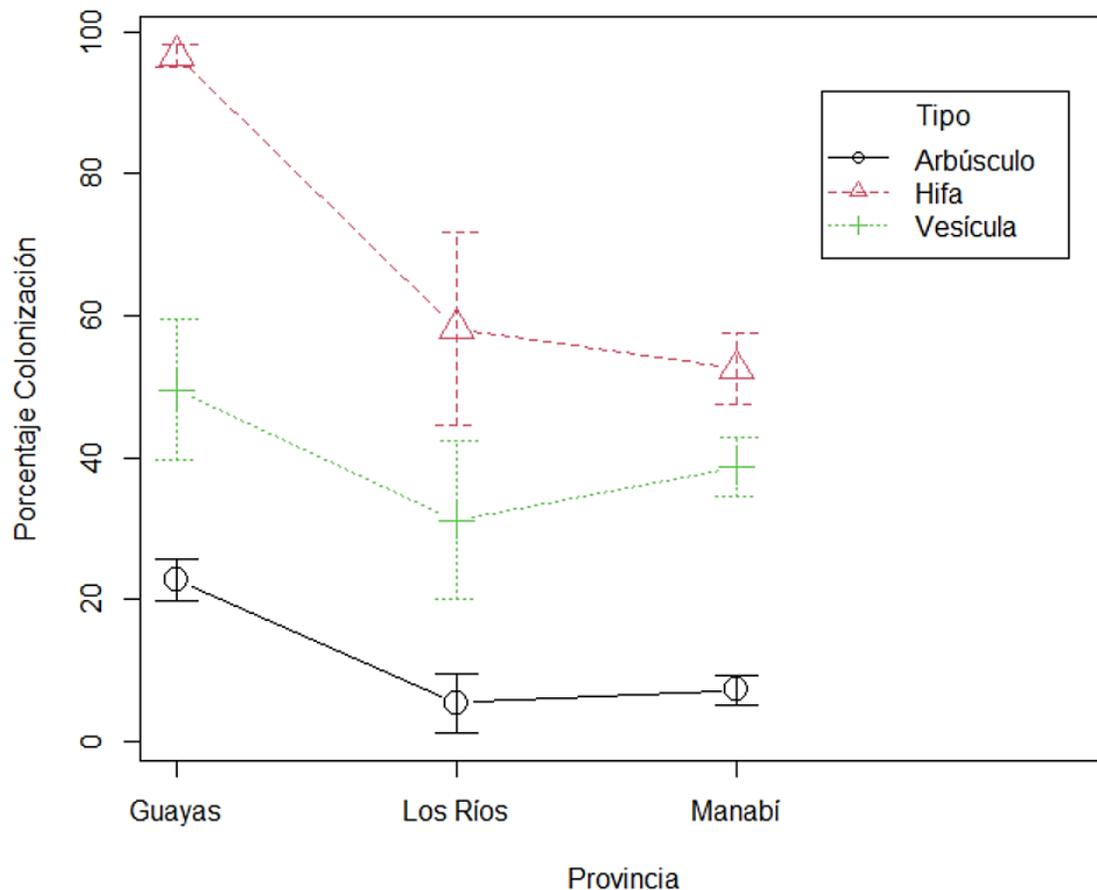
**Figura 14.** Densidad de esporas de la rizosfera del cacao de las seis fincas.

Al analizar las medias de las interacciones, en promedio, la provincia con mayor porcentaje de colonización es el Guayas. Se observa una tendencia proporcional de acuerdo a la edad que tiene la finca, lo cual se corrobora con la finca del Edén, que presenta menos años de cultivada (**Fig. 15**).



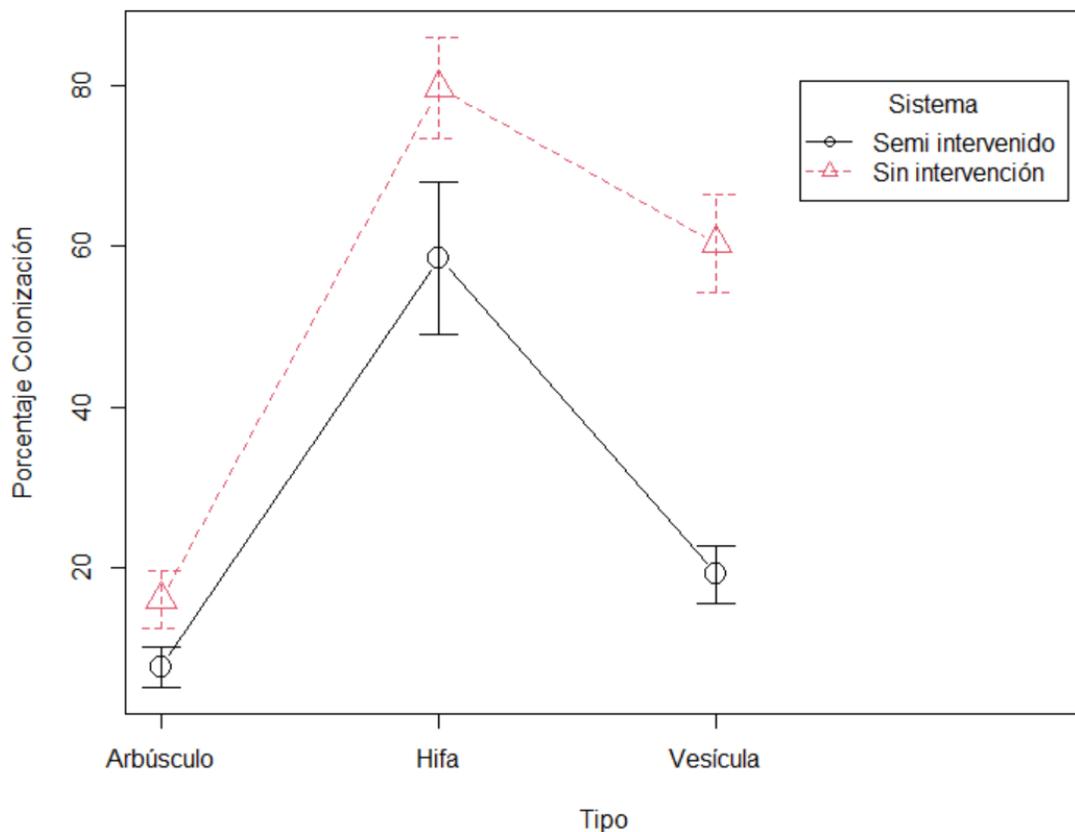
**Figura 15.** Gráfica con RStudio de Medias de la interacción provincia, porcentaje de colonización y sistema.

El porcentaje de colonización en las distintas estructuras micorrícicas sigue la misma tendencia, proporcional a la edad de las fincas. Los Ríos y Manabí presentan una media semejante en los tipos de micorrización. Esta tendencia puede estar influenciada por los datos de la finca El Edén y su edad productiva (**Fig. 16**).



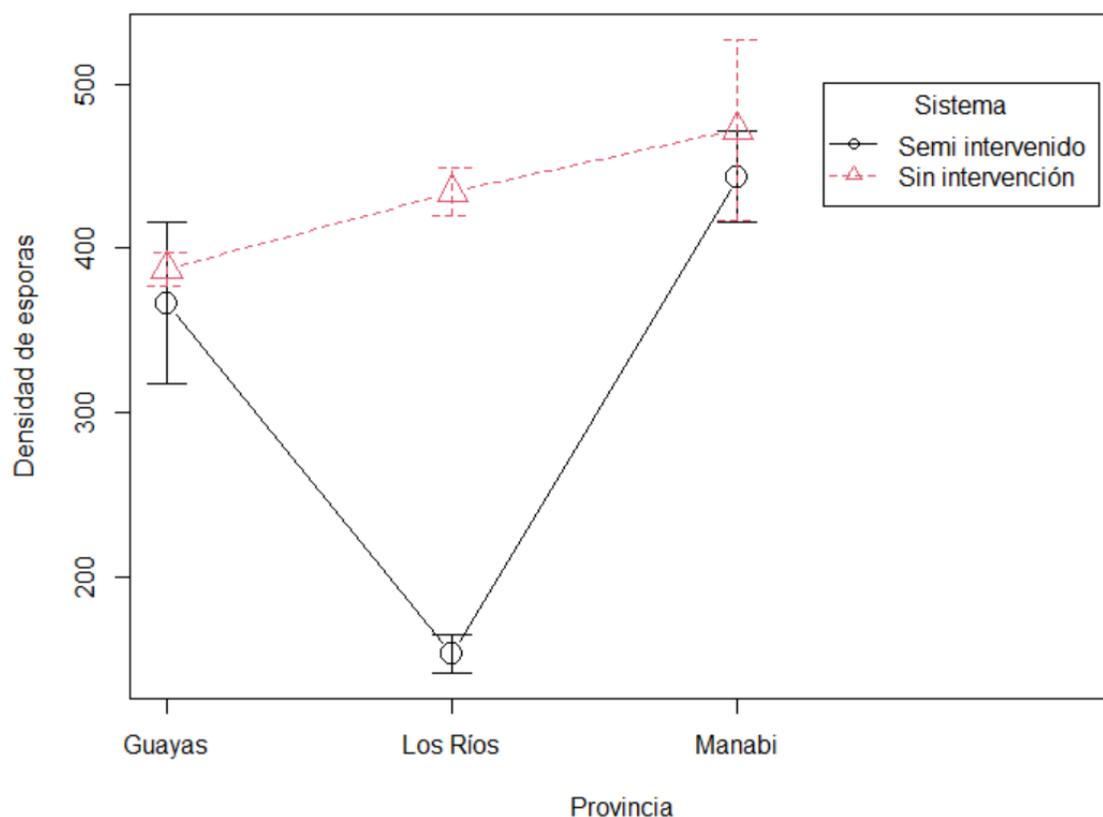
**Figura 16.** Gráfica con RStudio de Medias de la Interacción del tipo de colonización, su porcentaje y provincia.

Al comparar los dos sistemas de cultivo, como lo plantea el primer objetivo de este estudio, existe una diferencia entre ambos sistemas, siendo el agroforestal o sin intervención el que presenta una media superior respecto al porcentaje de colonización (**Fig. 17**). Cabe recalcar que este cultivo de forma general y a diferencia de otros cultivos, como el banano, no utiliza productos agroquímicos de forma excesiva, ya sea para control de plagas como para su fertilización. Esto se refleja en la diferencia no marcada de los valores medios de colonización.



**Figura 17.** Gráfica con RStudio de Medias de la interacción tipo de colonización, porcentaje de colonización y sistema.

En la gráfica de las medias del número de esporas por cada provincia de los dos sistemas no se observan diferencias marcadas, excepto por Edén (**Fig. 18**). Podría ocurrir que esta finca con el paso de los años vaya en aumento su densidad de esporas, o que su densidad de esporas se haya visto afectada por reciente uso de agroquímicos previo a la recolección de las muestras.



**Figura 18.** Gráfica con RStudio de Medias de la interacción de densidad de esporas, provincia y sistema.

Estos resultados son congruentes con los resultados de otros estudios comparativos de las diferentes prácticas de manejo sobre la diversidad de HMA. Symanczik et al., (2017) observaron una reducción de la micorrización radical, abundancia y diversidad de estos hongos en el sistema semi intervenido en comparación con el sistema sin intervención, poniendo en evidencia uno de los efectos que tienen las prácticas de manejo sobre el ecosistema natural a corto plazo (Symanczik et al., 2017).

Gosling et al. (2010) detectaron una mayor abundancia de esporas de HMA (11 esporas por g de suelo) y mayores tasas de micorrización (52%) en suelos orgánicos en comparación con suelo convencionales (6 esporas por gramo de suelo y 27% de micorrización).

Así mismo, (Oehl et al., 2010) realizaron ensayos a largo plazo comparando estos sistemas agrícolas, proporcionando evidencia del impacto beneficioso de la agricultura orgánica en comparación a la convencional en las comunidades de estos hongos sobre la cantidad de esporas y la diversidad. También, observaron que las especies de la familia *Glomeraceae* están presentes en todas las condiciones bajo estudio, mientras que las familias *Acaulosporaceae* y *Scutellosporaceae* están presentes de forma más exclusiva en los sistemas orgánicos (Faggioli & Symanczik, 2018).

Sin embargo, en este estudio se logró identificar morfológicamente la presencia de las tres familias (*Glomeraceae*, *Acaulosporaceae* y *Scutellosporaceae*) en ambos sistemas, en proporciones semejantes como se observa en la tabla de anexos de identificación morfológica.

#### **4.2 Análisis físico-químico del suelo**

Los resultados de los parámetros físicos y químicos del suelo, en las localidades estudiadas, se presentan en la **tabla VIII**.

De forma general, las plantas cultivadas presentan su mejor desarrollo en valores de pH cercanos a la neutralidad, ya que en estas condiciones los nutrientes están más disponibles y en un equilibrio más adecuado. Estudios sugieren que el cacao prefiere suelos con pH que tienden a la acidez entre 5.5 y 6.5, suelos francos y con altos niveles de potasio (Tuesta-Pinedo et al., 2017).

El pH en la mayoría de localidades presenta una tendencia ácida, exceptuando dos fincas: Virginia con un pH cercano al neutro y La Americana con un pH alcalino. Los suelos con pH básico suelen caracterizarse por un exceso en su contenido de calcio, impidiendo que otros elementos, como el hierro, sean absorbidos por las plantas.

Alvarado et al. (2004) en su estudio de las características edáficas sobre micorrizas demostró que la acidez del suelo tiene un efecto adverso sobre el proceso de infección en el desarrollo de las raíces, inhibiendo el desarrollo del hongo o raíz. Además, cuanto menor sea el pH del suelo, mayor será su potencial de percolación catiónica y mayor la cantidad de fosfato fijado en el suelo y, por lo tanto, menor su biodisponibilidad (Janos 1987). Así mismo, (Siqueira, Colozzi-filho & Oliveira, 1989) sugiere que se obtiene una buena germinación de esporas de HMA en un rango de pH que va de 5 a 8.

**Tabla VIII.** Resultados de análisis de suelos correspondientes a los cantones de Chone, Milagro y Vinces, Ecuador. Febrero, 2021.

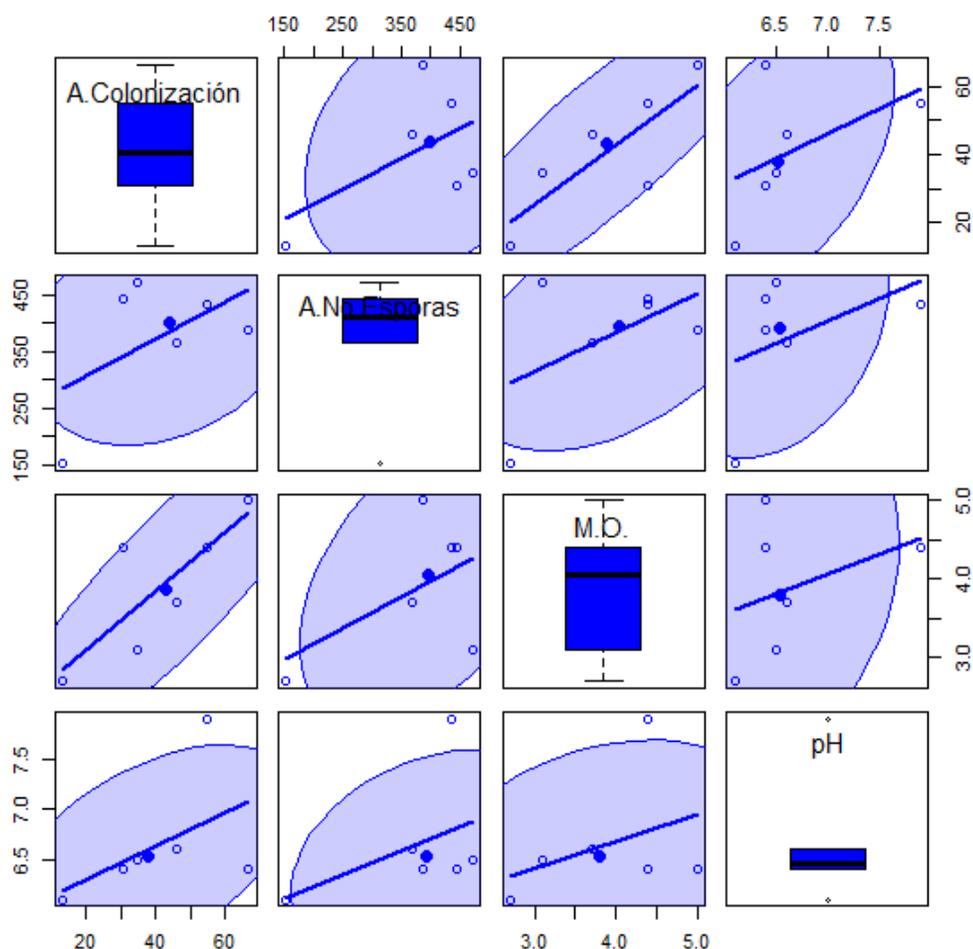
Provincia	Cantón	Sistema	Finca	Textura (%)			Clase Textural	M.O. (%)
				Arena	Limo	Arcilla		
Manabí	Chone	Semi intervenido	Berto Zambrano	18,0	54,0	28,0	Franco-Arcillo-Limoso	4,4
Manabí	Chone	Sin intervención	Olla Vieja	22,0	62,0	16,0	Franco-Limoso	3,1
Guayas	Milagro	Semi intervenido	Virginia	54,0	36,0	10,0	Franco-Arenoso	3,7
Guayas	Milagro	Sin intervención	San José	16,0	56,0	28,0	Franco-Arcillo-Limoso	5,0
Los Ríos	Vinces	Semi intervenido	Edén	38,0	42,0	20,0	Franco	2,7
Los Ríos	Vinces	Sin intervención	La Americana	20,0	58,0	22,0	Franco-Limoso	4,4

Finca	ug/ml												mEq/100 ml			
	pH	NH <sub>4</sub>	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	Fe	Mn	B	Σ Bases	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K
B. Zambrano	6,4	27	100	737	4456	797	296	5,5	6,3	42	13	0,8	30,73	3,4	3,47	15,26
Olla Vieja	6,5	19	46	774	4938	806	253	3,8	4,1	50	16	0,8	33,31	3,72	3,34	15,78
San José	6,4	30	20	314	4847	512	162	3,7	8,4	95	17	0,8	29,25	5,75	5,23	35,33
Virginia	6,6	22	7	125	4314	505	14	3,3	8,8	117	14	1,2	26,05	5,19	12,97	80,27
Edén	6,1	16	105	389	2649	617	18	7,4	14,5	355	12	1,9	19,32	2,61	5,09	18,37
La Americana	7,9	27	37	351	4632	626	632	9,1	6,3	109	16	1,9	29,21	4,5	5,72	31,46

MO: materia orgánica, Σ Bases: suma de bases.

