

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Forestal



**“EFECTO DE LA BIOFERTILIZACIÓN EN PLÁNTULAS DE
Theobroma cacao L. CON MICORRIZAS ARBUSCULARES
NATIVAS DEL ÁREA DE CONSERVACIÓN MUNICIPAL “BOSQUE
DE HUAMANTANGA” DE LA PROVINCIA DE JAÉN –
CAJAMARCA”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO FORESTAL

PRESENTADO POR LA BACHILLER:

SELYDINEIZA VILLALOBOS RODAS

Asesor

BMcblga. M.C. MARCELA N. ARTEAGA CUBA

JAÉN – PERÚ

2019



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

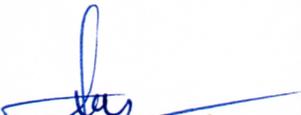
En la ciudad de Jaén, a los diecinueve días del mes de diciembre del año dos mil dieciocho, se reunieron en el Ambiente del Auditorio Auxiliar de la Universidad Nacional de Cajamarca - Filial Jaén, los miembros del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 454-2018-FCA-UNC, de fecha 11 de octubre de 2018, con el objeto de evaluar la sustentación del trabajo de Tesis titulado **"EFECTO DE LA BIOFERTILIZACIÓN EN PLÁNTULAS DE *Theobroma cacao* L. CON MICORRIZAS ARBUSCULARES NATIVAS DEL ÁREA DE CONSERVACION MUNICIPAL "BOSQUE DE HUAMANTANGA" DE LA PROVINCIA DE JAÉN – CAJAMARCA"**, ejecutado por la Bachiller en Ciencias Forestales, doña **SELYDINEIZA VILLALOBOS RODAS**, para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

A las diez horas y treinta minutos, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el evento, invitando al sustentante a exponer su trabajo de Tesis y luego de concluida la exposición, el jurado procedió a la formulación de preguntas. Terminado el acto de sustentación el Jurado procedió a deliberar, para asignarle la calificación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD** con el calificativo de **DIECISÉIS (16)**; por tanto, la Bachiller queda expedito para que inicie los trámites y se le otorgue el Título Profesional de Ingeniero Forestal.

A las once horas y cuarenta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.


Ing. Segundo M. Tafur Santillán
PRESIDENTE


Ing. Leiver Flores Flores
SECRETARIO


Ing. M.Sc. Germán Pérez Hurtado
VOCAL


B.Mcblga. M.C. Marcela Arteaga Cuba
ASESORA

DEDICATORIA

A mis queridos padres, Oswaldo Mercedes Villalobos Bravo y Luzbella Rodas Cubas, por haber hecho posible mi acceso a la educación superior, por su lucha constante, por cada palabra y cada gesto de cariño y orgullo que han guiado mis pasos a lo largo de mi vida, por impulsarme con valor y amor para tomar decisiones, por sus sacrificios que juntos hemos pasado y ser los mejores padres.

A mis docentes, por su confianza y valiosas enseñanzas y mi alma mater Universidad Nacional de Cajamarca - Sede Jaén por la formación profesional de excelencia adquiridos durante mi vida universitaria.

A todas las personas, que, en su afán de conocer la verdad, dedican todos sus esfuerzos a la generación de nuevos conocimientos sobre nuestra realidad para bien de la sociedad.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por brindarme una gran familia, permitir realizarme como profesional y todo cuanto tengo en esta vida.

A mi asesora BMcblga Marcela N. Arteaga Cuba por su confianza y ser guía permanente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi esposo José Franklin Mendoza Llanos por su apoyo constante en esta etapa de mi vida, por su confianza, amor y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

A mi amiga Medalí Ramos Gutiérrez y mi sobrino Jherald Jhimmy Villalobos Vásquez por su constante e incondicional apoyo en la ejecución de mi tesis y ser parte importante en mi vida.

A la Municipalidad Provincial de Jaén por haberme permitido realizar la ejecución de mi tesis a través de la Sub Gerencia de Áreas Verdes y Ornato en las instalaciones del Vivero Municipal.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. Antecedentes de la Investigación	12
2.2. Estudio de la biofertilización	16
2.2.1. Microorganismos utilizados como biofertilizantes	19
2.2.2. Perspectivas de los biofertilizantes	21
2.3. Relación simbiótica hongo – raíz	22
2.3.1. Micorrizas arbusculares	24
2.3.2. Mecanismo de colonización	24
2.3.3. Fuentes de inóculo y técnicas de inoculación	26
2.4. <i>Theobroma cacao</i> L “cacao”	33
2.4.1. Descripción morfológica	33
2.4.2. Distribución mundial y nacional	34
2.4.3. Variabilidad	34
2.4.4. Hábitat	36
2.4.5. Clima	36
2.4.6. Crecimiento	37
2.4.7. Biología floral	38
2.4.8. Propagación en cacao	38
2.4.9. Formas de cultivo	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Descripción del área de estudio	43
3.1.1. Ubicación geográfica y política	43
3.1.2. Clima	43
3.1.3. Ecología	44
3.1.4. Hidrología	44

3.2. Materiales	44
3.3. Metodología	45
3.3.1. Trabajo de laboratorio y campo (vivero)	45
3.3.2. Diseño experimental	48
3.3.3. Evaluación	48
3.3.4. Análisis estadístico	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Colonización de las Micorrizas Arbusculares Nativas en Raíces	49
4.2. Porcentaje de Colonización de las Micorrizas Arbusculares Nativas en Raíces	50
4.2.1. Porcentaje de extensión de la colonización de las micorrizas arbusculares nativas en las raíces de los plantones de cacao	50
4.2.2. Porcentaje de colonización de las micorrizas arbusculares nativas en las raíces de los plantones de cacao	52
4.3. Efecto del Tipo de Inoculación de Micorrizas Arbusculares Nativas en el Crecimiento de Plantones de Cacao	54
4.3.1. Efecto en el crecimiento en altura	54
4.3.2. Efecto en el número de hojas producidas	56
4.3.3. Efecto en el crecimiento de la raíz	57
4.3.4. Efecto en el número de raíces secundarias	59
4.3.5. Efecto en la producción de biomasa	61
4.3.6. Efecto en la química del suelo	65
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1. Conclusiones	67
5.2. Recomendaciones	67
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	DCA aplicado al experimento	48
Tabla 2.	Porcentaje de extensión de colonización	50
Tabla 3.	Análisis de varianza para los tratamientos	51
Tabla 4.	Porcentaje de colonización obtenidos	52
Tabla 5.	Análisis de varianza para los tratamientos	53
Tabla 6.	Crecimiento en altura de los plántones de cacao	54
Tabla 7.	Análisis de varianza para los tratamientos	55
Tabla 8.	Producción de número de hojas de plántones de cacao	56
Tabla 9.	Análisis de varianza para los tratamientos	57
Tabla 10.	Crecimiento de la raíz de los plántones de cacao	58
Tabla 11.	Análisis de varianza para los tratamientos	59
Tabla 12.	Número de raíces secundarias de los plántones de cacao	60
Tabla 13.	Análisis de varianza para los tratamientos	61
Tabla 14.	Biomasa aérea producida por los plántones de cacao	62
Tabla 15.	Análisis de varianza para los tratamientos	63
Tabla 16.	Biomasa de raíz producida por los plántones de cacao	63
Tabla 17.	Análisis de varianza para los tratamientos	65
Tabla 18.	Influencia de la biofertilización en la química del suelo	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación del campo experimental	43
Figura 2.	Vistas microscópicas de colonización, método de sumergimiento	49
Figura 3.	Vistas microscópicas de colonización, método de sumergimiento	49
Figura 4.	Porcentaje de extensión de colonización	51
Figura 5.	Porcentaje de colonización obtenido	53
Figura 6.	Crecimiento en altura de los plántones de cacao	55
Figura 7.	Producción de número de hojas de plántones de cacao	56
Figura 8.	Crecimiento de la raíz de los plántones de cacao	58
Figura 9.	Número de raíces secundarias de los plántones de cacao	60
Figura 10	Biomasa aérea producida por los plántones de cacao	62
Figura 11	Biomasa de raíz producida por los plántones de cacao	64