En el rango de valores obtenidos en la **tabla VIII**, existe una relación directa y muy enlazada entre el contenido de MO y el porcentaje de colonización total. De modo semejante, existe una relación directa y cercana entre el pH y la micorrización total. La densidad de esporas presenta una relación directa con MO y pH, pero menos estrecha (**Fig. 19**).



**Figura 19.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados en relación a la MO y el pH.

La MO afecta las propiedades físicas, biológicas y químicas del suelo aumentando la agregación, porosidad y la actividad biológica, suministrando nutrientes (N, P, K, S entre otros), energía y hábitat para la microfauna edáfica mejorando así la estructura del suelo,

la infiltración y la aireación del agua y reteniendo los nutrientes que están en una forma disponible para las plantas.

La superficie de MO cargada con aniones atrae cationes ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $H^+$ ) (Viets, 1964), lo que demuestra una elevada capacidad de intercambio catiónico para retener cationes en el suelo. Jøner & Jakobsen, (1995) demostraron que el desarrollo de HMA se estimulaba en presencia de MO, lo cual concuerda con los resultados de esta investigación. Así mismo, se menciona que la MO aumenta la proliferación de hifas de HMA en el suelo (Coleman & Reid, 1983).

No obstante, una mayor concentración de nutrientes puede limitar el desarrollo de HMA, ya que la disponibilidad de nutrientes reduce la dependencia de las plantas hospedantes de la asociación micorrícica (Noda, 2004).

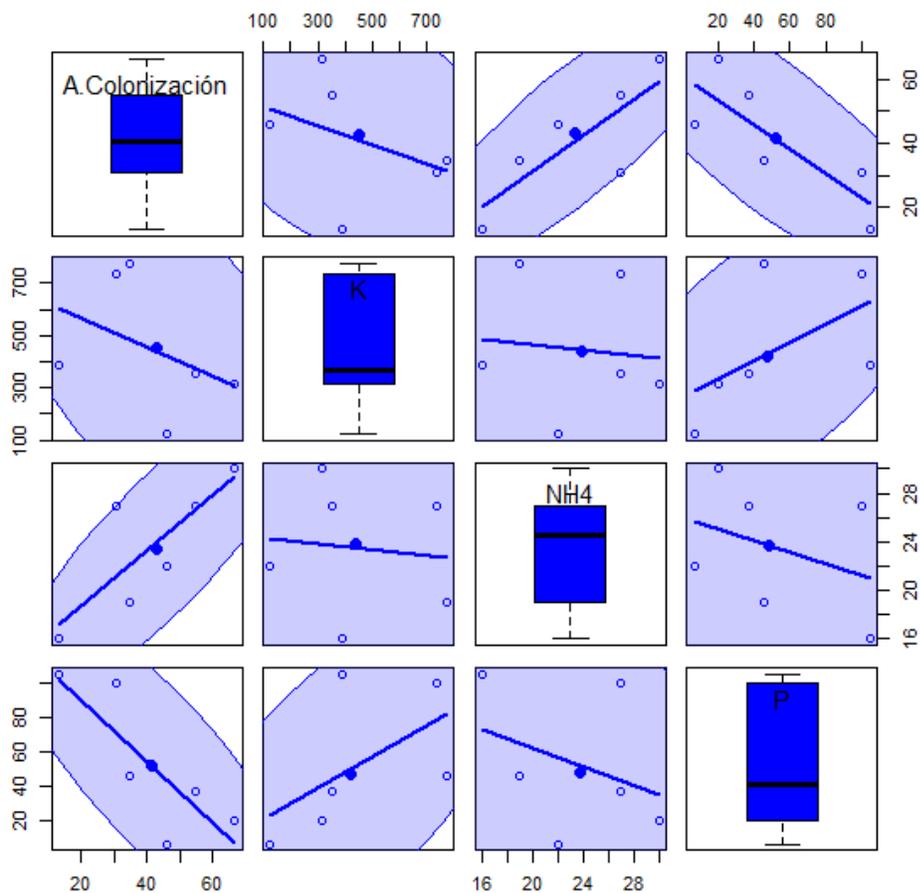
Es de tener presente que las plantas en estado de crecimiento segregan mayores cantidades de exudados y enzimas que participan en la descomposición de la MO, aumentando las concentraciones de fósforo soluble en el suelo (Peña-Venegas et al., 2007). Esto explicaría porque Edén, la finca más joven, presenta la menor cantidad de materia orgánica y el mayor contenido de P en contraste a las otras fincas (**Tabla VIII**).

Las hifas ejercen presiones considerables sobre las partículas del suelo y forzar la MO y a las partículas de arcilla de una manera similar a la acción física de las raíces, formando agregados (Rillig & Mummey, 2006). Pero, una textura muy fina genera espacios reducidos entre las partículas del suelo y aumenta la tensión mecánica en las raíces, de modo que aumenta la rotura de las capas corticales y se pierden los sitios de colonización (Janos 1987).

### **Macro y micro nutrientes**

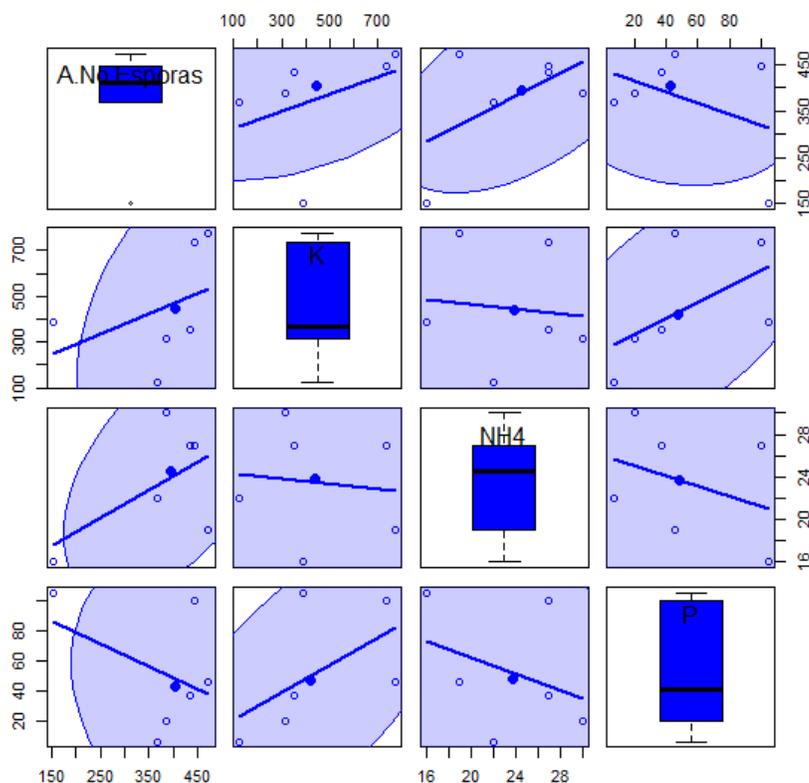
En varias investigaciones se ha determinado que parámetros como la acidez, la concentración de MO, P, N, Al, Cu y Zn en el suelo inciden sobre el buen establecimiento y desempeño de la simbiosis, lo cual se refleja en la capacidad de colonización de hospederos y la producción de esporas de los hongos (Oehl et al., 2010). Según Hepper & Warner, 1981, el balance de nutrimentos del suelo es lo que más influye sobre el desarrollo de las micorrizas y niveles altos de Al, Mn, Cu, Fe y P parecen tener un efecto negativo en las HMA y en la simbiosis. Mientras que la deficiencia de Mg y Zn puede inhibir la germinación de esporas.

Existe una relación inversa entre la colonización y el contenido de K y P, siendo esta última más fuerte, y una relación directa y cercana entre la colonización y el contenido de  $\text{NH}_4$  (Fig. 20).



**Figura 20.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes primarios en relación con la colonización micorrícica.

Existen relaciones menos estrechas pero directas para el caso del K,  $\text{NH}_4$  e inversa en el caso del P, respecto a su densidad de esporas (Fig. 21).



**Figura 21.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes primarios en relación con la densidad de esporas.

El nitrógeno, el potasio y el fósforo son macronutrientes primarios. El nitrógeno orgánico se libera poco a poco para ser utilizado por las plantas. Por lo tanto, la medida analítica de nitrógeno no expresa la cantidad disponible por las plantas (Rodríguez, 2001). Los valores de N se encuentran en concentraciones bajas a medias en todas las fincas (**Tabla VIII**).

Se ha comprobado que el N en forma de  $\text{NH}_4$  tiene un efecto supresor sobre la colonización de micorrizas afectando la longitud de la raíz y la presencia de tipos de estructuras colonizadoras como arbusculos (Pérez-C. & De La Ossa V., 2013).

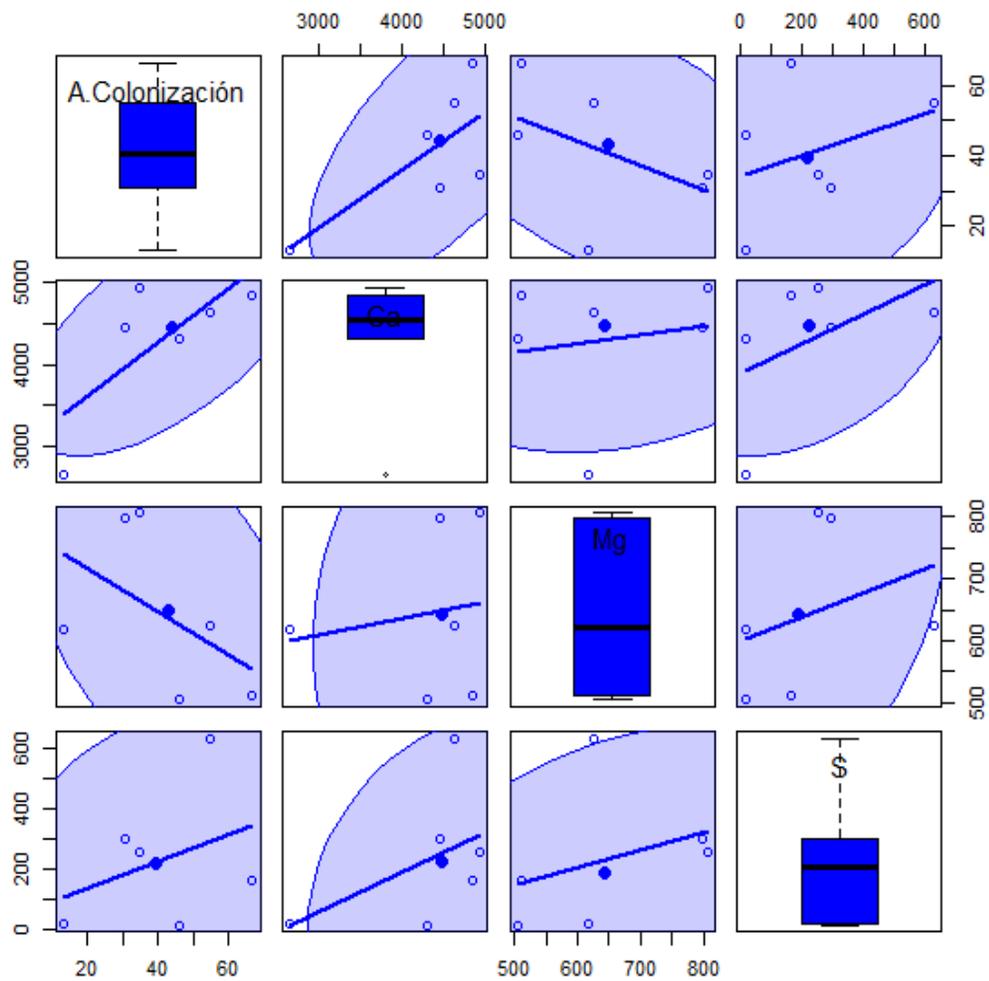
El potasio se encuentra en el suelo en forma de catión intercambiable, es decir, adsorbido a las arcillas y adherido a la MO en sus sitios de intercambio, pasando sin dificultad a la solución del suelo por la acción de ácidos débiles. Este elemento se encuentra en altas concentraciones en todas las fincas, excepto en la finca Virginia, donde su contenido es

moderado; el fósforo también se encuentra en altas concentraciones en todas las fincas, excepto Virginia, donde su contenido es muy bajo y en San José con un contenido muy bajo, ambas ubicadas en Milagro (**Tabla VIII**). En suelos básicos el fósforo se inactiva con facilidad en formas insolubles, por lo que suele encontrarse poco fósforo en forma activa. Se ha demostrado que la fertilización con P puede reducir el porcentaje de infección, según (Smith, 1988; Douds & Schenck, 1990) esto se debe a que suprime el desarrollo de las estructuras del hongo y disminuye el número de puntos de penetración y esporas.

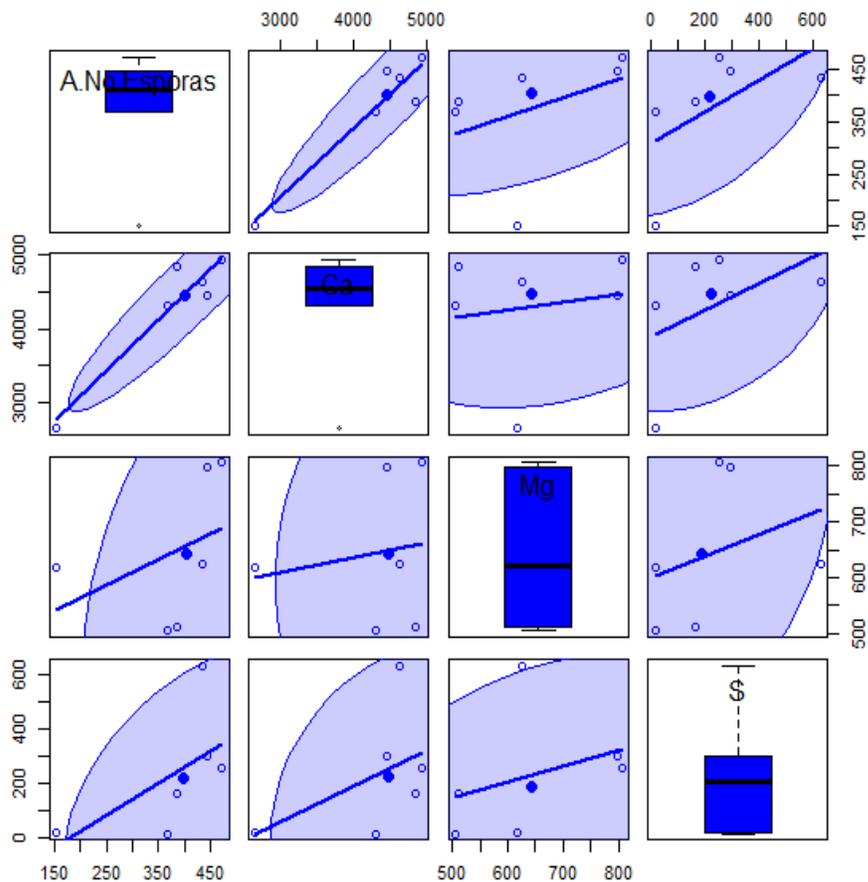
En su experimentación, Douds & Schenck (1990) encontraron que las plantas que reciben una solución nutritiva balanceada sin P de manera consistente tienen mayor porcentaje de longitud de raíz colonizada por HMA y que existe una variabilidad en la esporulación dependiendo de las concentraciones y proporción de ciertos nutrientes como el N y P.

El Ca, el Mg y el S son los macronutrientes secundarios necesarios en menor cantidad. El Ca se encuentra en concentraciones altas en todas las fincas al igual que el Mg; el S presenta concentraciones altas en casi todas sus fincas menos en Virginia y Edén (**Tabla VIII**).

Existe una relación directa entre la colonización y el contenido de S y Ca, siendo esta última más fuerte, y una relación inversa pero débil entre la colonización y el contenido de Mg (**Fig. 22**). También, se observa una relación muy cercana y directa entre el contenido de Ca y el número de esporas, y una relación directa pero no estrecha del Mg y S respecto a su densidad de esporas (**Fig. 23**).



**Figura 22.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes secundarios en relación con la colonización.

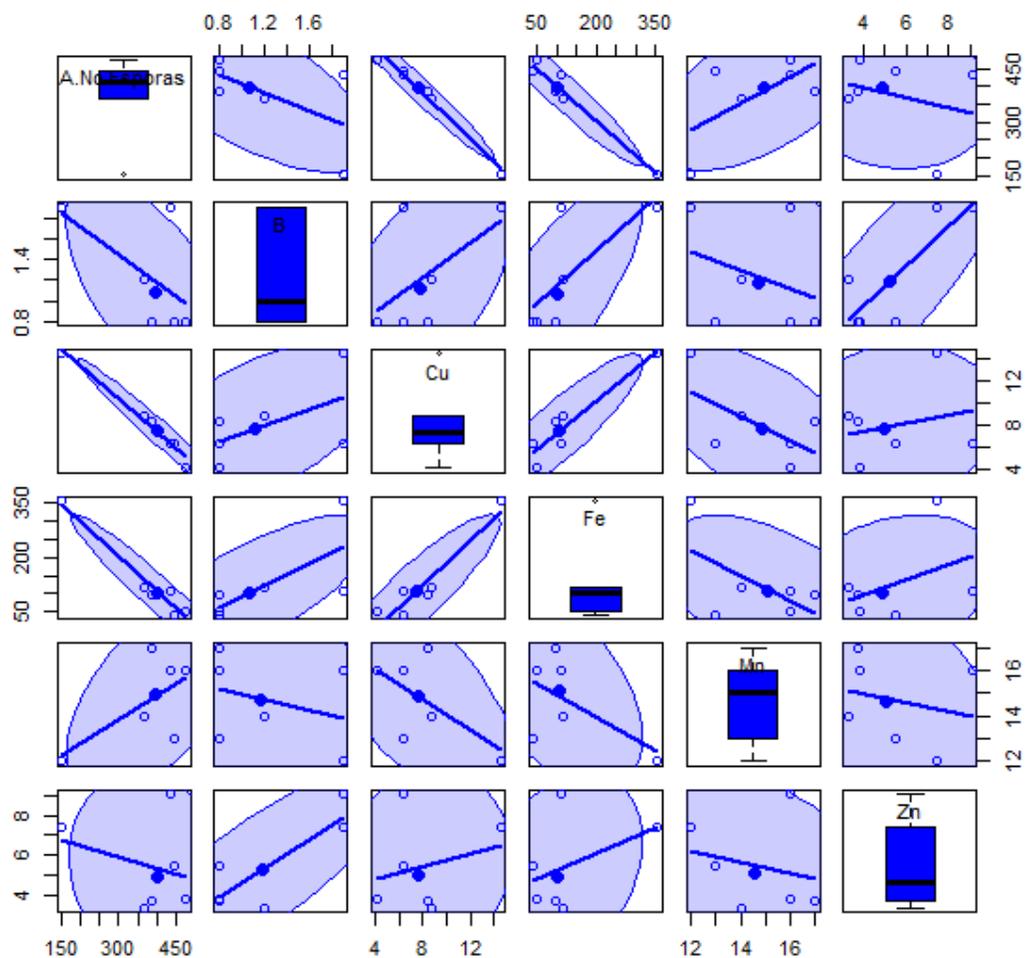


**Figura 23.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de macronutrientes secundarios en relación con la densidad de esporas.

Elevado Mg y bajo Ca induce la senescencia prematura de la raíz, lo que puede interrumpir la asociación micorrícica (Pérez-C. & De La Ossa V., 2013).

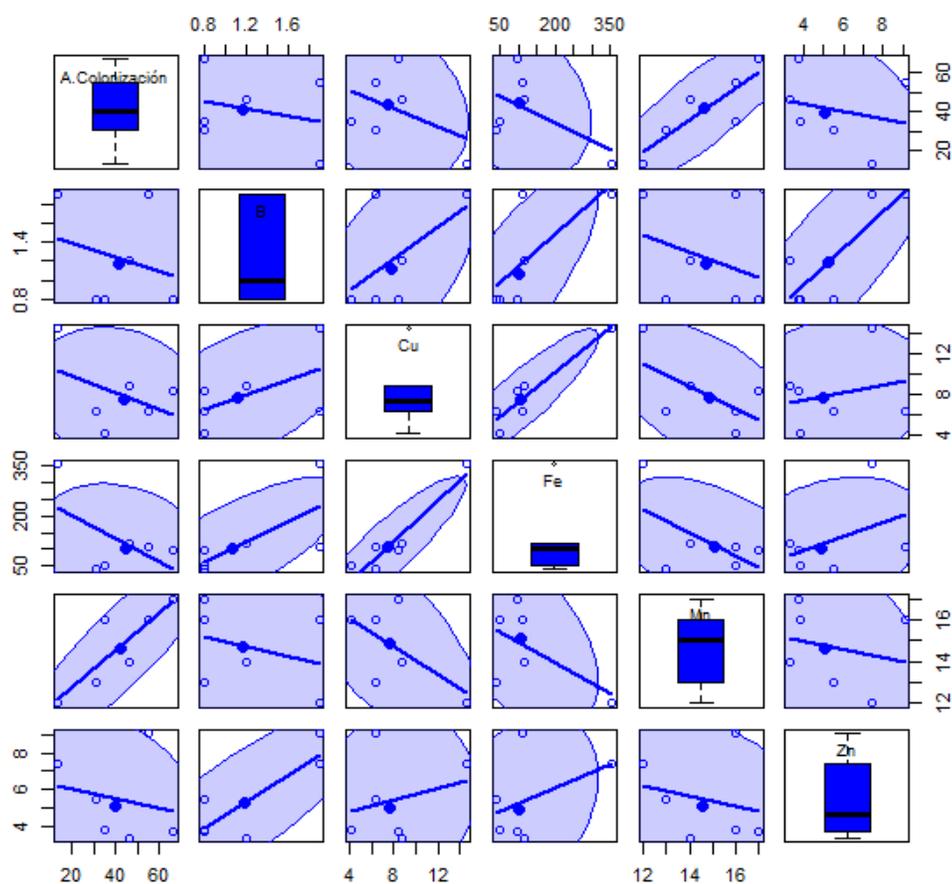
Entre los micronutrientes necesarios en muy bajas cantidades por su toxicidad, se encuentra: el Fe, Mn, Cu, Zn, B y Cl (Rodríguez, 2001).

Existe una relación inversa entre la densidad de esporas y el contenido de B, Zn, Cu y Fe, siendo las dos últimas las que presentan una relación más cercana, a diferencia de las relaciones anteriores; existe una relación directa y estrecha con el contenido de Mg (**Fig. 24**).



**Figura 24.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de micronutrientes en relación con la densidad de esporas.

Se observa una relación muy directa entre el contenido de Mn y la colonización total, y una relación inversa pero lejana del B, Cu y Zn respecto a la colonización (**Fig. 25**).



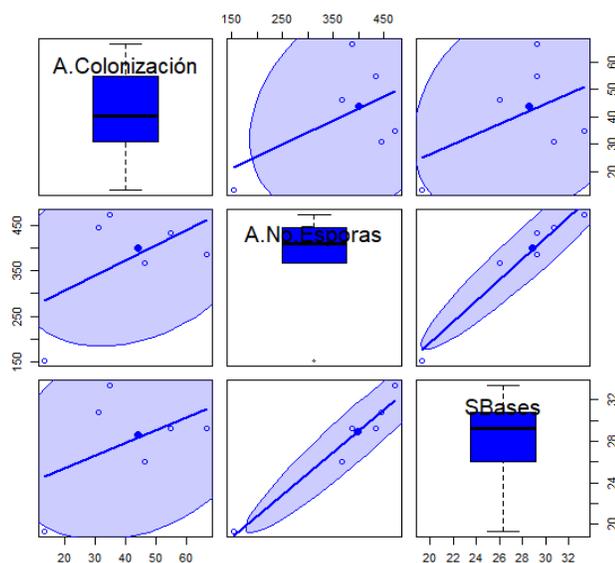
**Figura 25.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de micronutrientes en relación con la colonización micorrícica.

El Cu y Fe se encuentran en altas cantidades en todas las fincas, el Zn está en concentraciones moderadas en la mayoría de las fincas menos en las fincas de Vines y el Mn se encuentra en altas concentraciones solo en las fincas semi intervenidas (**Tabla VIII**).

El análisis de capacidad de intercambio catiónico (CIC) se proporciona en miliequivalentes por 100 gramos de tierra y los cationes de cambio principales: Mg, Ca y K (Peña-Venegas et al., 2007). La saturación por bases (SB) se da en porcentaje y refiere a los cationes principales respecto al valor de la CIC total e indica la cantidad de cationes intercambiables que hay en el suelo. Cuanto mayor sea el grado de SB más posibilidades tiene el suelo para retener cationes. Se puede observar que la SB es semejante en todas las fincas, excepto en

Edén. Las fincas con mayores SB se encuentran en Manabí, seguidas por Milagro (**Tabla VIII**).

Hay una relación directa y muy estrecha entre la colonización y la sumatoria de bases, y una relación directa y no estrecha entre la colonización y la sumatoria de bases (**Fig. 26**). Esto era de esperarse, dada las relaciones con los minerales Ca, Mg y K, antes analizados (**Figs. 20-23**).



**Figura 26.** Matriz de diagrama de dispersión, caja y bigotes, elipsoide de concentración y línea de mínimos cuadrados de la sumatoria de bases en relación con la colonización micorrícica y su densidad de esporas.

La capacidad de atraer cationes puede llegar a ser antagonista, ya que de la misma forma son capaces de adsorber otros iones de residuos de agroquímicos, pudiendo salir a la solución del suelo a través de cambios en el ambiente (Tuesta-Pinedo et al., 2017).

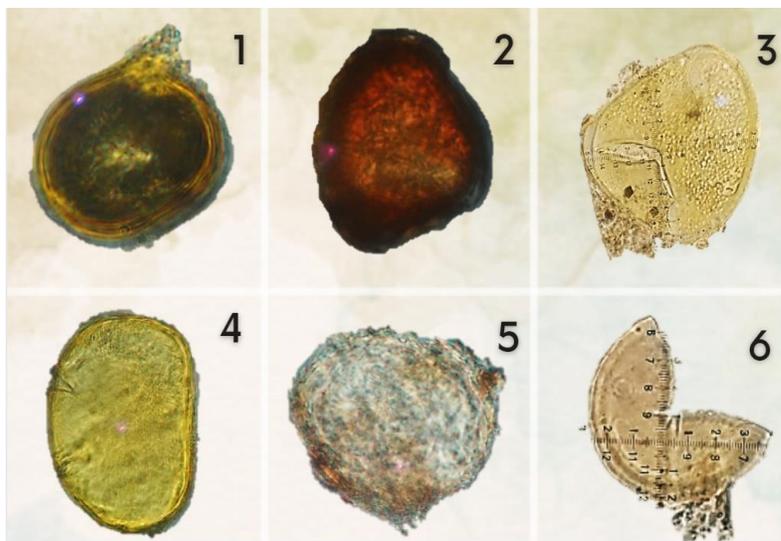
Los herbicidas afectan la diversidad de especies de micorrizas, ya que eliminan poblaciones de malezas que son hospederos potenciales, mientras varios funguicidas sistémicos son tóxicos para los hongos y la fumigación del suelo con biocidas destruye en efecto subgrupos de HMA. Favorablemente estos hongos vuelven a colonizar suelos que han sido fumigados por años (Rodríguez, 2001).

Los suelos de las zonas con fuerte actividad agrícola con sistemas semi intervenidos, donde se utilizan agroquímicos, suelen presentar desequilibrios en las poblaciones de microorganismos edáficos, siendo por ello necesario cuidar los niveles de MO y proporcionar compuestos orgánicos animales o vegetales que ayuden a la reposición de su fauna (Meena et al., 2020).

### 4.3 Análisis morfológico

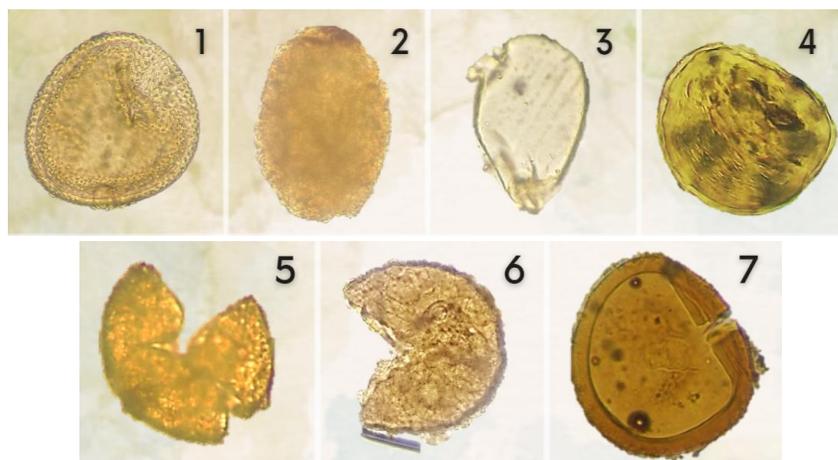
En la evaluación morfológica de las esporas se analizaron algunas características, entre ellas: forma, tamaño, rango de diámetro, color, número de paredes visibles, estructura y presencia de conexión hifal, siguiendo los manuales de identificación antes descritos en la metodología.

En la provincia del Guayas, en la finca San José se identificaron los siguientes géneros (Fig. 27).



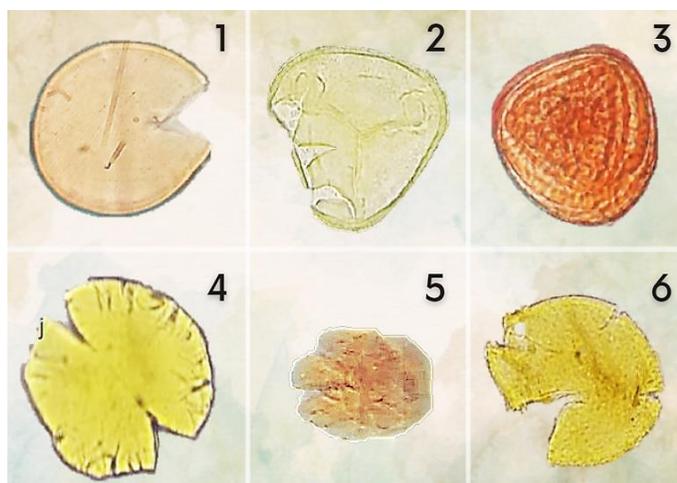
**Figura 27.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia del Guayas – Milagro, “Finca San José”. 1) *Glomus*, 2) *Scutellospora*, 3) *Acaulospora*, 4) *Pacispora*, 5) *Ambispora* y 6) *Racocetra*.

En la misma provincia, en la finca Virginia se identificaron los siguientes géneros (Fig. 28).



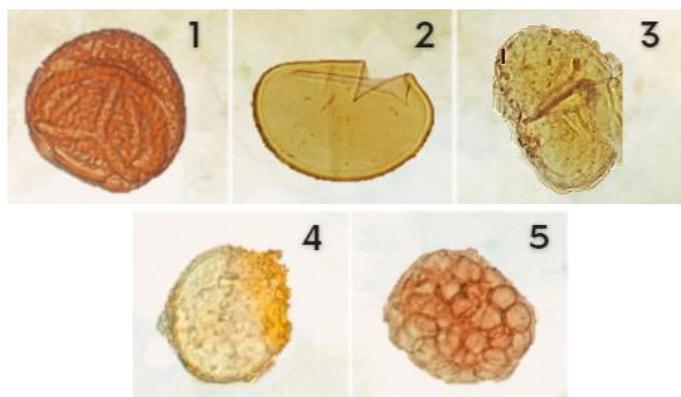
**Figura 28.** Identificación de géneros de HMA de la provincia de Guayas – Milagro, hacienda Virginia. 1) *Entrophospora*, 2) *Pacispora*, 3) *Archaeospora*, 4) *Paraglomus*, 5) *Scutellospora*, 6) *Ambispora*, 7) *Glomus*.