LISTA DE ANEXO

- Anexo 1: Resultados de la evaluación de colonización por plánton, segmento y por campo evaluado
- Anexo 2: Resultados de la biofertilización en los plántones de cacao
- Anexo 3: Panel fotográfico

RESUMEN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la provincia de Jaén es un cultivo tradicional en la producción agropecuaria y parte de la diversificación de los cultivos agrícolas que se convierte en un sustento económico de los productores; sin embargo, en los últimos años el uso indiscriminado de fertilizantes químicos en la producción de este cultivo, ha provocado un desequilibrio ecológico, el cual trae consigo la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, por lo que se sugiere proponer alternativas que minimicen el efecto de la fertilización química en las plantas a través del uso de microorganismos, en tal sentido, el objetivo del presente trabajo de investigación, fue evaluar el efecto de la biofertilización a nivel de vivero, con micorrizas arbusculares nativas provenientes del Área de Conservación Municipal Bosque de Huamantanga. Las plántulas de *Theobroma cacao* L., fueron inoculadas mediante los métodos de sumergimiento de raíces y mediante aplicación directa al suelo. Para la verificación de la colonización en raíces, se usó el método de Phillips y Hayman (1970); la evaluación de la presencia de esporas en el suelo, se hizo por el método de Gerderman y Nicholson (1963). Los resultados obtenidos en la colonización por el método de sumergimiento por esporas de micorrizas arbusculares nativas del género *Glomus*, fueron de 80.25 %; se obtuvo así mismo incrementos en la biomasa de raíces y hojas; además, mostraron un efecto altamente significativo en el incremento de los niveles de fósforo en el suelo.

Palabras clave: Biofertilización, micorrizas arbusculares, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

The cultivation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in the province of Jaen is a traditional crop in agricultural production and part of the diversification of agricultural crops that becomes an economic sustenance of the producers; however, in recent years the indiscriminate use of chemical fertilizers in the production of this crop, has caused an ecological imbalance, which brings with it the contamination of surface and groundwater, so it is suggested to propose alternatives that minimize the effect of chemical fertilization in plants through the use of microorganisms, in this sense, the objective of this research work, was to evaluate the effect of biofertilization at the nursery level, with native arbuscular mycorrhizae from the Forest Conservation Area of Huamantanga . Seedlings of *Theobroma cacao* L., were inoculated by root submergence methods and by direct application to the soil. For the verification of colonization in roots, the method of Phillips and Hayman (1970) was used; the evaluation of the presence of spores in the soil was done by the method of Gerderman and Nicholson (1963). The results obtained in the colonization by the method of immersion by spores of native arbuscular mycorrhizae of the genus *Glomus*, were 80.25%; it also obtained increases in the biomass of roots and leaves; in addition, they showed a highly significant effect in the increase of phosphorus levels in the soil.

Key words: Biofertilization, arbuscular mycorrhizae, *Theobroma cacao*.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el uso indiscriminado de fertilizantes químicos en la producción del cacao ha provocado un desequilibrio ecológico, el cual afecta directamente a la calidad del suelo y disminuye la nutrición en la planta e incrementa la amenaza de enfermedades en su ciclo inicial de crecimiento que originan pérdidas económicas en el sector agrícola. Además, trae consigo la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, por lo que se sugiere proponer alternativas que minimicen el efecto de la fertilización química en las plantas a través del uso de microorganismos que proporcionen los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (León 2014).

Una alternativa que facilita el proceso de nutrición biológica en las plantas es la biofertilización cuya particularidad radica en contener formulaciones de agentes microbianos (bacterias, hongos, actinomicetos y algas). Algunas de las bacterias son versátiles y pueden presentar varios mecanismos, por ejemplo, *Bacillus subtilis* que produce auxinas que promueven el crecimiento de tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, el cual provoca marchitez y pudrición de las raíces (Rojas et al. 2013).

El uso de biofertilizantes en la agricultura permite a la planta usar de manera eficiente los nutrientes del suelo, lo cual trae ventajas ambientales y económicas al reducir los problemas de contaminación por el exceso de fertilizantes químicos sin poner en riesgo la salud humana. Días et al. (2014), señala que el uso de micorrizas presenta mayor rentabilidad que los fertilizantes, sin embargo, González (2014), resalta que la aplicación de micorrizas y bacterias en plántulas de cacao en etapa de vivero no inciden en el comportamiento fisiológico.

Por otro lado, los hongos micorrízicos presentan mayor rentabilidad que los fertilizantes debido a que esta asociación simbiótica entre el hongo y la planta, actúa como un complemento de la raíz de la planta en la toma de nutrientes, especialmente en la absorción de P, aumento de la tolerancia a condiciones de stress abiótico, mejoramiento de la calidad del suelo, fijación de N₂ y aumento en

la diversidad y productividad de las plantas en un ecosistema determinado (Moreno 2016).

En el Perú existen pocos estudios publicados sobre micorrizas arbusculares a pesar del gran potencial de bosques que presenta el país (Ruiz, Rojas y Sieverding 2015). Cadenillas et al. (2010), determinó el efecto biológico con micorrizas y fertilización química en plántulas de taya *Caesalpinia spinosa* y Arteaga et al. (2011), evaluó los hongos micorrizágenos asociados a la rizósfera del café en la provincia de Jaén, para ambos casos se presenta buenos resultados con las asociaciones de las micorrizas nativas.

De acuerdo a lo expuesto, podemos afirmar que la nutrición vegetal es el proceso que permite a las plantas interceptar y absorber los minerales que requieren para su crecimiento y desarrollo; además se considera que una alternativa la cual facilita éste proceso en las plantas es la biofertilización usando hongos micorrízicos, considerándola como una tecnología que puede beneficiar y ser fácilmente transferida a técnicos y agricultores dedicados a la producción de especies de importancia económica. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la biofertilización a nivel de vivero con micorrizas arbusculares nativas en plántulas de *Theobroma cacao* L. teniendo en cuenta la mejor forma de inoculación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes de la investigación

Prieto et al. (2012), identificó hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar hongos formadores de micorriza arbuscular asociados a sistemas agroforestales con cacao (*Theobroma cacao* L.). Se muestreó cinco sistemas ubicados en fincas de la zona central del trópico húmedo ecuatoriano, en la provincia de Los Ríos, en los cantones Quevedo y Valencia: fincas La Represa, La Propiedad, La Unión, Fátima y Mi Recuerdo. Las muestras de suelo y raíces se recolectaron en la época seca entre los meses de junio y diciembre del 2009. Los géneros de hongos micorrízicos arbusculares encontrados fueron los siguientes: *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Scutellospora*. En todos los sitios muestreados el género con mayor representatividad en cantidad de esporas encontradas por gramo de suelo fue *Glomus*, mientras que para *Gigaspora* hubo la menor cantidad de esporas. También se evaluó el porcentaje de colonización micorrízica existente en *Theobroma cacao* donde el mayor porcentaje de densidad de colonización se encontró en las muestras recolectadas de las fincas Mi Recuerdo y La Unión, y el menor porcentaje en la finca La Propiedad.

Suelos dedicados al monocultivo de *Elaeis guineensis* Jacq en Puerto Wilches Santander-Colombia, presentan baja fertilidad, altas saturaciones de aluminio y baja densidad de esporas de hongos micorrízicos. Chacón y Guerra (2012), evaluaron el comportamiento micorrizas (MA-), en *Brachiaria decumbens* y *Manihot esculenta*, quienes poseen alta micotrofia y capacidad de retención del ion aluminio. Se consideraron las variables densidad de esporas, porcentaje de colonización micorrízica, biomasa seca y longitud radicular, concentración de aluminio foliar y radicular. Se realizó una (ANOVA) de dos vías con un modelo lineal general. Se observaron porcentajes de colonización micorrízica superiores al 70 % en *B. decumbens*

en suelos con concentraciones de 0,6 y 1,4 meq/100 g de Aluminio. *M. esculenta* presento 50 % de simbiosis micorrízica, en todos los tipos de suelo. Se incrementaron las esporas nativas de palma aceitera hasta un 200 % en las dos plantas huésped. Las concentraciones de aluminio a nivel radicular fueron mayores en plantas micorrizadas, mientras que a nivel foliar los valores fueron más bajos.