En la provincia de Los Ríos, en la hacienda La Americana se identificaron los siguientes géneros (**Fig. 29**).



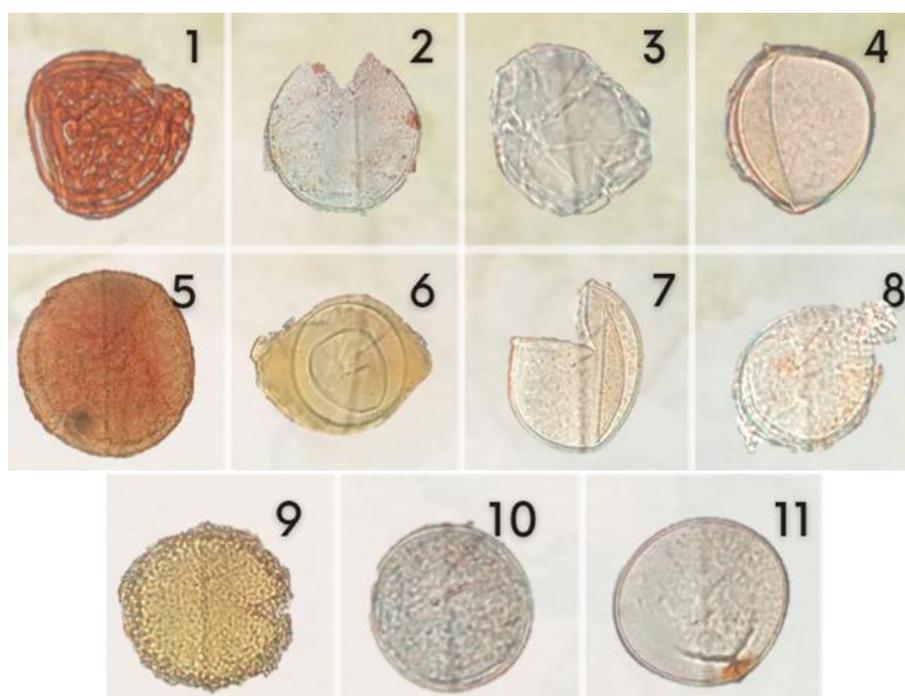
**Figura 29.** Identificación de géneros de la provincia de Los Ríos en hacienda “La Americana”. 1) *Acaulospora*, 2) *Glomus*, 3) *Acaulospora*, 4) *Pacispora*, 5) *Diversispora*, 6) *Ambispora*.

En la misma provincia, en la hacienda Edén se identificaron los siguientes géneros (**Fig. 30**).



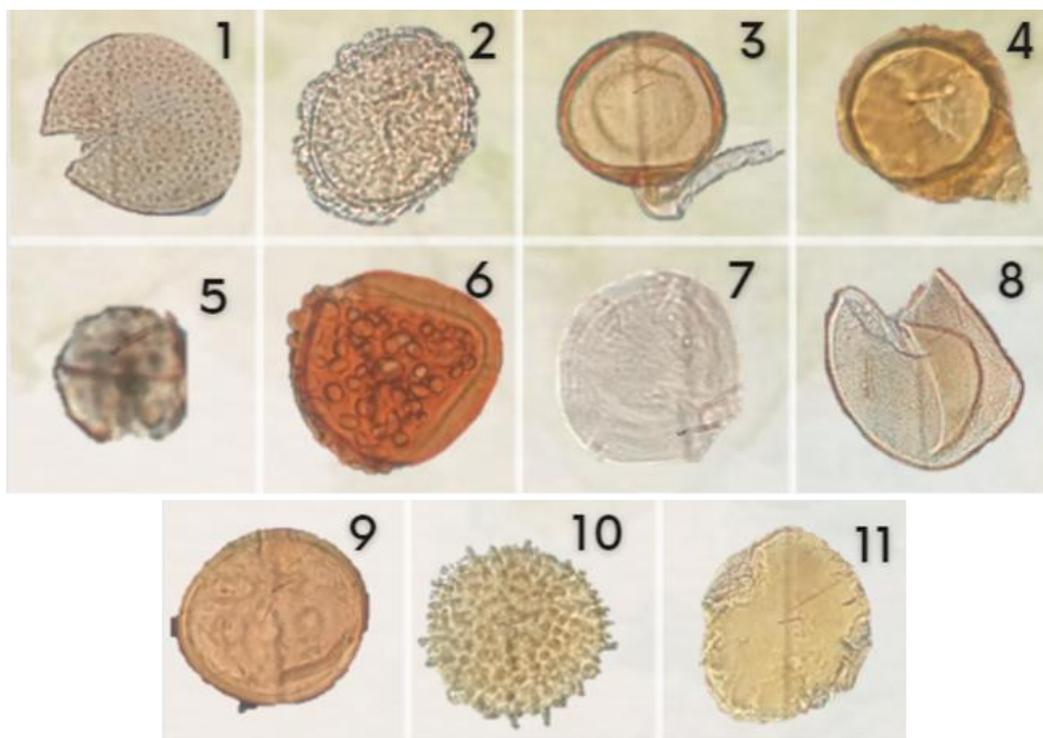
**Figura 30.** Identificación de géneros de la provincia de Los Ríos en la hacienda “Edén”.  
1) *Acaulospora*, 2) *Pacispora*, 3) *Entrophospora*, 4) *Ambispora*, 5) *Glomus*.

En la provincia de Manabí, en la hacienda Berto Zambrano se identificaron los siguientes géneros (**Fig. 31**).



**Figura 31.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia de Manabí. Hacienda “Berto Zambrano”. 1) *Acaulospora*, 2) *Ambispora*, 3) *Intraspora*, 4) *Archaeospora*, 5) *Gigaspora*, 6) *Glomus*, 7) *Pacispora*, 8) *Paraglomus*, 9) *Entrophospora*, 10) *Diversispora*, 11) *Scutellospora*.

En la misma provincia de Manabí, en la hacienda San José de Olla Vieja se identificaron los siguientes géneros (**Fig. 32**).



**Figura 32.** Identificación de géneros de hongos micorrícicos arbusculares de la provincia de Manabí - “Hacienda San José de Olla Vieja”. 1) *Acaulospora*, 2) *Ambispora*, 3) *Diversispora*, 4) *Entrophospora*, 5) *Glomus*, 6) *Gigaspora*, 7) *Intraspora*, 8) *Pacispora*, 9) *Paraglomus*, 10) *Scutellospora*, 11) *Archaeospora*.

Pese a la variabilidad de géneros encontrados cabe destacar que el morfotipo más abundante fue el género *Glomus* todas las rizosferas de las coberturas en las zonas de las fincas evaluadas.

Dicho de forma breve, los resultados anteriores muestran que el cacao nacional es un cultivo micotrófico dependiente, lo cual le permite ser cultivado en suelos ácidos y de baja fertilidad.

El resumen de los géneros de hongos formadores de micorriza arbuscular identificados por metodología convencional en las tres provincias se enlistan a continuación:

**Tabla IX.** Géneros de HFMA identificados morfológicamente en las tres provincias.

Guayas		Manabí		Los Ríos	
Sin intervención	Semi intervenido	Sin intervención	Semi intervenido	Sin intervención	Semi intervenido
<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Glomus</i> <i>Pacispora</i> <i>Racocetra</i> <i>Scutellospora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Glomus</i> <i>Pacispora</i> <i>Paraglomus</i> <i>Scutellospora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Diversispora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Glomus</i> <i>Intraspora</i> <i>Pacispora</i> <i>Paraglomus</i> <i>Scutellospora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Archaeospora</i> <i>Diversispora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Glomus</i> <i>Intraspora</i> <i>Pacispora</i> <i>Paraglomus</i> <i>Scutellospora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Diversispora</i> <i>Glomus</i> <i>Pacispora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Ambispora</i> <i>Entrophospora</i> <i>Glomus</i> <i>Pacispora</i>

Especies de los géneros *Acaulospora*, *Ambispora*, *Claroideoglosum*, *Diversispora*, *Funneliformis*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pacispora*, y *Scutellospora*, ya han sido reportadas anteriormente en sistemas agroforestales del Ecuador (Moina-Quimi et al., 2018).

Las esporas de estos géneros difieren en tamaño, agrupación, color, forma y número de capas, factores que hacen posible su identificación y clasificación.

#### 4.4 Análisis Molecular

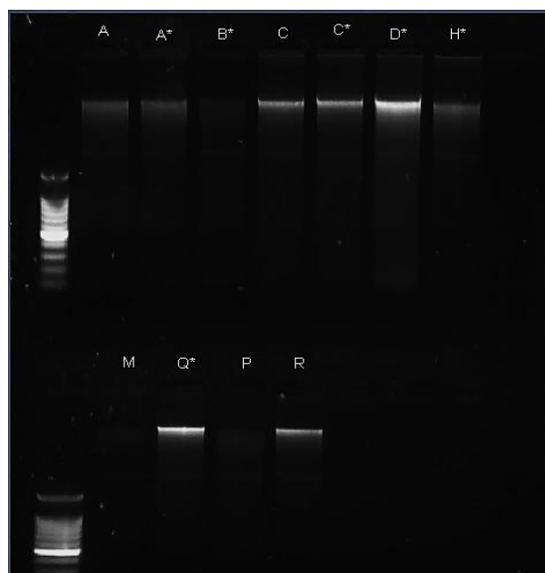
Por otro lado, se efectuó la extracción de ADN de las muestras de raíz, suelo y esporas con las siguientes concentraciones y pureza (Tabla X).

**Tabla X.** Rendimiento de ADN y rango de pureza de los tres tipos de muestra.

Ubicación		Suelo		Raíz		Esporas	
Cantón	Finca	Concentración de ADN (ng/μl)	Pureza 260/280	Concentración de ADN (ng/μl)	Pureza 260/280	Concentración de ADN (ng/μl)	Pureza 260/280
Chone	B. Zambrano	161,8	1,89	56,2	1,9	111,2	1,87
		169,1	1,88	56,8	1,73	135,6	1,89
		161,8	1,89	56,2	1,9		
Milagro	Virginia	131,7	1,85	66,6	1,83	268,5	1,88
		143,7	1,86	63,1	1,86	280,3	1,87
		131,7	1,85	74,1	1,89		
Vinces	Edén	62,5	1,8	56,2	1,82	22,2	1,85

		161,9	1,89	52,1	1,82	31,3	1,71
		62,5	1,8	110,9	1,83		
Milagro	San José	196,3	1,9	47,3	1,9	75,5	1,66
		188	1,89	47,3	1,9	22,7	1,87
		196,3	1,9	47,3	1,9		
Vinces	La Americana	242,6	1,91	107,9	1,73	189,2	1,95
		284,2	1,88	60,7	1,73	148,4	1,89
		242,6	1,91	93,6	1,74		
Chone	San José de Olla Vieja	80,3	1,88	27,8	1,87	32,6	1,85
		115,9	1,85	119,4	1,82	45,7	1,79
		80,3	1,88	119,4	1,82		

También, se corrieron las muestras de ADN extraído por medio de electroforesis en gel de agarosa para observar la calidad del mismo, obteniendo los siguientes resultados (**Fig. 33**).

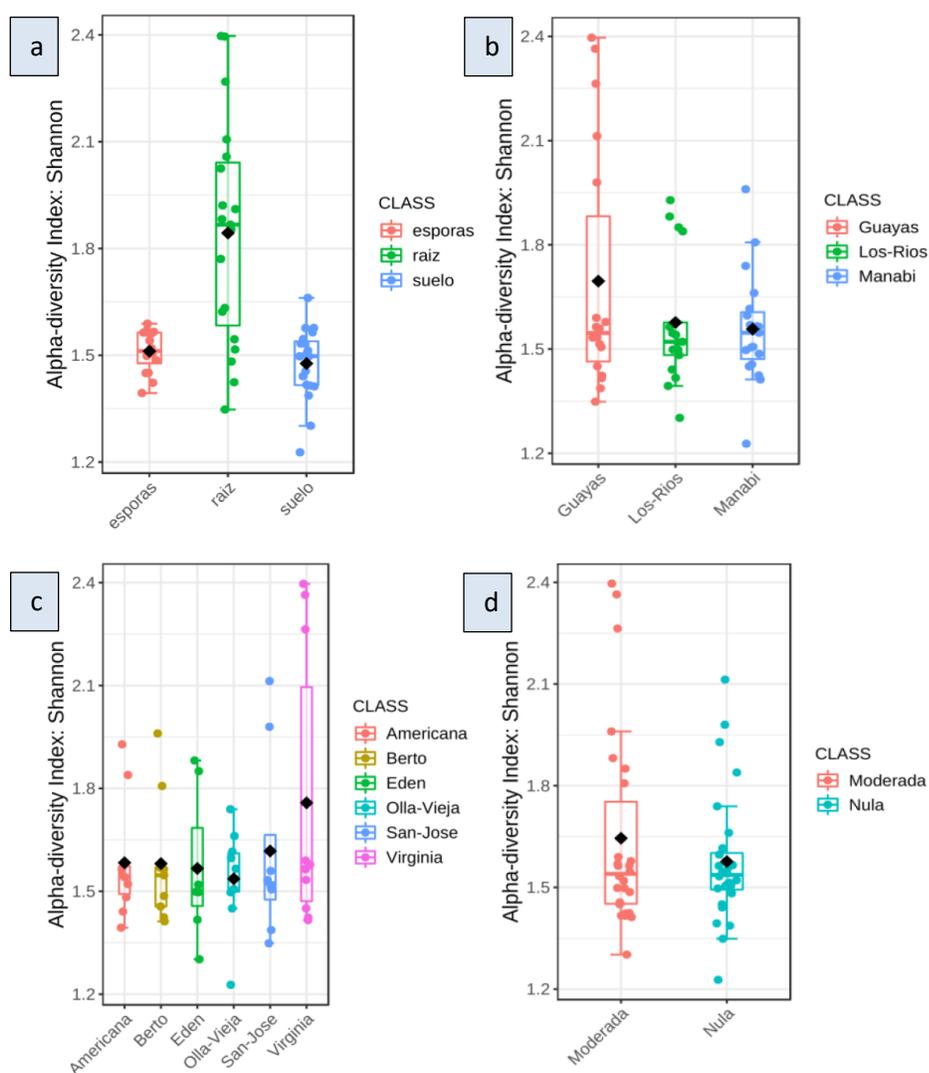


**Figura 33.** Electroforesis en gel de agarosa de muestras de suelo, esporas y raíz.

### Análisis de secuenciación

Se evaluaron 4 factores experimentales, los cuales fueron: Origen, Provincia, Finca e Intervención, para revisar si existen diferencias significativas entre la diversidad de las comunidades de hongos en cada una de ellos (global). Se utilizó pruebas paramétricas y no

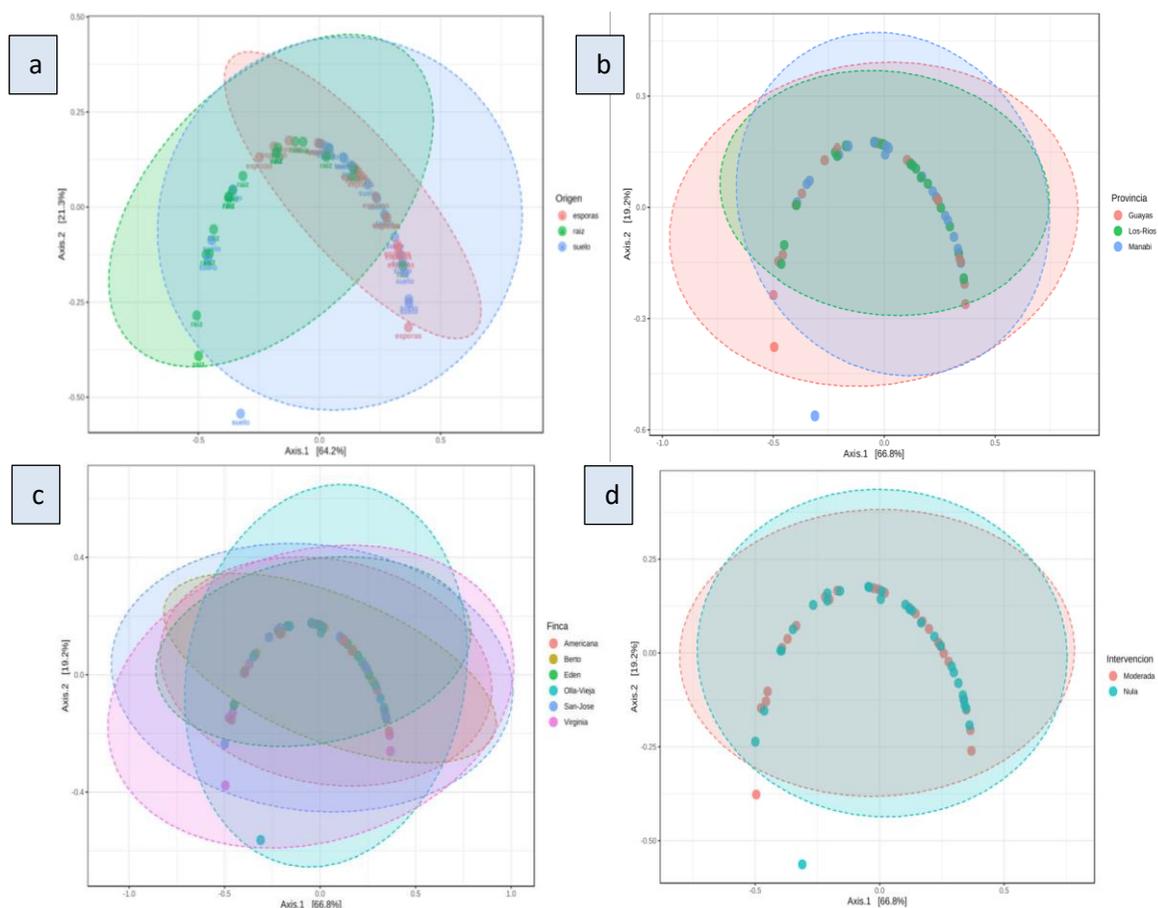
paramétricas (t-test, ANOVA, KW y Mann-Whitney) para evaluar si los índices de diversidad (alfa y beta) eran diferentes entre cada condición (**Fig. 34 y 35**).



**Figura 34.** Alfa diversidad utilizando Shannon a nivel de ASV. Cada diagrama de caja representa la distribución de la diversidad de hongos dentro del factor experimental: a) Origen, b) Provincia, c) Finca, d) Intervención y e) pH.

Al comparar todas las muestras de acuerdo al origen, la alfa diversidad medida por el índice de Shannon mostró diferencias significativamente distintas entre los grupos de esporas,

raíz y suelo (Kruskal Wallis,  $p=0.002$ ) (**Fig. 34a**). No hubo diferencias significativas entre los grupos de provincias, fincas, intervención y pH, respectivamente (**Fig. 34b-e**).



**Figura 35.** Distancia de Bray-Curtis de las comunidades de hongos procedentes de esporas raíces y suelo. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de acuerdo al: a) Origen, b) Provincia, c) Finca y d) Intervención.

La distancia de Bray-Curtis de beta diversidad describe que las comunidades de hongos de acuerdo a su origen fueron significativamente distintos entre los grupos de esporas, raíz y suelo luego del análisis de similitud ( $p=0.001$ ) (**Fig. 35a**). Cada punto de color representa un conjunto de datos que se origina en una réplica distinta de un tratamiento específico. Los puntos de datos que representan el mismo grupo están codificados por colores y enmarcados por círculos.

La distancia de Bray-Curtis de beta diversidad de acuerdo a provincia, finca, intervención y niveles de pH describe que las comunidades de hongos no fueron significativamente distintas entre sus grupos respectivos luego del análisis de similaridad (**Fig. 35b-e**)

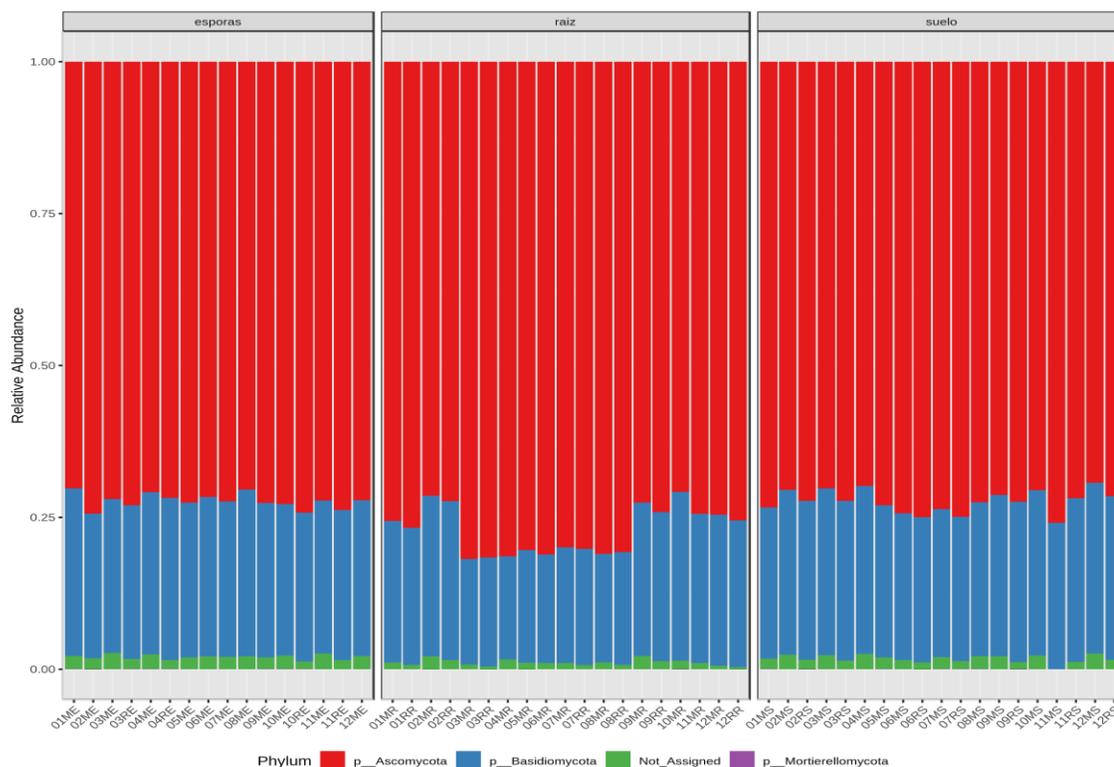
Esto fue realizado para reducir los factores experimentales que no tengan diferencias significativas, dado que, en este caso, el número de muestras no es lo suficientemente alto para realizar una estadística inferencial de todos contra todos. De esta manera el mayor número de muestras será para inferir el origen (espora, raíz y suelo) (**Tabla XI**).

**Tabla XI.** Resumen de los valores p de los factores respecto a sus índices de diversidad

Factor	Diversidad alfa	Diversidad beta
	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Origen	0,002*	0,001*
Provincia	0,764	0,265
Finca	0,892	0,447
Intervención	0,883	0,305

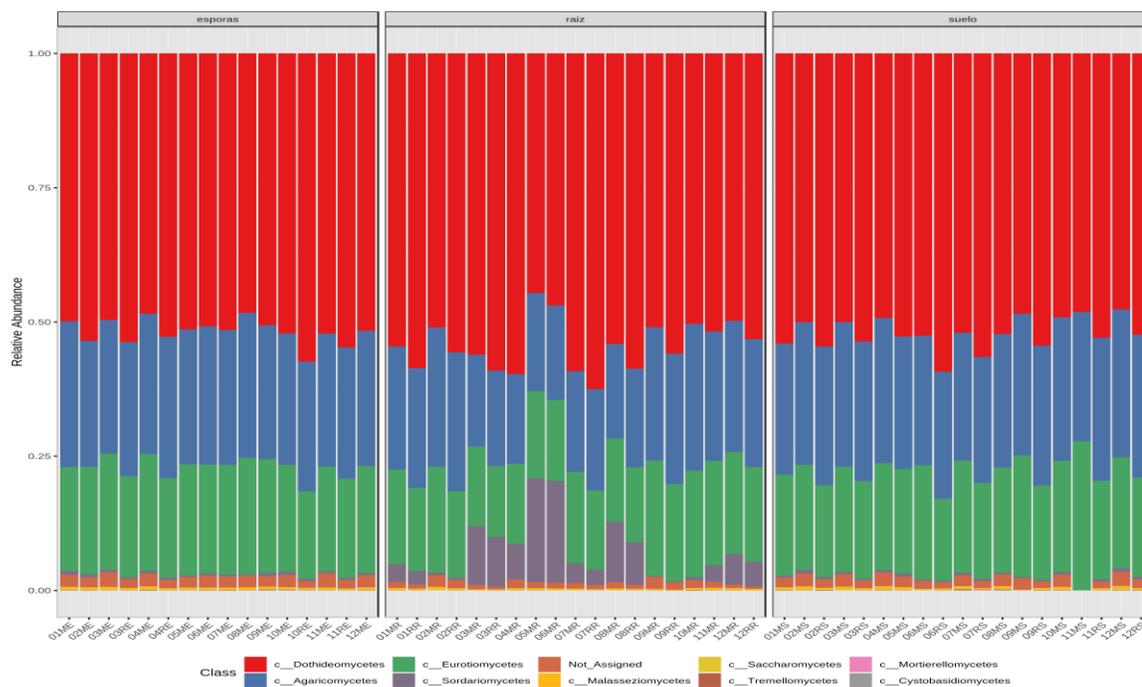
#### 4.5 Asignaciones taxonómicas basadas en secuencias ITS

La amplificación por PCR con las combinaciones de cebadores para la región ITS dio como resultado la detección de 7 filos fúngicos (**Fig. 36**). Los filos más representativos pertenecen a Ascomycota y Basidiomycota. De forma general, el 70% corresponde a los Ascomycotas, cerca del 25% a los Basidiomycotas, el 3% no ha sido identificado y menos del 1% corresponde a los Mortierellomycotas. Los otros filos identificados en porcentajes menores a la unidad son: Chytridiomycota, Glomeromycota, Kickxellomycota y Mucoromycota. Al comparar la presencia porcentual de estos filos se observa que los resultados se asemejan en suelo y esporas, pero difieren a los porcentajes de raíz. Se puede inferir que en las muestras de raíz existe mayor abundancia de *Ascomycotas*. Sobre los filos más predominantes, 598 ASVs corresponden al filo Ascomycota, de los cuales se identificaron 148 géneros. 305 ASVs corresponden al filo Basidiomycota, de los cuales se identificaron 63 géneros. Estos valores indican un fuerte sesgo de los amplicones hacia los filos Ascomycota y Basidiomycota en el conjunto de datos obtenidos



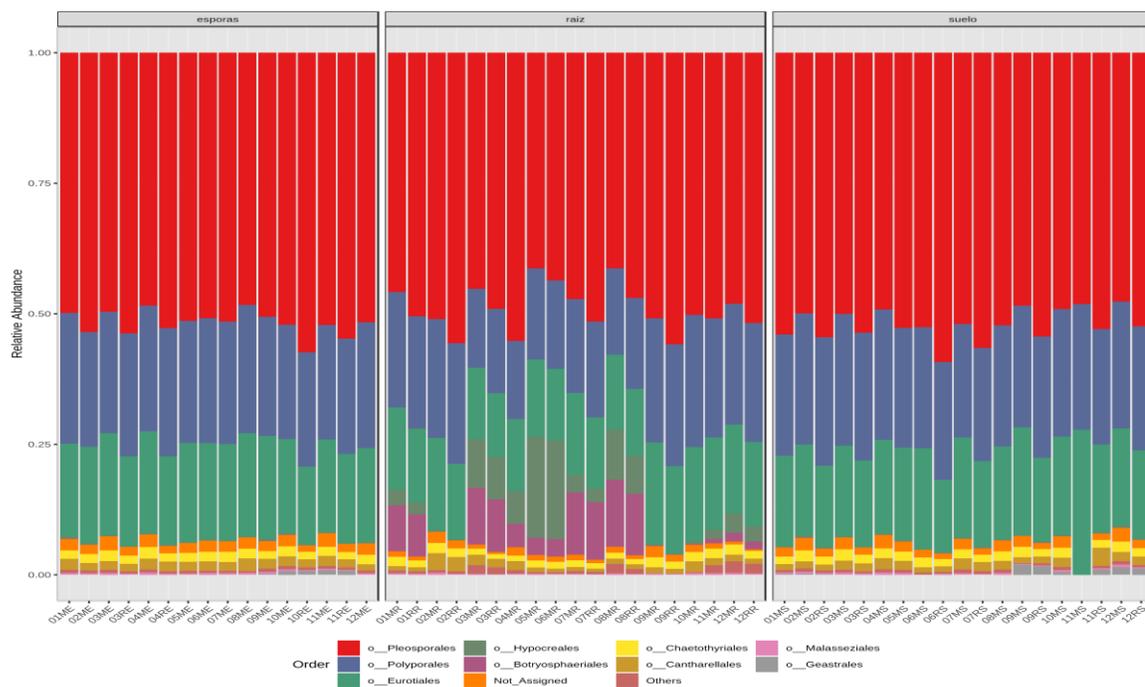
**Figura 36.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes filos por origen de muestra.

En cuanto a las clases, de las 27 identificadas (912 ASVs) hay 3 que predominan en las muestras de suelo y esporas, pero en raíz hay una cuarta clase abundante presente, que en total representan cerca del 95% de la abundancia total de clases encontradas. La clase más abundante es Dothideomycetes, seguido por las clases Agaricomycetes, Eurotiomycetes y Sordariomycetes. El 5% restante lo conforman las clases Malasseziomycetes, Saccharomycetes, Tremellomycetes, Mortierellomycetes, Cystobasidiomycetes, un grupo no identificado, entre otras en porcentajes inferiores a 1% (**Fig. 37**).



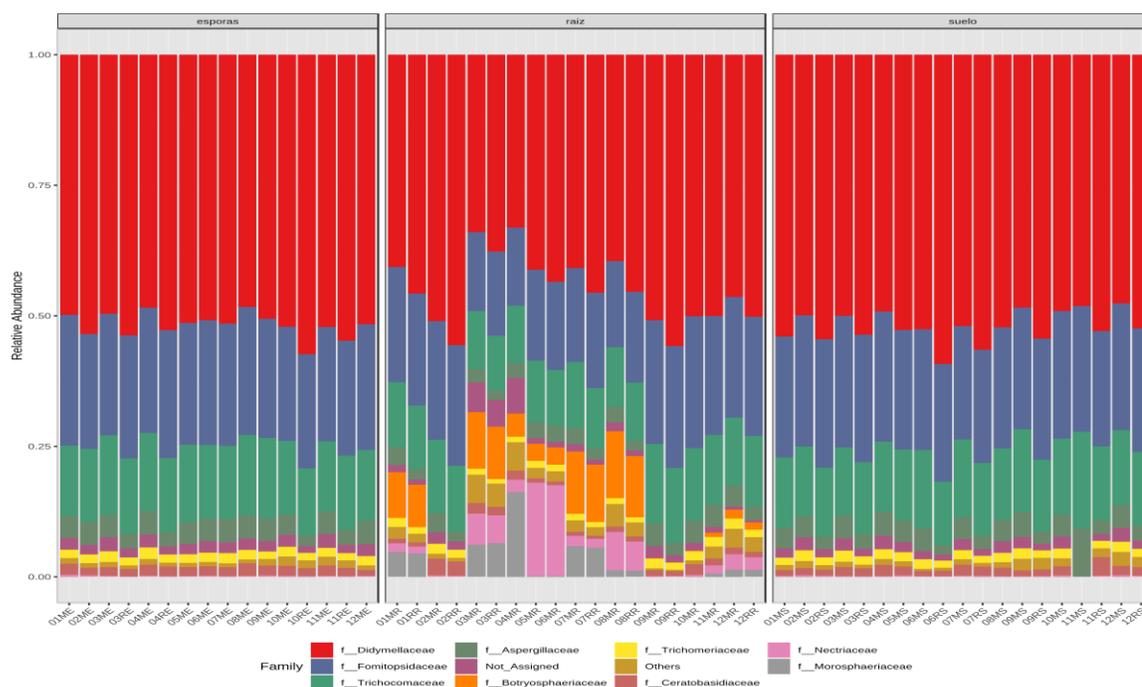
**Figura 37.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de las diferentes clases por origen de muestra.

De los 58 órdenes identificados 9 predominan con un total de 873 ASVs. Cerca del 50% corresponde a los Pleosporales, un 25% corresponde a los Polyporales, otro 20% corresponde a los Eurotiales, y un 5% incluye los órdenes Chaetothyriales, Cantharallales, Malasseziales, entre otros. Los órdenes Hypocreales y Botryosphaeriales están presentes en porcentajes significativos en las muestras de raíz a diferencia de las muestras de suelo y esporas. Del mismo modo el orden Geastrales está presente en porcentajes significativos en las muestras de suelo y esporas (**Fig. 38**).