Bolaños et al. (2012), evaluaron la diversidad y cantidad de micorrizas arbusculares (MA), asociadas a la rizósfera de plantas de café en 28 lotes en producción en 10 subestaciones de Cenicafé y se determinaron los niveles de colonización en raíces y la densidad de esporas/g de suelo. El inóculo nativo se incrementó en *Brachiaria decumbens* y *Pueraria phaseoloides*. En el Cairo, Giganto, Líbano, Buenavista, Pereira y Venecia, se encontraron niveles de colonización entre el 25 y 48 %, resultado asociado con los contenidos de materia orgánica y con el bajo nivel de fósforo en esos suelos. En Sasaima y en Supia, en suelos Hapludands y Dystropets se encontraron los mayores niveles, entre el 40 y 92 %, respectivamente. La densidad de esporas/g de suelo fue mayor de 50. En Naranjal hubo menor cantidad de esporas/g de suelo (11 a 16). Las especies más frecuentes fueron *Acaulospora mellea* y *Glomus occultum*. La fertilización reiterada influyó sobre la cantidad y diversidad de esporas de micorrizas arbusculares. En Chinchina se encontraron *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Glomus fistulosum*, *Acaulospora tuberculata* y *Acaulospora scrobiculata* se aislaron en El Cairo, *A. foveata*, *G. invermaium* y *G. Fistulosum* se aislaron de suelos con más del 10 % de materia orgánica. *G. intraradices* de suelos con 11 ppm de P y contenido de materia orgánica del 19 % en la Trinidad (Líbano), *Glomus macrocarpum* a pH menor que 5, *Sclerocystis sinuosa* junto con *Acaulospora appendicula*, *A. mellea*, *Scutellospora* sp., *Glomus occultum* y *G. invermaium* se identificaron en suelos con 3 ppm de fósforo.

Arcos (2000), realizaron en zonas aledañas a San José del Guaviare un reconocimiento de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a especies de cacao (*Theobroma* sp.) y se concluyó que las especies de

micorriza presentaron afinidad con las condiciones fisicoquímicas del suelo y no hubo especificidad con el hospedero.

Muñoz et al. (2009), determinaron el grado de micorrización natural y la identificación de géneros de hongos micorrízicos arbusculares nativos asociados a las raíces de nogal pecanero (*Carya illinoensis* Wangenh.) C. Koch en producción. Se evaluaron tres huertas nogaleras, El Maguey, La Esmeralda y La Fama, localizadas en la región de Delicias-Rosales en el estado de Chihuahua. Se recolectaron porciones de raíces localizadas dentro del área de goteo para evaluar el porcentaje de micorrización natural y su identificación. La huerta El Maguey presentó el mayor porcentaje de micorrización arbuscular con respecto a las huertas La Fama y La Esmeralda, con una variación a través de los meses que se consideró desde un 13 a 32 %. La buena aireación y humedad, la presencia de cobertera natural de gramíneas, riego por goteo y la incorporación de abonos orgánicos que presentó la huerta El Maguey permitieron el desarrollo de la micorrización. En los suelos muestreados de las huertas en estudio la mayoría de las raíces muestreadas se localizaron de los cinco a los 35 cm de profundidad. El tipo de estructuras características de la micorriza arbuscular encontradas en las raíces de nogal pecanero fueron vesículas, esporas y micelio. Los géneros de hongos micorrízicos arbusculares encontrados asociados a la raíz del nogal pecanero en las huertas fueron *Glomus* y *Gigaspora*; además se logró identificar una especie de hongo micorrízico arbuscular correspondiente a *Glomus sinuosum*; siendo este el primer estudio en el cual se reportan hongos micorrízicos arbusculares asociados a la raíz de nogales de la zona Delicias y Rosales en el estado de Chihuahua.

En el municipio de Tumaco, Nariño, Ballesteros et al. (2004), evaluaron la presencia de hongos formadores de micorrizas (HMA) en cultivos de *Theobroma cacao*, *Musa* sp., *Borojoa patinoi* y *Bactris gasipaes*. Bajo condiciones de laboratorio se cuantificó el porcentaje de infección de raíces (en lámina) y se determinó las especies de HMA presentes en cada uno de los cultivos (por medio de la separación de esporas). El mayor porcentaje de

infección (48 %) correspondió a *Musa* sp., *Bactris gasipaes* presentó el 20 %; *Borojoa patinoi* y *Theobroma cacao* presentaron los valores más bajos con el 12 % y 8 % respectivamente. Los géneros de Micorriza HMA presentes, en los cultivos, correspondieron a *Scutellospora* y *Glomus* sp., en *Musa* sp., *Glomus* y *Acaulospora* en *Bactris gasipaes* y *Glomus* sp., en *Borojoa patinoi* y *Theobroma cacao*.

Barrera et al. (1999), Evaluaron el efecto de la aplicación de micorrizas y de inóculos en el desarrollo de plántulas de Chachafruto, *Erythrina edulis*, en etapa de vivero en cuanto a: tipo de micorriza y sustrato utilizado, la altura de la planta, el porcentaje de infección de raíces por la micorriza, el peso seco de la parte aérea de la planta y el peso de la raíz de la plántula. En todos los tratamientos, aún en el testigo (suelo cafetero) y en los que no se aplicó directamente inóculo, al momento de la evaluación estaban presentes géneros de *Acaulospora* sp., *Glomus* sp., *Gigaspora* sp., indicando esto, su alta presencia en los suelos donde se realizó la investigación, mostrando su importante influencia en el desarrollo de las plantas.

Además, se observó en relación con la altura, que los valores para todos los tratamientos no tuvieron variación significativa con respecto al testigo (suelo cafetero) (Barrera et al. 1999).

Por otro lado, Infante (2013), cuantificó los niveles de infección micorrízica e identificó las especies de hongos micorrícicos más frecuentes asociadas con árboles de pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K., especie potencial para utilizar en sistemas silvopastoriles) en sistemas de producción de cultivos arbóreos en multiestrato y en monocultivo, en suelos ultisoles en Yurimaguas, Perú. El nivel de infección micorrízica fue de 46 % en suelos de textura areno franca y 80% en textura franco-arenosa. Estas diferencias por la textura de estos suelos pueden estar correlacionadas con la disponibilidad de fósforo en las parcelas (10.8 ppm en la areno-franca contra 4.8 ppm en la franco-arenosa), en el que es mayor en el suelo franco-arenoso por contener mayor cantidad de arcilla; las mismas tendencias con respecto a textura del suelo se

observaron en parcelas de pijuayo en monocultivo, sin embargo, los niveles de infección micorrízica fueron más bajos.

Con el fin de investigar la actividad de las micorrizas en condiciones de vivero, Reyes (1998), evaluó el efecto de *Glomus* spp., bacterias, vermicomposta y un testigo en el desarrollo de plántulas de aguacate. Los sustratos fueron una mezcla de suelo agrícola y de arena de río (1:1 v/v) y uno referencia que era un suelo forestal; la evaluación del efecto se hizo a los 200 días después del trasplante. La altura y diámetro del tallo se favorecieron con los tratamientos de vermicomposta y la micorriza *Glomus*. La vermicomposta y la multicepa *Glomus* spp., promovieron mayor número de hojas, mayor superficie de área foliar y peso seco de la parte aérea con respecto al testigo. El resto de los tratamientos superaron o al menos igualaron la respuesta de las plantas que se desarrollaron en el tratamiento testigo, sin inoculación microbiana ni aplicación de materia orgánica. En el caso de la fotosíntesis, se observó mayor actividad en los tratamientos que tuvieron la presencia de la micorriza y la bacteria, y la más baja en los tratamientos testigo y de referencia. La colonización de la raíz por estos microorganismos probablemente aumentó la actividad fotosintética de las plantas, debido a que pudo existir demanda extra de fotosintatos por parte de ellos. La altura de la planta fue favorecida con la vermicomposta, así como la inoculación de hongos micorrízicos en sus diferentes combinaciones, observándose diferencias con respecto al testigo y tratamiento-sustrato de referencia. Se observa que la bacteria sola o en combinación con la micorriza o vermicomposta no favorecen el desarrollo de la altura. La vermicomposta y la micorriza actuando en forma aislada tuvieron un efecto mayor en la promoción de altura. En varias investigaciones se ha demostrado la eficiencia de los hongos micorrízicos del género *Glomus* en promover el desarrollo de plántulas.