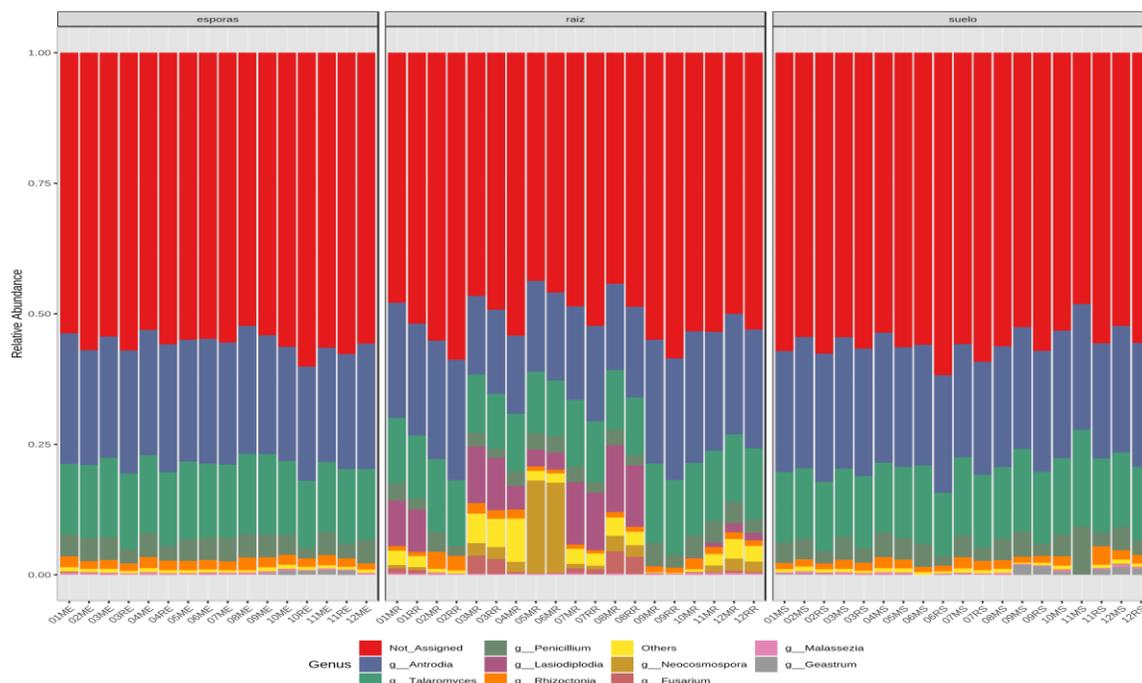
**Figura 38.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes órdenes por origen de muestra.

Hay diferencias más marcadas entre las muestras de suelo y espora en comparación con raíz. En común las 3 familias más abundantes en orden descendente son: Didymellaceae, Fomitopsidaceae y Trichocomaceae. Estas tres familias representan cerca del 90% en suelo y espora, mientras en raíz oscilan entre el 60 y 90%. Subsecuente, otras familias abundantes son Aspergillaceae, Trichomeriaceae y Ceratobasidiaceae. En contraste con las muestras de suelo y espora, en raíz las familias Nectriaceae y Morosphaeriaceae también representa un porcentaje significativo llegando en ciertas muestras a representar cerca del 20% de abundancia (**Fig. 39**).



**Figura 39.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de las diferentes familias por origen de muestra.

En lo que respecta géneros, 219 se encontraron en total en el conjunto de datos de los tres tipos de muestra (652 ASVs). Se puede observar que cerca del 50% de los géneros no fueron detectados por los cebadores empleados. El otro 50% de las muestras de suelo y espора se distribuye un 25% en el género *Antrodia*, un 15% en el género *Talaromyces*, y un 10% en los géneros *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Malassezia*, *Geastrum* y todos los géneros reconocidos restantes. En lo concerniente a raíz, hubo diferencias sustanciales, los géneros detectados también oscilan el 50%, con la diferencia que los géneros *Lasodiplotia*, *Neocosmospora* y *Fusarium* representan en ciertas muestras hasta el 25% de la abundancia relativa (**Fig. 40**).



**Figura 40.** Gráfico de barras de la abundancia relativa de los diferentes géneros por origen de muestra.

Estas gráficas contribuyeron a describir la distribución de la diversidad de los filos Ascomycota y Basidiomycota, quienes destacan en cuanto a la abundancia de todos los hongos presentes en la rizosfera del cacao nacional en el Litoral.

Pese a lo que algunos autores señalaron en sus investigaciones sobre la especificidad de los cebadores empleados, no fue posible encontrar una abundancia predominante de Glomeromycotas en el conjunto de datos total. El número de secuencias pertenecientes a Glomeromycota dentro de los datos oscila cerca del 0,01% de las secuencias analizadas.

En países vecinos como Brasil, una compilación de 74 artículos nacionales dio como resultado una lista de 164 especies de HMA y concluyó que las especies de HMA no son específicas de la planta huésped, sino que son seleccionadas por las condiciones ambientales donde crece el huésped. Sin embargo, pocas especies como: *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora foveata*, *Acaulospora mellea*, *Clareoideglomus etunicatum* y *Glomus macrocarpum* son ubicuas y se adaptan a diferentes manejos. Por lo tanto, estas especies podrían ser utilizadas como inóculos de HMA en los distintos tipos de manejo agronómico (Winagraski et al., 2019).

Por otro lado, en países como Colombia, se han realizado aislamientos de hongos de la rizosfera del cacao y algunas cepas se han caracterizado por tener funcionalidad amilolítica, proteolítica y actividad solubilizadora de fosfatos (Leiva, Osorio & Ramírez, 2013).

En países como México y Venezuela, el agroecosistema cacao es considerado un área de investigación con potencial biotecnológico debido a la presencia de hongos del orden Hypocreales que actúan como agentes de control biológico de enfermedades vegetales. Mismo orden que representa cerca del 20% de la rizosfera del cacao estudiado (Sosa et al., 2011; Torres-De La Cruz et al., 2015).

Otros estudios de ascomicetos ubicuos sugieren que varios hongos de la familia Didymellaceae son endófitos o saprófitos, con el potencial de coexistir con diferentes patógenos y yacen en distintos cultivos, como la vid (Del Frari et al., 2019).

Se realizó un análisis de gremios utilizando la base de datos UNITE. Se encontraron 18 ASVs en total correspondientes a hongos micorrícicos arbusculares de los 3 tipos de muestras provenientes de las fincas, todos los ASVs miembros del phylum Glomeromycota. Se puede observar en la siguiente **tabla** que existe mayor abundancia de micorrizas arbusculares en las fincas sin intervención (**amarillo**) en comparación a las semi intervenidas (**verde**).

**Tabla XII.** Abundancias totales para los HMA. (E= Espora, R = Raíz, S = Suelo).

Berto Zambrano●			Olla Vieja●			Edén●			La Americana●			Virginia●			San José●			Taxonomía
S	E	R	S	E	R	S	E	R	S	E	R	S	E	R	S	E	R	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	p__Glomeromycota
6	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0	5	5	3	0	c__Glomeromycetes
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	o__Diversisporales
0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	o__Glomerales
5	0	2	7	17	5	1	0	0	0	3	0	0	0	21	4	8	81	f__Glomeraceae
11	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	g__Archaeospora
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	g__Diversispora
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	g__Dominikia
0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	14	0	0	0	g__Glomus sp.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	g__Septoglomus
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	s__Dominikia_bernensis
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	0	0	0	s__Dominikia_disticha
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	s__Glomus_aggregatum
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	s__Kamienkia_perpusilla

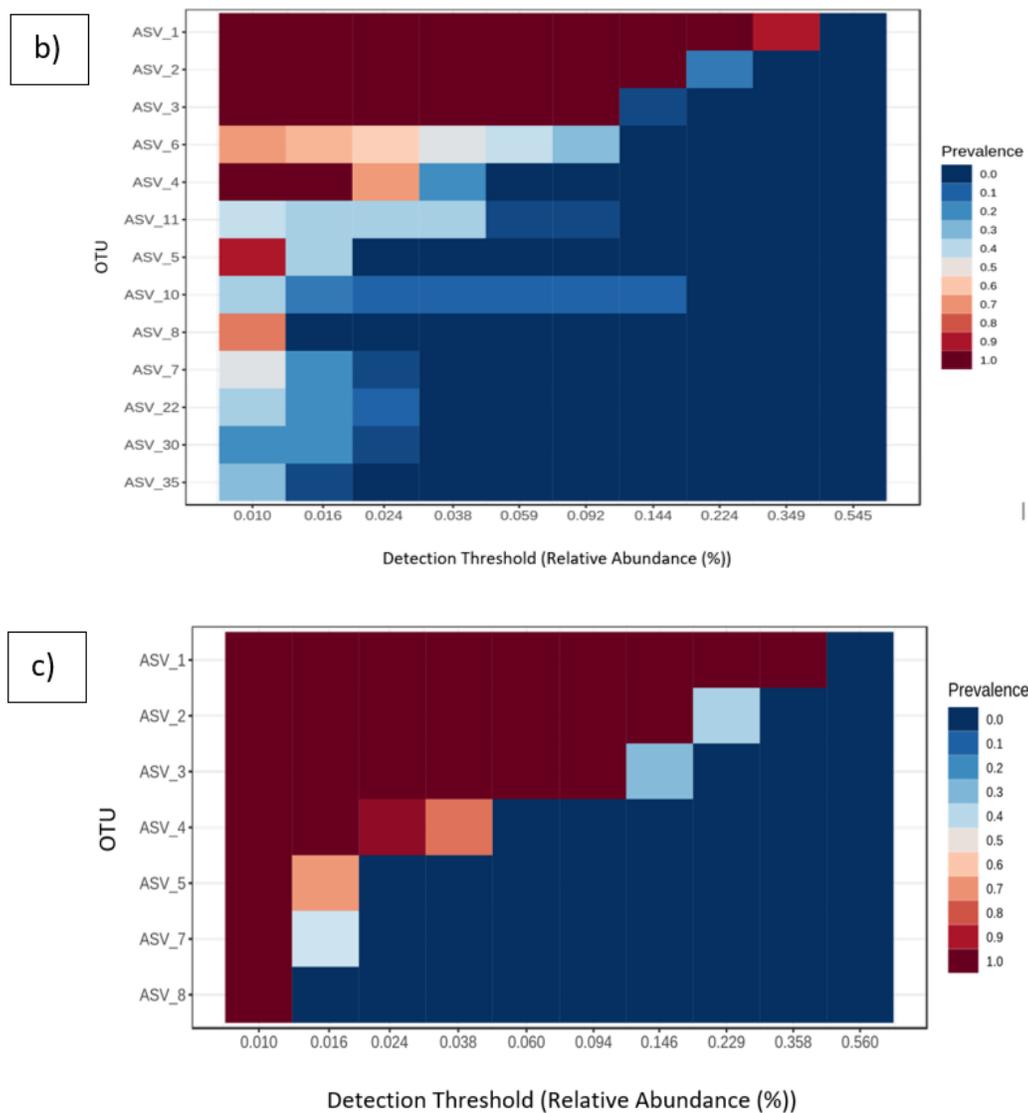
0	0	0	C	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	3	0	3	<i>s__Pacispora_scintillans</i>
0	0	0	C	0	0	0	0	0	0	0	46	0	0	0	0	2	28	<i>s__Rhizophagus_custos</i>
0	0	0	C	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>s__Rhizophagus_diaphanus</i>
0	0	0	C	0	0	0	0	0	0	0	82	0	0	0	0	1	20	<i>s__Rhizophagus_fasciculatus</i>
23	3	3	8	18	7	2	0	29	4	8	136	4	2	48	13	14	140	<b>Total</b>

De las muestras correspondientes a HMA, se logró identificar el filo Glomeromycota, la clase Glomeromycetes, la familia Glomeraceae y los géneros *Archaeospora*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Glomus* y *Septoglomus*, siendo *Glomus* el más abundante seguido de *Archaeospora*. A nivel de especie se identificaron 8 HMA, siendo *Rhizophagus fasciculatus* la más abundante, seguida de *Rhizophagus custos* y *Pacispora scintillans*. Se observa un fuerte sesgo de los amplicones hacia los géneros *Rhizophagus* y *Glomus* en el conjunto de datos obtenidos (**Tabla XIII**).

**Tabla XIII.** Abundancia total de los HMA identificados con la base de datos UNITE.

Sistema		Clasificación	
Semi intervenido	Sin intervención	Taxonomía	
0	3	Filo	Glomeromycota
11	15	Clase	Glomeromycetes
0	1	Orden	Diversisporales
2	0	Orden	Glomerales
29	125	Familia	Glomeraceae
15	0	Género	<i>Archaeospora</i>
2	0	Género	<i>Diversispora</i>
3	0	Género	<i>Dominikia</i>
41	0	Género	<i>Glomus</i> sp.
0	3	Género	<i>Septoglomus</i>
1	0	Especie	<i>Dominikia bernensis</i>
8	0	Especie	<i>Dominikia disticha</i>
2	2	Especie	<i>Glomus aggregatum</i>
0	8	Especie	<i>Kamienskia perpusilla</i>
0	10	Especie	<i>Pacispora scintillans</i>
0	76	Especie	<i>Rhizophagus custos</i>
0	2	Especie	<i>Rhizophagus diaphanus</i>
0	103	Especie	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>
114	348	<b>Total</b>	





**Figura 41.** Mapa de calor que representa los hongos más abundantes que se encuentran en a) suelo b) raíz y c) esporas de la rizosfera del cacao. El color de cada rectángulo del mapa de calor indica la abundancia de la unidad taxonómica operativa (OTU) de hongos correspondiente, como se muestra en la leyenda.

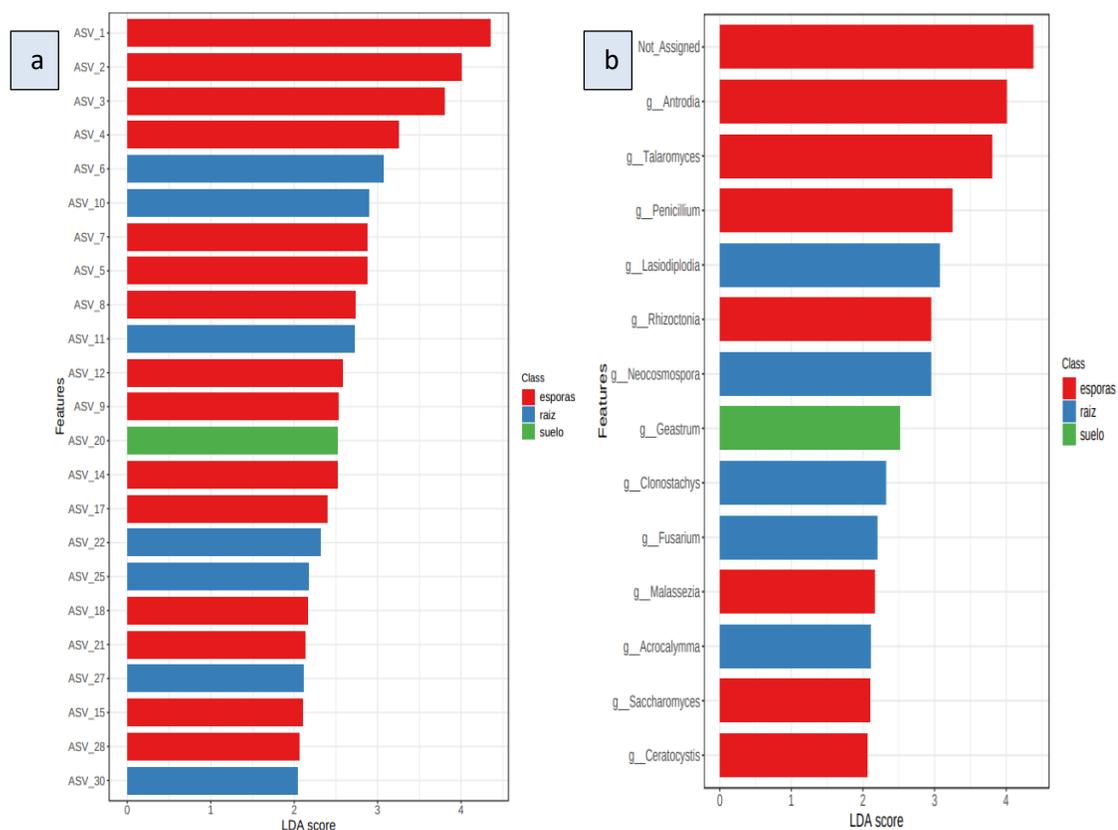
Las comunidades de hongos en la rizosfera de cacao en la zona estudiada se caracterizaron por el dominio de unos pocos hongos, sobre muchos ASV subordinados. La mayoría de las ASVs se observaron en todos los grupos de muestras, pero su abundancia varió entre ellos. ASV1, ASV2 y ASV3 destacaron como los hongos predominantes en los 3 tipos de

muestras de la rizosfera. ASV4, ASV5, ASV7 y ASV8 también predominan en menor abundancia en los 3 tipos de muestras. ASV20 se asoció preferentemente con la muestra de suelo. ASV 6, ASV11, ASV10, ASV22, ASV30 y ASV35 se asociaron a la muestra de raíz (**Fig. 41b**). Ningún ASV conservó el mismo patrón de distribución en los 3 tipos de muestras. Sin embargo, existe una semejanza en el caso de ASV1 y ASV2 en las muestras de suelo y esporas (**Fig. 41a y 41c**), resultando así en una similitud de la estructura de hongos entre las muestras de suelo y esporas, y una disimilitud con la muestra de raíz, lo que indica que los tipos de muestra de la rizosfera tienen una composición distinta de la comunidad de hongos.

Como último paso, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) de los géneros y ASVs más abundantes en cada condición para el factor más significativo que es el origen (espora, suelo y raíz;  $p=0,01$ ) para estimar el tamaño del efecto de cada característica diferencialmente abundante (LefSe).