2.2. Estudio de la Biofertilización

Los biofertilizantes son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales, de una forma u otra, proveen o mejoran la

disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos (Rinaudo et al. 2013).

Un biofertilizante es una preparación que contiene células vivas o latentes provenientes de cepas eficientes de microorganismos que aceleran los procesos microbianos del suelo mejorando la asimilación de nutrientes por parte de las plantas. El uso de biofertilizante es importante, pues estos suplen o complementan el aporte de los fertilizantes minerales, los cuales, a pesar de resultar beneficiosos, se ha comprobado que causan daños al ambiente (como la acidificación de los suelos por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados). Existen distintos tipos de biofertilizantes, como los abonos y el compost, así como aquellos que incluyen inoculantes microbianos y otros derivados de subproductos agrícolas y animales (Almario et al. 2015).

Desde el comienzo de la agricultura los abonos han sido usados como fertilizantes biológicos. Grandes cantidades de compost obtenido del tratamiento de estiércol producido por la ganadería, son empleadas en la agricultura por sus altos contenidos de nutrientes para las plantas, humus y sustancias orgánicas. El compost es otro biofertilizante eficaz a la hora de brindar beneficios a los suelos agrícolas; este producto estable y libre de patógenos y semillas se obtiene a través de un proceso biológico de descomposición por medio de altas temperaturas. Los aportes biológicos y químicos del abono y el compost se ven reflejados en el mejoramiento de las condiciones físicas de los suelos, que aumentan la calidad de los cultivos (Haug 2013).

Existe otro tipo de biofertilizantes cuya particularidad radica en contener formulaciones de agentes microbianos (bacterias, hongos, actinomicetos y algas). Estos inoculantes poseen una relación funcional y constituyen un sistema holístico con la planta; su uso, ya sea solos o en compañía de sustratos orgánicos, se remonta a más de setenta años. Cabe agregar que dichos bioinoculantes cumplen funciones como de promotores de crecimiento, nutrición y defensa ante plagas y enfermedades (Haug 2013).

Algunos subproductos de origen animal y vegetal también son utilizados como biofertilizantes, específicamente los derivados del proceso industrial de cualquiera de estas fuentes. Los de origen animal abarcan tejidos duros, como huesos, cuernos, uñas, pelo y otros ricos en proteínas fibrosas derivadas del colágeno y la queratina, ya que son una buena alternativa como fertilizantes y enmiendas. Entre sus ventajas cabe destacar que son biodegradables y se ha demostrado que su procesamiento es de bajo costo (Gousterova 2016).

En cuanto a los subproductos de origen vegetal, los biofertilizantes se obtienen a través del procesamiento de fibras; los residuos vegetales, además, se pueden usar aplicándolos directamente al suelo o después de su procesamiento (por ejemplo, a través de compostaje). Su uso y resultados han demostrado que pueden reemplazar la aplicación de fertilizantes minerales (Brosius et al. 2015).

Los biofertilizantes vegetales se caracterizan por sus notables aportes de nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica. El resultado final de su uso en los cultivos no dista del que se obtiene con fertilizantes de origen mineral (Herencia et al. 2017).

Existe un último grupo de biofertilizantes, que corresponde al uso de inoculantes microbianos, ya sea solo o como complemento de formulaciones, que se describen en este boletín. Los inoculantes microbianos son componentes promisorios para complementar la nutrición de las plantas. Dado que optimizan la toma de nutrientes, resulta una herramienta excelente para el manejo integrado, pues garantizan la sostenibilidad de la producción agrícola (Adesemoye y Kloepper 2014).

El uso de biofertilizantes en la agricultura trae ventajas ambientales y económicas, ya que satisfacen las necesidades nutricionales de los cultivos. Sin embargo, su dosificación debe ser vigilada porque pueden alterar los índices de nitrógeno, fósforo y potasio por sus altos contenidos de origen (Sorensen 2013).

Algunas de las bacterias son versátiles y pueden presentar varios mecanismos, por ejemplo, *Bacillus subtilis* que produce auxinas que promueven el crecimiento de tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, el cual provoca marchitez y pudrición de las raíces (Gupta et al. 2014).

2.2.1. Microorganismos utilizados como biofertilizantes

Los microorganismos que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBNA) que es la reducción enzimática de nitrógeno (N_2) a amonio (NH_4), podemos clasificarlos en dos grupos a) microorganismos (bacterias hongos y algas) que fijan nitrógeno en forma no simbiótica o de vida libre y b) microorganismos que fijan el nitrógeno en forma simbiótica con plantas leguminosas y no leguminosas (azolla, gramíneas y otras), las mayores cantidades de nitrógeno atmosférico fijado, es llevado a cabo por leguminosas en asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (Richards 2017).

En las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se encuentran los géneros más estudiados que son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*, los cultivos en donde ha sido más estudiado este proceso de fijación de nitrógeno son: caña de azúcar, arroz, sorgo, trigo y pastos tropicales forrajeros, donde la fijación de N_2 por bacterias asociativas y de vida libre es importante (Döbereiner et al. 2015).

Microorganismos que proporcionan fósforo a las plantas, entre los más importantes está los hongos micorrízicos que presentan asociación simbiótica con las plantas, las cuales suministran además de un nicho ecológico, la fuente de carbono que necesita el hongo para su desarrollo, a su vez la planta se beneficia incrementando la captación de nutrientes minerales del suelo principalmente fósforo (Alloush et al. 2014).

En Chile ancho inoculado con *Glomus intraradices*, en suelo franco arenoso, con bajo contenido de fósforo, se obtuvo incremento en el número de hojas, área foliar, frutos y biomasa de raíces (Aguilera et al. 2017).

La disponibilidad del fósforo para la planta está influenciada por los microorganismos de la rizósfera. Un alto porcentaje de las bacterias de la rizósfera y el rizoplano son capaces de degradar sustrato de fósforo orgánico, y las cifras totales de microorganismos aumentan en la vecindad de raíces metabólicamente activas (Powell y Bagyaraj 2014).

Existen microorganismos solubilizadores de nutrientes tal es el caso de *B. subtilis*, *B. circulans* y *B. polymyxa*, lo cual, permite que el fósforo disponible en la rizosfera se incremente en beneficio para las plantas (Bashan et al. 2016).

Bacterias promotoras de crecimiento de las plantas (BPCP), tienen capacidad para sintetizar sustancias reguladoras del crecimiento o fitohormonas. Estas sustancias son compuestos naturales, que afectan diversos procesos de las plantas, a concentraciones más bajas de las que presentan nutrientes o vitaminas. Los reguladores del crecimiento vegetal sintetizados por las plantas son: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido indolacético, etileno y ácido abscísico. Cuando estas sustancias son producidas en forma endógena por las plantas, se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas. El término "reguladores del crecimiento de las plantas" se refiere a los compuestos sintéticos que tienen propiedades para regular el crecimiento de las plantas; generalmente, este término se utiliza también cuando las hormonas de las plantas son producidas por microorganismos de la rizosfera (Arshad y Frankenberger 2013).

Microorganismos productores de sideróforos que son compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad por el hierro (Fe^{3+}); también pueden tener afinidad por el manganeso y molibdeno, como un mecanismo para obtener estos micronutrientes en condiciones de deficiencia (Cornish y Page 2000).

Los sideróforos se asocian con el Fe^{3+} en la solución del suelo y son reabsorbidos y procesados en la planta o en la bacteria, siendo un mecanismo eficiente para obtener nutrientes. Su producción ha sido asociada con diversas bacterias libres, especialmente del grupo de las *Pseudomonas* (Zdor y Anderson 2013).