El gráfico de barras de las puntuaciones de LDA identifica que ASVs y géneros entre todos los detectados como estadística y biológicamente diferenciales explican las mayores diferencias entre comunidades a través del tamaño del efecto de las diferencias observadas entre las comunidades fúngicas (**Fig. 42**).

LEfSe detectó 23 ASVs que mostraban diferencias estadísticamente significativas y biológicamente consistentes en los tipos de muestra extraída con puntajes LDA de al menos 2. El ASV1 perteneciente a la familia Didymellaceae (**Tabla XIV**) fue detectado por LEfSe con una puntuación superior a cuatro órdenes de magnitud LDA, lo que refleja una marcada abundancia en muestra de esporas. De los 23 ASVs con una puntuación LDA alta, 15 corresponden a esporas, 7 a raíz y 1 a suelo (**Fig. 42a**).



**Figura 42.** Gráfico de barras de las puntuaciones de LDA calculadas para los a) ASVs y b) géneros con características diferencialmente abundantes entre el tipo de muestra.

Además, LEfSe detectó 14 géneros fúngicos que mostraban diferencias estadísticamente significativas y biológicamente consistentes en los tipos de muestra extraída con puntajes LDA de al menos 2. El género con una puntuación LDA muy alta (más de cuatro órdenes de magnitud) perteneciente a la familia Didymellaceae (**Tabla XIV**) refleja una marcada abundancia en muestra de esporas. De los 14 géneros con una puntuación LDA alta, 8 corresponden a esporas, 5 a raíz y 1 a suelo (**Fig. 42b**).

El puntaje LDA de LEfSe reordena de manera más informativa estos taxones en relación con los valores P encontrados por origen de muestra. Todo esto nos permite conocer cuáles son los hongos significativamente más abundantes ( $p < 0.05$ ).

En la tabla a continuación se incluye la información taxonómica de los ASVs más predominantes que arrojaron las gráficas de mapas de calor por tipo de muestra (**Fig. 41**) y

las gráficas LDA (**Fig. 42**). Esta información es complementaria a las gráficas de abundancia relativa y específica sobre los ASVs predominantes, entre los cuales sobresalen Ascomycotas con las familias Didymellaceae y Trichocomaceae y por el lado Basidiomycota, la familia Fomitopsidaceae.

En la **tabla XIV** se observa que pese a que se empleara la base de datos UNITE (<http://unite.ut.ee>), que contiene información seleccionada y validada, aún faltan datos para muchos de los hongos estudiados, seguramente incluidos las micorrizas arbusculares, las cuales son de interés en esta investigación.

**Tabla XIV.** Identificación taxonómica de los ASVs predominantes correspondiente a los mapas de calor y puntuación LDA.

<b>Taxo</b>	<b>Kingdom</b>	<b>Phylum</b>	<b>Class</b>	<b>Order</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>	<b>Species</b>
ASV_1	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	NA	NA
ASV_2	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae	<i>Antrodia</i>	<i>neotropica</i>
ASV_3	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Talaromyces</i>	NA
ASV_4	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>corylophilum</i>
ASV_5	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	Trichomeriaceae	NA	NA
ASV_6	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Lasiodiplodia</i>	NA
ASV_7	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Rhizoctonia</i>	<i>floccosa</i>
ASV_8	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	NA	NA
ASV_9	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae	<i>Antrodia</i>	<i>neotropica</i>
ASV_10	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Neocosmospora</i>	<i>falciformis</i>
ASV_11	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Morosphaeriaceae	NA	NA
ASV_12	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV_14	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV_15	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	<i>paradoxus</i>
ASV_17	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV_18	Fungi	Basidiomycota	Malasseziomycetes	Malasseziales	Malasseziaceae	<i>Malassezia</i>	<i>restricta</i>
ASV_20	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Geastrales	Geastraceae	<i>Geastrum</i>	NA
ASV_21	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	<i>Rhizoctonia</i>	<i>floccosa</i>
ASV_22	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Bionectriaceae	<i>Clonostachys</i>	NA
ASV_25	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
ASV_27	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Morosphaeriaceae	<i>Acrocallymma</i>	<i>fici</i>
ASV_28	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales	Ceratocystidaceae	<i>Ceratocystis</i>	<i>euricoi</i>
ASV_30	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>waltergamsii</i>

Si bien la información que brindan los métodos tradicionales es útil, la identificación de especies basado en su ADN es potencialmente complementaria y hasta sustitutiva, ya que muchos hongos no pueden identificarse en su fase vegetativa. Pero todavía se carece de un método de barcoding de ADN aceptado específicamente para hongos, sumado a los problemas de calidad para los códigos de barras de hongos, ya que los datos de secuencia a menudo se derivan de material identificado incorrectamente, más la falta de comprobantes y las anotaciones de terceros en la base de datos de secuencias, y la probable existencia de una gran cantidad de especies no descritas y caracterizadas.

Además, las longitudes desiguales de estos ITS inducen errores y sesgos, como la amplificación y la secuenciación preferenciales, lo que a menudo conduce a una estimación incorrecta de la abundancia.

Pese a ello, la región nuclear ITS del ADNr se usa comúnmente para hongos desde hace mucho tiempo, sin embargo, estudios sugieren que hay especies de hongos estrechamente relacionados, entre ellas las micorrizas arbusculares, que se encuentran en mayores proporciones o son más identificables en otros fragmentos de la región del ADNr (Krüger et al., 2009; Stockinger, Krüger & Schüßler, 2010). Por ello, puede resultar conveniente analizar un fragmento más largo, que cubra una parte de la SSU, la región ITS y parte de la LSU.

En su investigación, (Stockinger, Krüger & Schüßler, 2010) concluyó que en estudios donde se investigan otros grupos de hongos junto con la diversidad de HMA, el fragmento ITS2 es una buena alternativa y se puede amplificar con cebadores establecidos.

Hasta el presente, se siguen diseñando nuevos cebadores ITS prometedores capaces de amplificar y distinguir la comunidad fúngica del suelo completa hasta niveles de especie con cada vez menos sesgo. Se recomienda como un punto de referencia más sólido a nivel de especificidad, la implementación de fragmentos que abarquen el ARNr fúngico de longitud completa en bases de datos seleccionadas por expertos. La selección oportuna de primers pondrá a disposición la diversidad y la cuantificación de hongos en la rizosfera, inclusive de hongos promisorios como los HMA.

## CAPÍTULO 5

### Conclusiones y recomendaciones

De forma general, los HMA están presentes en todas las plantaciones de cacao estudiadas. La estructura de la comunidad de estos hongos obtuvo una variación significativa entre sus sistemas de manejo agronómicos pese que este cultivo no maneja productos agroquímicos en exceso en los sistemas semi intervenidos.

El porcentaje de colonización de la raíz varió entre 34,7 y 66,5%, para las fincas sin intervención y entre el 13,3 y 46,2%, para fincas semi intervenidas encontrando una correlación negativa entre el porcentaje de colonización y la disponibilidad de fósforo, lo cual fue común en las plantaciones fertilizadas.

La densidad de esporas varió entre 387 y 472 esporas por 100 gramos de suelo sin intervención y entre 153 y 444 esporas por 100 gramos de suelo semi intervenido y fue mayor en las plantaciones viejas que las más jóvenes.

La diferencia promedio del 20% en el porcentaje de colonización y la densidad promedio superior a 100 esporas por 100 gramos de suelo entre los dos sistemas de las tres provincias aportan a la disminución de las brechas de información en el sector agrícola cacaotero del litoral ecuatoriano, siendo parte de un bioindicador de la salud del suelo y el nivel de intervención antropogénica.

Otros factores que influyen en la colonización micorrícica y la densidad de esporas son: la composición fisicoquímica del suelo, en específico su contenido de: materia orgánica, fósforo, nitrógeno, calcio, hierro, cobre y manganeso.

Las características morfológicas de las esporas encontradas en los dos sistemas asociados al cacao no distan mucho en cuanto a los géneros presentes encontrados. 12 géneros de HMA fueron observados en los sitios evaluados. El género *Glomus* fue el más abundante en todas las zonas de estudio. Otros géneros como *Archaeospora* y *Scutellospora* están presentes en menor abundancia y distribución en la zona estudiadas. El género *Racocetra* solo fue encontrado en la provincia del Guayas.

Se identificaron un total de 1019 secuencias de ADN individuales o variantes de secuencia de amplicón (ASVs), de las cuales 18 ASVs correspondieron a HMA. Estos hongos micorrízicos arbusculares coexisten en simbiosis con una diversidad grande de hongos del filo Ascomicetos y Basidiomicetos, caracterizando al cacao como una planta micótrofa. Además, se reportan siete taxones nuevos para Ecuador y para los sistemas agroforestales

de plantaciones de cacao, los cuales son: *P. scintillans*, *R. diaphanus*, *R. fasciculatus*, *R. custos*, *D. disticha*, *M. perpusilla* y *D. bernensis*.

No se detectó ningún efecto del tipo de intervención del suelo sobre la comunidad de los hongos de la rizósfera del cacao mediante un análisis de similaridad. Sin embargo, se observó que las comunidades de HMA fueron más diversas y abundantes en las fincas sin intervención. Concluimos que el sistema semi intervenido tiene un efecto negativo sobre la biodiversidad y abundancia de la comunidad de hongos en el litoral ecuatoriano.

Este estudio contribuye con información actualizada sobre la composición y el comportamiento de la micobiota en la rizósfera de cacao ecuatoriano y la región, a fin de facilitar y complementar los esfuerzos por encontrar las prácticas más convenientes para este tipo de cultivos con la mira a agrosistemas sustentables y disminuir las brechas de información del sector. Esta información también sirve como nexo e historial para nuevos estudios con enfoque en la biogeografía de los hongos identificados a fin de sacarle provecho al manejo de la simbiosis de los mismos en la producción de cacao.

Para mejorar y profundizar este tipo de estudio se recomienda considerar fragmentos de ADNr más largos que cubran otras regiones además de las seleccionadas en esta investigación. Además, para confirmar los hallazgos de esta investigación se recomienda realizar más estudios semejantes en la región Costa ecuatoriana, con plantaciones de cacao que manejen ambos sistemas o que abarque otros para ampliar la información. Por otro lado, reportado el efecto negativo de la intervención de agroquímicos, se recomienda promover el uso de abonos a base de microorganismos benéficos como las micorrizas arbusculares para el manejo y cuidado de cultivos de *T. cacao* en reemplazo gradual de los fertilizantes sintéticos, con el fin de preservar la diversidad de estas especies en la rizosfera y mantener su abundancia.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aguilera Gómez L. 2007. Micorrizas arbusculares. *CIENCIA ergo-sum* 14:300–306.
- [2] Alberto J, Zapata R, Marrufo D, Patricia Z, Chávez G, Carrillo L. 1991. Hongos micorrízico-arbusculares.
- [3] Alvarado A, Chavarría M, Guerrero R, Boniche J, Navarro JR. 2004. Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* l.f.) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28:89–100.
- [4] Amésquita E, Barrera L, Burbano H, Clavijo J, Espinosa JA, García A, Guerrero R, León A, Lora R, Malavolta E, Muñoz R, Villar H, Zapata R. 2001. Fertilidad de Suelos. Diagnóstico y Control. *Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelos*:507.
- [5] Apolo B. 2020. Impact of Agricultural Exports on Agricultural Economic Growth in Ecuador: Case of Banana and Cocoa. *Journal of Economics and Sustainable Development* 11:27–33. DOI: 10.7176/jesd/11-12-04.
- [6] Balladares Grazzo C. 2015. Caracterización físico – química de los lixiviados del cacao y café del litoral ecuatoriano, como potenciales fuentes de producción de bioetanol.
- [7] Baltruschat, H.; Santos, V.M.; da Silva, D.K.A.; Schellenberg, I.; Deubel, A.; Sieverding, E.; Oehl, F. Unexpectedly high diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in fertile Chernozem croplands in Central Europe. *Catena* 2019, 182, 104135, doi:10.1016/j.catena.2019.104135.
- [8] Banco Nacional de ADN Carlos III-Universidad de Salamanca. 2016. Programa de control de calidad para muestras de ADN. *Banco ADN*:1–10.
- [9] Barro Nieves O. 1981. Morfología y clasificación botánica del cacao. *Manual de asistencia técnica*:25–42.
- [10] Bolaños-B MM, Rivillas-Osorio CA, Suárez-Vásquez S. 2000. Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé* 51:245–262.
- [11] Burgos G, Alcívar U, Suárez A, Zambrano A. 2020. Evaluación técnica del enriquecimiento de harina de trigo con cascarilla de cacao (*Theobroma cacao*). 7:20–36.
- [12] Buyer JS, Baligar VC, He Z, Arévalo-Gardini E. 2017. Soil microbial communities under cacao agroforestry and cover crop systems in Peru. *Applied Soil Ecology*

120:273–280. DOI: 10.1016/j.apsoil.2017.09.009.

- [13] Carrenho R, Trufem SFB, Bononi VLR, Silva ES. 2007. The effect of different soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of peanuts, sorghum and maize. *Acta Botanica Brasilica* 21:723–730. DOI: 10.1590/S0102-33062007000300018.
- [14] Coleman DC, Reid CPP. 1983. Association of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Hyphae with Soil Organic Particles. DOI: 10.2307/1937216.
- [15] Colombo RP, Bidondo LF, Silvani VA, Carbonetto MB, Rascovan N, Bompadre MJ, Pergola M, Cuenca G, Godeas AM. 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in soil from the Pampa Ondulada, Argentina, assessed by pyrosequencing and morphological techniques. :1–31. DOI: 10.3109/02699052.2011.624568.
- [16] Cué JL, Torres García A. 2010. Valoración agroecológica de las micorrizas vesículo arbusculares. *Science* 327:167–170. DOI: 10.1126/science.1179555.
- [17] Declerck S, D’or D, Bivort C, De Souza FA. 2004. Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: Spore production and function of auxiliary cells. *Mycological Research* 108:84–92. DOI: 10.1017/S0953756203008761.
- [18] Douds DD, Schenck NC. 1990. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist* 116:621–627. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00547.x.
- [19] Droh G, Kouassi A-B, Kouadjo ZCG, Zeze A, Nguetta AS, Sanders IR. 2016. Effect of two AMF on growth of cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) in greenhouses. *Global journal of advanced research* 3:157–164.
- [20] Espinel R-L. 2016. Cacao: situación mundial.
- [21] Esposito F, Jacquemyn H, Waud M, Tyteca D. 2016. Mycorrhizal fungal diversity and community composition in two closely related *Platanthera* (orchidaceae) species. *PLoS ONE* 11:1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0164108.
- [22] Faggioli VS, Symanczik S. 2018. El suelo como reactor de los procesos de regulación funcional de los agroecosistemas. In: 87–106.
- [23] Fernández R. 2008. LAS MICORRIZAS: Desenterrando un Tesoro. *Agricultura orgánica* 1. DOI: 10.36331/revista.v1i1.73.
- [24] Fernández Bidondo L, Colombo RP, Recchi M, Silvani VA, Pérgola M, Martínez A, Godeas AM. 2018. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pecan

(*Carya illinoensis*) trees by molecular and morphological approaches. *MycKeys* 42:73–88. DOI: 10.3897/mycokeys.42.26118.

- [25] Del Frari G, Cabral A, Nascimento T, Ferreira RB, Oliveira H. 2019. *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS ONE* 14:1–22. DOI: 10.1371/journal.pone.0213273.
- [26] Garzón LP. 2015. Importancia de las micorrizas arbusculares para un uso sostenible del suelo en la Amazonía colombiana. *Luna Azul*:217–234. DOI: 10.17151/luaz.2016.42.14.
- [27] Gosling P, Ozaki A, Jones J, Turner M, Rayns F, Bending GD. 2010. Agriculture, Ecosystems and Environment Organic management of tilled agricultural soils results in a rapid increase in colonization potential and spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi. “*Agriculture, Ecosystems and Environment*” 139:273–279. DOI: 10.1016/j.agee.2010.08.013.
- [28] Hartemink AE. 2005. Nutrient Stocks, Nutrient Cycling, and Soil Changes in Cocoa Ecosystems: A Review. *Advances in Agronomy* 86:227–253. DOI: 10.1016/S0065-2113(05)86005-5.
- [29] Hepper C, Warner A. 1981. Role of organic matter in growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 81:155–156. DOI: 10.1016/S0007-1536(83)80219-8.
- [30] Hetrick BAD, Bloom J. 1986. The Influence of Host Plant on Production and Colonization Ability of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Spores. *Mycologia* 78:32–36. DOI: 10.1080/00275514.1986.12025200.
- [31] Honrubia M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años Anales del Jardín Botánico de Madrid. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66:133–144.
- [32] Joner EJ, Jakobsen I. 1995. Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1153–1159. DOI: 10.1016/0038-0717(95)00047-I.
- [33] Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: One PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183:212–223. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x.
- [34] Leiva E, Osorio M, Ramírez R. 2013. Microorganismos asociados a la rizosfera del cacao (*Theobroma cacao* L.) en condiciones de bosque húmedo premontano. *Suelos Ecuatoriales* 43:35–45.