2.2.2. Perspectivas de los biofertilizantes

El aumento de la concientización sobre el cuidado del medio ambiente y la evidencia del deterioro ambiental que causan los agroquímicos ha hecho que los productores agrícolas, vean como buena alternativa la aplicación de los biofertilizantes ya que en la actualidad se usa BPCP y hongos micorrízicos, entre los productores de plántulas en invernaderos y viveros, así como el incremento de microempresas productoras de abonos orgánicos que incluyen los biofertilizantes y la producción de estos insumos por los propios productores, que los introducen a un manejo más sustentable del suelo, estas prácticas van en aumento tanto en agricultura orgánica como convencional, sobre todo en el noroeste del país, aun siendo donde se tiene la tecnología agrícola más avanzada. Se está adoptando una estrategia de suministro de nutrientes a los cultivos (hortalizas y cultivos de grano), integrando una inteligente combinación de fertilizantes orgánicos, humus de lombriz y biofertilizantes; todo ello dentro del marco de la sustentabilidad, para reducir los daños causados al ambiente y a la salud del hombre y los animales por los métodos irracionales que se han empleado en las últimas décadas (Fundación Produce 2016).

La mayor demanda de abonos orgánicos por los productores agrícolas vienen siendo los fermentados líquidos (compostas líquidas y biofertilizantes líquidos) que al aplicarse al suelo tienen importantes beneficios entre los que destacan, el aumento en los nutrientes, mejoramiento de la capacidad del suelo para retener agua; mejores condiciones físicas para el desarrollo de las raíces y el laboreo del suelo, control de algunas enfermedades del suelo que causan la pudrición de raíces, y un aumento en la actividad microbiana (Litterick et al. 2014).

Otras razones de la preferencia de estos abonos líquidos son:

- a) Que pueden aplicarse de muchas maneras incluyendo el agua de riego que puede ser por gravedad o presurizado.
- b) Fácil manejo por las motobombas que reducen jornales.

- c) No requiere equipo especializado para su almacenamiento y aplicación y
- d) Se tiene mejor control de la cantidad aplicada al manejarse en volumen y no en peso.

El incremento de estas microempresas y práctica del productor de producir su propio fertilizante (biofertilizantes), debe ser fomentada y mejorada por los centros de investigación y organismos relacionados con la agricultura, para optimizar esta actividad que se traduzca en mayores ganancias y mejoras al ambiente. Entre las actividades a mejorar esta el de seleccionar microorganismos nativos de la región en la producción de biofertilizantes, ya que así se dan mayores posibilidades del establecimiento y multiplicación del mismo en el suelo, lo que permitirá un mayor beneficio en la planta. En Sinaloa, en producción de plántula de chile jalapeño, la aplicación de cepa nativa de *Bacillus subtilis*, presentó la mayor producción de biomasa (peso seco), comparable a cepas de *Bacillus comerciales* (Espinoza et al. 2013).

2.3. Relación simbiótica hongo-raíz

En los últimos años ha despertado interés las interacciones entre plantas y hongos, especialmente con micorrizas arbusculares. Las micorrizas representan las asociaciones simbióticas entre las plantas y hongos basada sobre el intercambio de metabolitos y nutrientes. Más del 95 % de las plantas embriofitas son capaces de formas simbiosis con micorrizas. Tanto los hongos como las plantas tienen distribución universal, presentándose de esta manera ecotipos adaptados a condiciones diversas y extremas. Es de señalar que las plantas y las micorrizas tienen un origen común (Pérez et al. 2015).

La mayoría de nosotros está familiarizada con los típicos hongos de sombrero que se desarrollan en los bosques, sin embargo, lo que percibimos es solamente un cuerpo fructífero formado por miles de hifas, estructuras microscópicas estrechamente unidas. El verdadero cuerpo del hongo es subterráneo y difícil de apreciar a simple vista. Las hifas subterráneas de estos macromicetos, como se conocen, forman parte de la microflora del

suelo. En este sistema tan complejo existen varias familias de hongos. La mayoría no produce cuerpos fructíferos tan evidentes. Las funciones de estos hongos del suelo son múltiples, degradan la materia vegetal, benefician a las plantas asociándose a sus raíces e incluso algunos, afortunadamente pocos, les producen enfermedades (Lynch 2013).

En 1885, Frank propuso el término micorriza para describir un fenómeno común que observó en las raíces de ciertos árboles de los bosques templados de Norteamérica. Estos órganos eran diferentes morfológicamente de otras raíces cuando se encontraban asociadas a hongos del suelo; de ahí proviene su nombre latino que significa raíz fungosa (Harley y Smith 2013).

Inicialmente estas asociaciones entre hongos del suelo y las raíces de los árboles fueron las únicas que se reconocían como micorrizas, pero trabajos posteriores mostraron que existía una gran diversidad de asociaciones de este tipo, no sólo en plantas leñosas, sino en la mayoría de los vegetales. En las simbiosis mutualistas de este tipo, los hongos se benefician con los nutrientes sintetizados por la planta y a su vez acarrean minerales del suelo para cederlos a la raíz. Cuando se establece la interacción, los hongos por lo general modifican la morfología de la raíz, desarrollando nuevas estructuras que caracterizan a los diferentes tipos de micorrizas (Harley y Smith 2013).

Tradicionalmente se reconocen cinco grupos de micorrizas basándose en criterios morfológicos, anatómicos y sistemáticos tanto de las plantas como de los hongos. Tales grupos son: ectomicorrizas, micorrizas de ericales, micorrizas de Orchidaceae, ectoendomicorrizas y micorrizas arbusculares también llamadas endomicorrizas. El presente trabajo es una revisión sobre algunos aspectos de interés en el tema de las endomicorrizas (Lynch 2013).

Las micorrizas arbusculares nativas están ampliamente distribuidas en condiciones naturales, se encuentran en todos los continentes, excepto en la Antártida; se dan en todos los suelos, incluyendo los de minas abandonadas, suelos agrícolas, suelos de pantanos y en hábitat acuáticos. Los suelos

poseen naturalmente una diversidad de especies de micorrizas, que pueden colonizar las raíces de la mayoría de las plantas cultivadas, independientemente de las condiciones ambientales, mejorando así el suministro de nutrientes, crecimiento y producción de las plantas hospederas especialmente en condiciones de nutrientes deficientes (Pérez et al. 2015).

2.3.1. Micorrizas arbusculares

El tipo de asociación hongo-raíz más extendido en la naturaleza tal vez sea la llamada endomicorriza o micorriza arbuscular, formada por ciertos zigomicetos, los cuales no desarrollan red de Hartig y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbusculos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped. Algunos géneros de estos hongos forman también otro tipo de estructuras llamadas vesículas, compuestas principalmente por lípidos. Estas vesículas están presentes intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrimentos para el hongo. La presencia tanto de arbusculos como de vesículas dio lugar a que la simbiosis se conociera originalmente como vesículo-arbuscular (V-A), sin embargo, no todas las especies de hongos forman vesículas, por lo que en la actualidad la asociación se conoce como micorriza arbuscular (MA) (Aguilera et al. 2017).

2.3.2. Mecanismo de colonización

Las esporas pueden considerarse solamente uno de los tipos de propágulos de los hongos endomicorrízicos debido a que las raíces de las plantas se colonizan también por trozos de micelio activo que se ramifica para desarrollar la infección. En las micorrizas arbusculares existen dos fases del sistema micelial: un micelio interno en la corteza de la raíz de la planta y un micelio externo en el suelo, que varía en extensión y volumen (Harley y Smith 2013).

El inicio de la colonización de la planta y con ello la formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo

cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables o bien mediante el crecimiento de hifas a partir de propágulos del suelo que se encuentran cerca del sistema radical susceptible. El crecimiento del micelio se incrementa algunas veces debido a que los exudados de la raíz pudieran proporcionar sustratos adecuados para el desarrollo de las hifas después de que las reservas de nutrimentos sobre todo en las esporas, se hubieran agotado. Sin embargo, a pesar del crecimiento micelial en presencia de raíces, las hifas no parecen tomar una dirección hacia ellas, sino hasta que se encuentran muy cerca, es decir unos pocos milímetros (Bolan y Abbott 2013).

La hifa finalmente tiene contacto con la célula epidérmica o un pelo radical y produce un apresorio ligeramente engrosado, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas cortas. Posteriormente se produce la penetración de la epidermis o del pelo radical mediante la presión ejercida por la hifa en crecimiento sobre la pared celular, lo cual hace que esta última se combe alrededor de la hifa y se vuelva mucho más delgada en las células corticales. No se sabe si está involucrada la producción de enzimas por el hongo, pero parece probable que ocurra una alta actividad hidrolítica y se ha sugerido también que la entrada de la hifa a la raíz se facilita por la presencia de pectinasas (Bonfante et al. 2014).

Una vez que la hifa penetra la raíz, generalmente entre las células epidérmicas, se dispersa también intercelularmente a lo largo de la corteza, alcanzando la segunda capa de células corticales. La colonización se vuelve intracelular cuando la hifa degrada la pared de la célula e invagina la membrana para ramificarse luego dicotómicamente muchas veces y formar una estructura parecida a un arbusto, denominada arbúsculo, dentro de la célula. Este es el sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrimentos entre ambos simbioses (Harley y Smith 2013).

Otras ramificaciones de las hifas intraradicales en algunos géneros de hongos endomicorrízicos, forman vesículas intercelulares que parecen ser

reservorios de nutrimentos dado que presentan gran cantidad de lípidos (Bowen 2017).

La vida media de un arbusculo en actividad es muy corta y varía entre dos y quince días, al cabo de los cuales se colapsa y permanece rodeado por el plasmalema de la célula vegetal, siendo encapsulado por material depositado en la zona interfacial proveniente presumiblemente del hospedero (Harley y Smith 2013).

Este continuo proceso de degradación de arbusculos a la vez que se forman otros nuevos es ventajoso para la planta, un arbusculo en degradación, lleno de nutrimentos puede liberar su contenido a la célula de la raíz y a partir de allí distribuirse a toda la planta (Salazar y García 2002).

La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas y hongos por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Bowen 2017).

2.3.3. Fuentes de inóculo y técnicas de inoculación

Las tres principales fuentes para la ectomicorrización e inoculación con micorrizas VA en los viveros que producen en contenedor, son el suelo, las esporas y los micelios vegetativos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo de los objetivos y del costo del programa de inoculación.

a. Inoculación con suelo

Históricamente, el inóculo de suelo obtenido debajo de árboles hospedantes ha sido utilizado de manera extensiva, particularmente en los países en desarrollo (Mikola 1970). En los viveros a raíz desnuda, hasta 10 % en volumen de suelo inoculado es incorporado a la cama de crecimiento (aproximadamente los 10 cm de la capa superior de la cama) antes de realizar la siembra. Goodwin (1976), utilizó hojarasca de pino tamizada, como inóculo para plantas de *Pinus taeda* producidas en contenedor, y observó un marcado incremento en altura después de 3

años, en Carolina del Norte. Parke et al. (1983), reportaron un incremento en el crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* producidos en contenedor, inoculados con residuos y humus provenientes del sotobosque de árboles de *Pseudotsuga menziesii*.

Este método requiere grandes cantidades de suelo cada año. Una de las más serias desventajas de este tipo de inóculo, es que las semillas, rizomas de malezas y patógenos potenciales, pueden ser transportados de forma accidental hacia el vivero a través del suelo. Otra desventaja es la inconsistencia en la calidad del inóculo, debido a los diferentes momentos y fuentes de abastecimiento de suelo. No se recomienda este método a menos que no existan otras formas de inoculación.

b. Inoculación con esporas

Las esporas o cuerpos de fructificación macerados de algunos hongos macromicetes, sclerodermatales y trufas (y falsas trufas) ectomicorrícicas, proporcionan buen inóculo. Las trufas (Ascomicetes) y las falsas trufas (Basidiomicetes), referidas ambas como trufas de ahora en adelante, resultan excelentes para esto, dados que sus cuerpos reproductores principalmente del tejido que sostiene esporas y sus cuerpos de fructificación pueden ser bastante grandes. Para preparar la inoculación por esporas, los cuerpos reproductores recién recolectados son enjuagados con agua corriente para remover el suelo adherido o la materia orgánica, posteriormente se cortan en pequeños trozos (de 1 a 3 cm³) y finalmente se agrega agua potable a presión por un espacio de 2 a 3 minutos, hasta que las partes queden completamente licuadas. Se ha encontrado que no es necesario purificar la suspensión. Li y Castellano (1987) encontraron microorganismos benéficos tanto dentro como en el exterior de los cuerpos reproductores maduros de varios hongos ectomicorrícicos.

Debe de fomentarse este tipo de organismos y no excluirlos (Garbaye y Bowen 1987). Se recomienda utilizar esporas frescas siempre que sea posible, aunque se ha almacenado suspensión de esporas, de diferentes

especies del género *Rhizopogon* hasta por tres años, sin una reducción significativa en la efectividad de la inoculación. Las esporas son aplicadas de seis a doce semanas luego de la siembra, ya sea mediante una regadera común o a través del sistema de riego. La mayoría de las esporas de trufas tienen un diámetro menor a 50 μm y puede pasar libremente a través de la mayoría de los filtros y boquillas de riego. La cantidad deseada de esporas es mezclada dentro de una regadera que contiene suficiente agua para cubrir un determinado número o superficie de plantas (Styroblock® o bandejas de tubetes de plástico). La aplicación de esporas dos veces, con una separación de dos o tres semanas, funciona mejor para asegurar una distribución uniforme, especialmente cuando se usa el sistema de riego, en lugar de regaderas manuales (Castellano 1987).

De manera alternativa, las esporas pueden ser aplicadas a la semilla antes de realizar la siembra. Aun y cuando no se ha utilizado con mucha frecuencia, este método ha demostrado ser más efectivo que el de riego mediante regadera, para la inoculación de cada una de las plantas. El tratamiento de las semillas puede además permitir un mejor control al poder relacionar ecotipos de hongos con determinadas especies (Marx y Bell 1985).

En pruebas prácticas, Castellano (1987), ha inoculado de manera exitosa siete millones de plantas de *Pseudotsuga menziesii* producidas en contenedor en los últimos dos años, mediante la incorporación de suspensión de esporas de *Rhizopogon vinicolor* a través del sistema de riego. Utilizando el sistema de riego montado en la parte superior de la estructura del invernadero, una cantidad conocida de esporas fue aplicada a bloques de 250 000 plántulas de ocho semanas de edad, durante cinco minutos o menos. El tratamiento consistió en el pre-humedecimiento del sustrato durante un minuto, posteriormente la aplicación de esporas durante dos minutos y, finalmente, un humedecimiento adicional durante dos minutos para que las esporas puedan descender dentro de cada cavidad. El período de

humedecimiento adicional sirve para limpiar las tuberías cuando se han utilizado otros tipos de hongos para diferentes grupos de especies. Se han probado muchas especies diferentes de hongos utilizando el método de suspensión de esporas para la inoculación; las especies del género *Rhizopogon* han tenido el mayor éxito.

Para la producción de *Pseudotsuga menziesii* se ha enfocado a la utilización de *Rhizopogon vinicolor*, dado que *Pseudotsuga menziesii* es un hospedante específico y los resultados de inoculación como basidiosporas han sido exitosos, para la producción de plantas en viveros tanto en contenedor como a raíz desnuda (Castellano et al.1985).

Esta combinación hongo hospedante produce micorrizas con prolíficos rizomorfos, cuya función principal es el transporte de agua. En el hemisferio sur, las esporas de otras especies del género *Rhizopogon*, específicamente *R. luteolus*, han sido utilizadas de manera exitosa para inocular y estimular el crecimiento de pinos en Australia (Duddridge et al. 1980).

Como *sucede* con la inoculación vegetativa, no todos los hongos pueden ser inoculados de manera efectiva con este método. El inóculo no está libre de otros organismos, pero en siete años de experiencia con este tipo de inóculo, no se ha encontrado ningún efecto dañino en las plantas que han sido tratadas. Los cuerpos reproductores usados para la preparación de la suspensión sólo están disponibles en ciertas épocas del año, y a diferencia de la inoculación vegetativa, la constitución genética de las esporas variará año con año y de lugar a lugar.

c. Inoculación con micelios

Muchos investigadores se han concentrado en la producción y utilización de cultivos puros de inóculo de hongos micorrícicos selectos. Molina y Palmer (1982) detallan el aislamiento y mantenimiento de cultivos ectomicorrícicos.