- [35] López M, López de Rojas I, España M, Izquierdo A, Herrera L. 2007. Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrientes en el suelo, nivel nutricional de la planta y hongos micorrízicos arbusculares en plantaciones de *Theobroma cacao*. *Agronomía Tropical* 57:31–43.
- [36] Lourdes F, Intriago M, Danilo M, Zenteno C, Ambrosio J, Neto F, Peña MM, Roberto W, Caicedo B, Noemí M, Moyano A. 2018. Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador. 11:63–69.
- [37] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G. 2001. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2354–2359. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001.
- [38] Martin F, Cullen D, Hibbett D, Pisabarro A, Spatafora JW, Baker SE, Grigoriev I V. 2011. Sequencing the fungal tree of life. *New Phytologist* 190:818–821. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03688.x.
- [39] Medina García LR. 2016. La agricultura, la salinidad y los hongos micorrízicos arbusculares: Una necesidad, un problema y una alternativa. *Cultivos Tropicales* 37:42–49. DOI: 10.13140/RG.2.1.1117.9765.
- [40] Meena RS, Kumar S, Datta R, Lal R, Vijayakumar V, Brtnicky M, Sharma MP, Yadav GS, Jhariya MK, Jangir CK, Pathan SI, Dokulilova T, Pecina V, Marfo TD. 2020. Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. *Land* 9. DOI: 10.3390/land9020034.
- [41] Moina-Quimi E, Oviedo-Anchundia R, Nieto-Barcelona S, Herrera-Samaniego P, Barcos-Arias M. 2018. Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from humid tropical areas of Ecuador. *Revista Bionatura* 3:531–536. DOI: 10.21931/RB/2018.03.01.9.
- [42] Morales R, Durango W. 2008. Resultados en la obtención de inóculos nativos de hongos micorrízicos en cultivos de Cacao (*Theobroma cacao*) y Soya (*Glycine max*). *XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*:1–9.
- [43] Nakano A, Takahashi K, Kimura M. 2001. Effect of host shoot clipping on carbon and nitrogen sources for arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 10:287–293. DOI: 10.1007/s005720000091.
- [44] Noda Y. 2004. Las Micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. :55.

- [45] Ochoa J. 2019. Sector Exportador De Cacao. *Www.Anecacao.Com*:8.
- [46] Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, Heijden M Van Der, Sieverding E. 2010. Soil Biology & Biochemistry Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. 42. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.01.006.
- [47] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. *Agricultura de conservación. Estudio de casos en América Latina y África*.
- [48] Peña-Venegas CP, Cardona GI, Arguelles JH, Arcos AL. 2007. Micorrizas arbusculares del sur de la Amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del suelo. *Acta Amazonica* 37:327–336. DOI: 10.1590/S0044-59672007000300003.
- [49] Peña C, Cardona G, Mazorra A, Arguellez J, Arcos A. 2006. Micorrizas arbusculares de la Amazonia colombiana Catálogo ilustrado. *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI*:90.
- [50] Pérez-C. A, De La Ossa V. J. 2013. Variables física y químicas del suelo y su relación con la colonización de micorrizas arbusculares en raíces del pasto angletón (*Dichanthium aristatum* Benth) TT - Physical and chemical soil variables and the relation with the colonization of arbuscular. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 16:71–78.
- [51] Prieto O, Belezaca C, Mora W, Garcés F, Sabando F, Cedeño P. 2012. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. *Agromía mesoamericana* 23:233–239.
- [52] Qin J, Zhang W, Zhang SB, Wang JH. 2020. Similar mycorrhizal fungal communities associated with epiphytic and lithophytic orchids of *Coelogyne corymbosa*. *Plant Diversity* 42:362–369. DOI: 10.1016/j.pld.2020.07.005.
- [53] Quality Control Platform of Saint-Louis. 2009. *DNA / RNA Extraction & Qualification DNA / RNA Extraction & Qualification*.
- [54] Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80:756–770. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.
- [55] Raya Montañón YA, Apérez Barrios P, Aguirre Paleo S, Vargas Sandoval M, Paz Da Silva R, Lara-Chávez MBN. 2019. Identificación de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate de Uruapan, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*:267–276. DOI: 10.29312/remexca.v0i23.2026.

- [56] Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171:41–53. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x.
- [57] Robles S, Valeria S. 2020. Composición de las comunidades de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz del árbol manzanilla de la muerte (*Hippomane mancinella*). :1–87.
- [58] Rodriguez J. 2001. Efecto del biofertilizante Mycoral (micorriza arbuscular) en el desarrollo del café (*Coffea arabica* L.) en vivero en Zamorano, Honduras.
- [59] Saravia-Matus SL, Rodríguez AG, Saravia JA. 2020. Determinants of certified organic cocoa production: evidence from the province of Guayas, Ecuador. *Organic Agriculture* 10:23–34. DOI: 10.1007/s13165-019-00248-4.
- [60] Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, Van Overbeek L, Brar D, Van Elsas JD, Reinhold-Hurek B. 2012. Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:28–36. DOI: 10.1094/MPMI-08-11-0204.
- [61] Singh RP, Kothari V, Koringa PG, Singh SP. 2017. Understanding host-microbiome interactions - an omics approach: Omics of host-microbiome association. *Understanding Host-Microbiome Interactions - An Omics Approach: Omics of Host-Microbiome Association*:1–368. DOI: 10.1007/978-981-10-5050-3.
- [62] Siqueira JO, Colozzi-filho A, Oliveira EDE. 1989. Ocorrência de Micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 24:1499–1506.
- [63] Smith S. 1988. Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:221–244. DOI: 10.1146/annurev.arplant.39.1.221.
- [64] Sosa D, Pérez S, Molina S, Rumbos R. 2011. Diversidad de especies de Trichoderma en agroecosistemas de cacao en Venezuela. *ResearchGate*:1–19.
- [65] Sousa-hitzler J De, Geary P. 2008. *Assesing Quality of Nucleic Acids*.
- [66] Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:461–474. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x.

- [67] Susana M, Patiño C, Motte E, Cedeño V, Fernando O, Falquez C. 2008. Estudio de la Diversidad Genética de 20 Accesiones de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Mediante AP-PCR de la Colección del Centro del Cacao de Aroma Tenguel en la Finca Experimental La Buseta. 01:1–5.
- [68] Symanczik S, Gisler M, Thonar C, Schlaeppi K. 2017. Application of Mycorrhiza and Soil from a Permaculture System Improved Phosphorus Acquisition in Naranjilla. 8:1–12. DOI: 10.3389/fpls.2017.01263.
- [69] Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, Bochicchio J, Krohn A, Caporaso JG, Pennanen T. 2016. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 82:7217–7226. DOI: 10.1128/AEM.02576-16.
- [70] Toju H, Tanabe AS, Sato H. 2018. Network hubs in root-associated fungal metacommunities. *Microbiome* 6:1–16. DOI: 10.1186/s40168-018-0497-1.
- [71] Torres-De La Cruz M, Ortiz-García CF, Bautista-Muñoz C, Ramírez-Pool JA, Ávalos-Contreras N, Cappello-García S, De La Cruz-Pérez A. 2015. Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 86:947–961. DOI: 10.1016/j.rmb.2015.07.012.
- [72] Torres CA, Etchevers J, Fuentes MH, Govaerts B, Herrera JM, De León-González F. 2013. Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana* 31:71–84.
- [73] Tuesta-Pinedo ÁL, Trigozo-Bartra E, Cayotopa-Torres JJ, Arévalo-Gardini E, Arévalo-Hernández CO, Zúñiga-Cernadez LB, Leon-Ttacca B. 2017. Optimización de la fertilización orgánica e inorgánica del cacao (*Theobroma Cacao* L.) con la inclusión de Trichoderma endófito y Micorrizas arbusculares. *Revista Tecnología en Marcha* 30:67. DOI: 10.18845/tm.v30i1.3086.
- [74] Vargas Jentsch P, Ciobotă V, Salinas W, Kampe B, Aponte PM, Rösch P, Popp J, Ramos LA. 2016. Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 211:274–280. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.017.
- [75] Viera W, Campaña D, Lastra A, Vásquez W, Viteri P, Sotomayor A. 2017. Micorrizas nativas y su efecto en dos portainjertos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Bioagro* 29:105–114.
- [76] Viets FG. 1964. Principles of Soil Science. *Soil Science Society of America Journal* 28:iv–iv. DOI: 10.2136/sssaj1964.03615995002800030002x.

- [77] Villamizar YL, Rodriguez JS, León LC. 2017. Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. 1 δ Characterization physicochemical, microbiological and functional of cacao shell flour (*Theobroma cacao* L.) variety CCN. *Cuaderno Activa*:65–75.
- [78] Van Vliet JA, Giller KE. 2017. *Mineral Nutrition of Cocoa: A Review*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/bs.agron.2016.10.017.
- [79] Wang F. 2017. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47:1901–1957. DOI: 10.1080/10643389.2017.1400853.
- [80] Watkinson SC. 2016. *Mutualistic Symbiosis Between Fungi and Autotrophs*. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-382034-1.00007-4.
- [81] Watkinson S, Boddy L, Money N. 2016. *The Fungi*.
- [82] Winagraski E, Kaschuk G, Monteiro PHR, Auer CG, Higa AR. 2019. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems of Brazil: A review. *Cerne* 25:25–35. DOI: 10.1590/01047760201925012592.
- [83] Wrigley G, Akehurst TBC, Blackburn SF. 2001. *Cocoa*. DOI: 10.1002/9780470698983.

## ANEXOS

### ANEXO A: Cálculos Estadístico RStudio - Densidad de esporas.

#### ANOVA multifactorial: Densidad de Esporas, Provincia y Sistema.

Variabes	Sum Cuadrados	Df	F value	Pr(>F)
Provincia	403141	2	122,10	0,00002214
Sistema	271700	1	164,58	0,0001109
Provincia:Sistema	328855	2	99,60	0,0001313
Residuals	1386728	84		

#### ANOVA de 1 factor: Densidad de esporas y provincia.

Variabes	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Provincia	2	403141	201570	8,82	0,000324
Residuals	87	1987283	22842		

#### Prueba de comparación de medias para densidad de esporas entre provincia.

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts		
Guayas	Los Ríos	Manabí
"ab"	"a"	"b"

#### ANOVA de 1 factor: Densidad de Esporas y Finca.

Variabes	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Finca	5	1003696	200739	12,16	0,00000000714
Residuals	84	1386728	16509		

#### Prueba de comparación de medias para densidad de esporas entre finca.

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts		
--	--	--

Berto Zambrano	Edén	La Americana	Olla Vieja	San José	Virginia
"b"	"a"	"b"	"b"	"b"	"b"

## ANEXO B: Cálculos Estadístico RStudio - Porcentaje de micorrización.

### Anova multifactorial: Colonización, Provincia y Sistema.

Variables	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
Provincia	15588	2	497,76	1,47E-12
Sistema	16689	1	1.065,87	<2,2e-16
Tipo	49254	3	1.048,55	<2,2e-16
Provincia:Sistema	9322	2	297,67	8,74E-08
Provincia:Tipo	3413	6	36,32	0.002724
Sistema:Tipo	4101	3	87,30	3,54E-02
Provincia:Sistema:Tipo	7268	6	77,36	8,49E-04
Residuals	15032	96		

### ANOVA de 1 factor: Colonización y finca.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Finca	5	41599	8320	12	2,44E-09
Residuals	114	79067	694		

### Prueba de comparación de medias para colonización entre finca.

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts					
Berto Zambrano	Edén	La Americana	Olla Vieja	San José	Virginia
"ab"	"a"	"bc"	"b"	"c"	"bc"

### ANOVA de 1 factor: Colonización y provincia.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Provincia	2	15588	7794	9	0,000306
Residuals	117	105078	898		

## Prueba de comparación de medias para colonización entre provincia.

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts		
Guayas	Los Ríos	Manabí
"b"	"a"	"a"

**Tabla XV.** Matriz de correlación de Pearson.

Variables	Colonización	No. Esporas	B	Ca	Ca.Mg	CaMg.K	Cu	Fe	K	Mg	Mg.K	Mn	NH4	P	pH	S	Σ Bases	Zn
<b>Colonización</b>	1.000	0.5420	-0.2622	0.7377	0.9402	0.4171	-0.4373	-0.5595	-0.4062	-0.4932	0.2375	0.8460	0.8009	-0.8193	0.4913	0.3605	0.4762	-0.2222
<b>No. Esporas</b>	0.5420	1.000	-0.5940	0.9506	0.4117	-0.0060	-0.9845	-0.9771	0.4056	0.4011	-0.1510	0.6305	0.5652	-0.4184	0.4390	0.5910	0.9716	-0.2781
<b>B</b>	-0.2622	-0.5940	1.000	-0.6417	-0.3196	0.0267	0.5626	0.7214	-0.4390	-0.2936	0.1620	-0.3270	-0.3438	0.2034	0.4383	0.2019	-0.6833	0.8310
<b>Ca</b>	<b>0.7377</b>	<b>0.9506</b>	-0.6417	1.000	0.6374	0.1132	-0.9147	-0.9490	0.2233	0.1642	-0.0667	0.8072	0.6477	-0.6172	0.3920	0.4837	0.9368	-0.4077
<b>Ca.Mg</b>	<b>0.9402</b>	0.4117	-0.3196	0.6374	1.000	0.6589	-0.2956	-0.4767	-0.5691	-0.6513	0.4962	0.7193	0.6618	-0.9080	0.2915	0.0555	0.3317	-0.4431
<b>CaMg.K</b>	0.4171	-0.0060	0.0267	0.1132	0.6589	1.000	0.0986	-0.0714	-0.8016	-0.7302	0.9786	0.0718	0.0958	-0.7283	0.1297	-0.3331	-0.1731	-0.3865
<b>Cu</b>	-0.4373	<b>-0.9845</b>	0.5626	-0.9147	-0.2956	0.0986	1.000	0.9379	-0.5028	-0.5075	0.2276	-0.6130	-0.4321	0.3579	-0.4253	-0.6006	-0.9774	0.2476
<b>Fe</b>	-0.5595	<b>-0.9771</b>	0.7214	-0.9490	-0.4767	-0.0714	0.9379	1.000	-0.3661	-0.3368	0.0839	-0.5826	-0.6159	0.4311	-0.2910	-0.4432	-0.9505	0.4277
<b>K</b>	-0.4062	0.4056	-0.4390	0.2233	-0.5691	-0.8016	-0.5028	-0.3661	1.000	0.9666	-0.8066	-0.0464	-0.1075	0.5556	-0.1981	0.2703	0.5458	-0.0213
<b>Mg</b>	-0.4932	0.4011	-0.2936	0.1642	-0.6513	-0.7302	-0.5075	-0.3368	0.9666	1.000	-0.7023	-0.1587	-0.1972	0.5782	-0.0721	0.3385	0.4974	0.0979
<b>Mg.K</b>	0.2375	-0.1510	0.1620	-0.0667	0.4962	0.9786	0.2276	0.0839	-0.8066	-0.7023	1.000	-0.1061	-0.0676	-0.5993	0.0907	-0.3919	-0.3239	-0.2909
<b>Mn</b>	<b>0.8460</b>	0.6305	-0.3270	0.8072	0.7193	0.0718	-0.6130	-0.5826	-0.0464	-0.1587	-0.1061	1.000	0.5468	-0.7286	0.4486	0.4470	0.6602	-0.2283
<b>NH4</b>	<b>0.8009</b>	0.5652	-0.3438	0.6477	0.6618	0.0958	-0.4321	-0.6159	-0.1075	-0.1972	-0.0676	0.5468	1.000	-0.3573	0.3942	0.4863	0.5044	-0.0379
<b>P</b>	<b>-0.8193</b>	-0.4184	0.2034	-0.6172	-0.9080	-0.7283	0.3579	0.4311	0.5556	0.5782	-0.5993	-0.7286	-0.3573	1.000	-0.3742	-0.0497	-0.3325	0.4436
<b>pH</b>	0.4913	0.4390	0.4383	0.3920	0.2915	0.1297	-0.4253	-0.2910	-0.1981	-0.0721	0.0907	0.4486	0.3942	-0.3742	1.000	0.8617	0.2981	0.5733
<b>S</b>	0.3605	0.5910	0.2019	0.4837	0.0555	-0.3331	-0.6006	-0.4432	0.2703	0.3385	-0.3919	0.4470	0.4863	-0.0497	0.8617	1.000	0.5329	0.5959
<b>Σ Bases</b>	0.4762	<b>0.9716</b>	-0.6833	0.9368	0.3317	-0.1731	-0.9774	-0.9505	0.5458	0.4974	-0.3239	0.6602	0.5044	-0.3325	0.2981	0.5329	1.000	-0.3358
<b>Zn</b>	-0.2222	-0.2781	0.8310	-0.4077	-0.4431	-0.3865	0.2476	0.4277	-0.0213	0.0979	-0.2909	-0.2283	-0.0379	0.4436	0.5733	0.5959	-0.3358	1.000