Marx y Kenney (1982) trabajaron en la producción de inóculo ectomicorrícico. Básicamente, un cultivo puro de un hongo en particular es obtenido mediante el aislamiento de material fúngico (germinación de esporas o explantes de tejido vegetativo) en un sustrato especial, para después ser cultivado bajo condiciones asépticas para la producción del inóculo. El inóculo así obtenido, usualmente producido en un sustrato de turba de musgo, y humedecido con una solución nutritiva, se mezcla con el sustrato de los contenedores antes de que éstos sean llenados y sembrados. La inoculación vegetativa tiene un costo inicial alto y demanda más trabajo que el método de inoculación por esporas. De la misma forma que en la inoculación por esporas, las diferentes especies de hongos también varían en su efectividad en la inoculación vegetativa. Por ejemplo, *Rhizopogon vinicolor* se desarrolla bien en un sustrato artificial, pero no es efectivo en la colonización de raíces activas, cuando es usado como inóculo vegetativo (Molina 1980).

Marx et al. (1982), utilizaron *Pisolithus tinctorius* en la primera aplicación a gran escala de inóculo ectomicorrícico en viveros que producen en contenedor. Se comparó la efectividad del inóculo vegetativo producido en laboratorio con el inóculo producido comercialmente, en diez especies de Pinus, *Pseudotsuga menziesii*, *Tsuga heterophylla* y *Quercus macrocarpa*. Ambas fuentes de inóculo fueron efectivas, y se obtuvo una mayor efectividad después de haber drenado con agua de riego el exceso de nutrientes. Ninguna otra característica del inóculo o tratamiento afectaron significativamente el éxito de la inoculación, excepto cuando se saturó con captán® después de la siembra, mejorándose la efectividad del inóculo. Desafortunadamente no se han demostrado mejoras en la supervivencia o el crecimiento, tanto en el vivero como en las plantaciones, que justifiquen en el costo de la inoculación vegetativa con *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria laccata* (Molina 1980, Castellano 1987). En el Pacífico Noroeste, tanto en condiciones de vivero (Hung y Trappe 1987) como en el terreno (Castellano 1987), las ectomicorrizas de *Laccaria laccata* y en un menor grado *Hebeloma crustuliniforme*, son

rápidamente reemplazadas por hongos nativos después del trasplante (los cuales parecen ser del género *Rhizopogon*).

d. Inoculación de micorrizas vesículo-arbusculares

Dos características principales de las micorrizas vesiculares-arbusculares, influyen fuertemente en las formas de inoculación, tanto natural como artificial. Las esporas de las micorrizas VA no son dispersadas por el viento, como sucede con las esporas de los hongos ectomicorrícicos; dichas esporas no son diseminadas por el viento hacia dentro del vivero, ni en el vivero, como para que se pueda realizar la inoculación natural de las plantas. Por lo tanto, las plantas hospedantes de micorrizas VA producida en sustratos artificiales o suelo esterilizada, no podrán formar micorrizas. Segundo, dado que las micorrizas VA no pueden ser desarrolladas en cultivos puros (sin un hospedante), el inóculo vegetativo (por micelios), como comúnmente se producen las ectomicorrizas, no está disponible. Sin embargo, existen otras fuentes y técnicas de inoculación para los hongos micorrízicos VA, y éstas son semejantes en muchas formas a las usadas para hongos micorrízicos. Un método simple de realizar la inoculación se logra tomando el suelo natural bajo los hospedantes de micorrizas VA, para incorporarlo posteriormente al sustrato de los contenedores. Parke et al. (1983), reportaron un mejor crecimiento de plantas de *Thuja plicata* producidas en contenedor, inoculadas con residuos y humus tomados del suelo de árboles de *Pseudotsuga menziesi*. Sin embargo, tal como con la inoculación ectomicorrícica, esta técnica no es recomendada debido a la alta probabilidad de introducir plagas y enfermedades en el vivero, así como la gran cantidad de suelo forestal requerido. Aunque aún no es posible producir micorrizas VA mediante cultivo, es posible producir inóculo en forma masiva, de un hongo micorrízico VA conocido, dejándolo crecer en asociación con la planta hospedante, para después usar el suelo y las raíces como inóculo. Este procedimiento es llamado “cultivo en maceta”. En general, las esporas de un hongo micorrízico VA específico, son primeramente obtenidas del suelo natural mediante varias técnicas de

separación (Ferguson y Woodhead,1982), identificadas, esterilizadas y posteriormente incorporadas al sustrato esterilizado, en el cual después se produce una planta hospedante, como el sorgo o el trébol. A medida que la planta crece, forma micorrizas VA con el hongo deseado, el cual posteriormente se extiende en el medio de crecimiento y produce abundantes esporas. Estas esporas pueden entonces ser extraídas del sustrato para ser usadas como inóculo, o, más comúnmente, todo el sustrato que contiene el micelio, esporas y las raíces (cortadas), puede ser usado como inóculo. El inóculo de hongo micorrizico VA obtenido de "cultivo en maceta", usualmente es incorporado al sustrato mediante uno de dos métodos (Menge y Timmer 1982). En el primer método, el inóculo es mezclado uniformemente con el sustrato, previo al llenado de los contenedores. En el segundo método, el inóculo es colocado en forma de bandas, de 3 a 5 cm bajo la superficie del sustrato. Aunque este método puede resultar ser muy laborioso, se asegura un rápido contacto entre las raíces y el hongo, a medida que las raíces crecen hacia las bandas de inóculo. La información de cuánto inóculo es requerida para asegurar una inoculación exitosa es variable, pero de acuerdo con nuestra experiencia, la inoculación con 200 a 500 esporas por planta, aproximadamente, es un buen inicio para probar la efectividad del inóculo en el vivero. Por ejemplo, Kough et al. (1985), usaron 20 ml de inóculo obtenido mediante "cultivo en maceta" (esporas + suelo + raíces cortadas) para inocular exitosamente plantas de thuja y sequoia producidas en contenedor de 160 cm³; los 20 ml del inóculo contenían entre 400 y 770 esporas y de 30 a 68 % de las piezas de raíces estaban colonizadas. Las micorrizas VA son sensibles a altos niveles de fertilización, de la misma forma que muchos hongos ectomicorrizicos. Por ello, es necesario dar un cuidadoso seguimiento al desarrollo micorrizico bajo diferentes prácticas de manejo, a fin de lograr regímenes compatibles. De la misma forma que al iniciar un programa para la inoculación ectomicorrizica, los encargados de la producción de plantas en el vivero deberán tener objetivos claros para la inoculación con micorrizas VA. Esta inoculación puede mejorar el crecimiento en vivero y reducir los costos por fertilización. Los lotes de plantas inoculadas

también tienen mejor respuesta en campo que aquellos que no fueron inoculados, especialmente cuando la planta es establecida en sitios de condiciones precarias, o donde las micorrizas nativas son escasas (Johnson 1987).

2.4. *Theobroma cacao* L. “cacao”

En el marco de una agricultura sostenible, la utilización de hongos formadores de micorrizas arbusculares debe ser considerada en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, pues además de ser estos microsimbiontes, componentes inseparables de los agroecosistemas, realizan diversas funciones en su asociación con las plantas, pues pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales. Entonces el uso de estos hongos, permite que se incremente la adaptación y que la fertilización sea más eficiente, es por ello que en el caso de los cultivos se podría ahorrar cantidades importantes de fertilizantes minerales e igualmente lograr una absorción de los nutrientes disponibles en el suelo (Benavides 2014).

Es aquí, donde los microorganismos tienen un gran potencial para contribuir a la solución de múltiples problemas de la agricultura, dentro de los cuales, se va a describir a *Theobroma cacao* “cacao” para conocer cada una de las fases de crecimiento de la misma y sobretodo haciendo énfasis en su ciclo inicial, debido a que es el objetivo de estudio.

2.4.1. Descripción morfológica

El cacao (*Theobroma cacao* L.) fue clasificado botánicamente por Carlos Linneo, es un árbol de 4-8 m de alto de la familia Esterculiácea, nativo de las regiones tropicales de América, con semillas que contienen una cantidad significativa de grasas (40-50 %) y polifenoles (alrededor del 10 % del peso del grano seco (Vera et al. 2014).

En la actualidad se siembra el Clon CCN-51, el cual tiene excelente comportamiento agronómico, productivo y tolerancia a las enfermedades; sin

embargo, es cuestionado en su calidad, ya que la industria demanda cacao de origen Nacional (Zambrano et al. 2015).

2.4.2. Distribución mundial y nacional

- **Distribución mundial.** El área de distribución natural de *Theobroma cacao* se extiende desde la región de la cuenca del Amazonas y las Guyanas hasta el sur de México. Después de la llegada de los europeos a América, el cultivo del cacao se ha expandido al Caribe, Asia y África y es hoy día pantropical, principalmente cultivado entre 10° N y 10° S. Los productores más importantes son Costa de Marfil, Ghana e Indonesia (De la Cruz et al. 2015).
- **Distribución en Perú.** La ocurrencia de *Theobroma cacao* en Perú se ha documentado para ocho departamentos (Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Piura y San Martín) entre los 0-500 m s.n.m., aunque es posible que haya más departamentos implicados que tengan el hábitat adecuado, como Ayacucho, Pasco y Ucayali (Bennet 2013).

2.4.3. Variabilidad

La especie *Theobroma cacao* comprende una gran variedad de formas y poblaciones muy diferentes. La especie se origina probablemente en la parte superior del territorio amazónico, incluyendo Perú, pero fue domesticada primero en Mesoamérica (Counet et al. 2014).

Para la caracterización de las formas y cultivares se utilizan hoy en día, aparte de características morfológicas (por ejemplo, flores), características agronómicas (por ejemplo, resistencia a enfermedades, forma del fruto y tamaño del grano) y moleculares (isoenzimas), así como también, frecuentemente, marcadores genéticos (RAPD, AFLP) (David 2015).

Los programas de mejoramiento están, hasta hoy, dirigidos a un aumento de los rendimientos y a una mayor resistencia a plagas; principalmente, se han

aprovechado efectos de heterosis después del cruce de individuos de diferentes linajes genéticos (Motamayor et al. 2013).

Las formas de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario; sin embargo, nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad de la especie (Hall et al. 2014).

Particularmente, el grupo Forastero abarca una alta variabilidad genética, mientras que las formas Criollo son genéticamente más estrechamente definidas. El grupo Trinitario comprende híbridos entre los dos primeros grupos. La mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son híbridos de orígenes mixtos que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica. Un estudio reciente basado en datos moleculares clasifica las formas conocidas en 10 conglomerados principales o grupos (Motamayor et al. 2013).

La delimitación clásica de grupos, ya sin base científica, puede resumirse de la siguiente manera:

- **Criollo.** Las formas Criollo fueron probablemente domesticadas primero por los Mayas hace más de 3000 años. Hasta la mitad del siglo XVIII esta era la forma de cacao más frecuentemente cultivada. El cacao Criollo comprende árboles delgados; los frutos tienen típicamente una cubierta delgada y escultrada y una pigmentación rojiza. Las formas Criollo muestran signos de depresión endogámica y frecuentemente, más bajos rendimientos y mayor susceptibilidad a plagas. En países de habla hispana de América, Criollo es frecuentemente traducido como, “nativo” y comprende no sólo las formas típicas de Criollo, sino además todos los cultivares tradicionales. El cultivo comercial se desarrolla principalmente en las áreas de origen, en Venezuela, México, Nicaragua, Guatemala y Colombia. El 5-10 % de la producción mundial de cacao se origina de las formas Criollo (Ndukwu et al. 2014).

- **Forastero.** Las formas Forastero son originarias de la cuenca superior del Amazonas y comprenden las formas de cacao que no son Criollo ni de origen híbrido. Se caracteriza principalmente por su fruto verde, una cubierta del fruto (pericarpo) gruesa, un mesocarpo fuertemente lignificado, semillas redondeadas y ligeramente aplanadas y cotiledones de color violeta. La mayoría del cacao que se cultiva en Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe pertenece a este grupo. Con cerca del 80 % de la producción mundial de cacao, el grupo de cultivares Forastero es el grupo comercialmente más importante (Rufino 2014).
- **Trinitario.** Estas formas de cacao son de origen híbrido entre formas Criollo y Forastero, las que desde mediados del siglo XVIII han surgido en los territorios de cultivo de cacao. El grupo es correspondientemente muy heterogéneo genéticamente y morfológicamente muy polimorfo, no siendo posible delimitarlo a través de características comunes. Las plantas son normalmente muy robustas con frutos verdes o pigmentados y con semillas violeta claro a violeta oscuro. El 10-15 % de la producción mundial de cacao se origina en las formas Trinitario (Rufino 2014).

2.4.4. Hábitat

El hábitat natural del cacao es el interior de bosques lluviosos (sub-) tropicales sudamericanos. El hábitat comprende zonas subtropicales secas a húmedas, así como zonas tropicales muy secas a húmedas. El cacao se cultiva normalmente a elevaciones bajo los 300 msnm, y en ambientes boscosos especialmente abrigados de Colombia puede alcanzar elevaciones de hasta 900 m s.n.m. (Duguma et al. 2013).

2.4.5. Clima

La temperatura y precipitación son los factores más importantes para el desarrollo óptimo de las plantas de cacao. Las plantas reaccionan en forma muy sensible a la cantidad de agua en el suelo y son susceptibles a la sequedad. El cultivo requiere lluvias uniformemente repartidas a lo largo del año de un total de 1500-2000(-2800) mm. Las temperaturas mínimas medias

son de 18-21 °C, las máximas de 30-32 °C. Las temperaturas mínimas absolutas son de 10 °C, por debajo de las que las plantas reciben daño. Bajo condiciones climáticas como, por ejemplo, las de África occidental, el cacao puede resistir periodos secos de hasta 3 meses (con precipitaciones < 100 mm). Las condiciones climáticas particulares en Ecuador permiten cultivar cacao en lugares incluso con periodos secos de hasta 5-6 meses; sin embargo, las temperaturas son aquí en promedio más bajas, la humedad del aire más alta y el cielo está normalmente nublado durante los periodos secos (Hall et al. 2014).

2.4.6. Crecimiento

Después de 3-4 días de la siembra de las semillas, se ve normalmente la emergencia de raíces primarias o pivotantes blanquecinas, las que después de 15-20 días alcanzan una profundidad de 10-15 cm. Las plántulas muestran primero un crecimiento no ramificado hasta una altura de 1-2 m, antes de que la primera ramificación toma lugar. El tallo principal es corto y se ramifica en verticilos, (“horqueteo”). Los ejes crecen vertical (chupones) u horizontalmente. En plantas juveniles, los nuevos ejes verticales se pueden originar en cualquier posición del eje principal. Normalmente, estos se forman debajo de la primera horqueta. Las plantas adultas forman a veces nuevos, chupones en ejes verticales bien desarrollados. Las plantas de cacao obtenidas de semilla están completamente desarrolladas después de cada 10 años. Las plantas comienzan a florecer y fructificar después de 3-4 años desde la siembra. La cosecha máxima se alcanza después de 6-7 años. Incluso cuando las plantas de cacao pueden alcanzar 20 m de altura en condiciones deficientes de luz, en cultivo alcanzan normalmente sólo 4-8 m de altura. Las hojas se forman en 4-5 fases de despliegue foliar y alcanzan su actividad fotosintética total en 4-5 meses. Después de 1 año, en promedio se caen. El sistema radicular pivotante alcanza una profundidad de 120 - 200 cm de Criollo (Ndukwu et al. 2014).

2.4.7. Biología floral

Las primeras flores aparecen en el tallo de las plantas de cacao uno o dos años después de que el tallo se ha lignificado. Las flores forman inflorescencias que se originan a partir de botones axilares de las hojas caducas. Las plantas adultas de cacao pueden, dependiendo de las condiciones climáticas, producir flores y frutos durante todo el año, cuando no se presentan periodos secos extremos u oscilaciones térmicas muy pronunciadas (Motamayor et al. 2013).

Normalmente, las plantas muestran uno o dos periodos de mayor fructificación. El cacao produce una gran cantidad de flores, de las que sólo un 0.5-5 % son polinizadas y producen frutos. Casi el 60 % de las flores cae después de 48 h sin ser fertilizadas. La apertura de los botones se produce generalmente en la tarde y la antesis finaliza a la mañana siguiente. El cacao tiene polinización cruzada (xenogámico) y posee un complejo sistema de autoincompatibilidad (Ndukwu et al. 2014).

En cultivo, sin embargo, las plantas pueden a veces ser autocompatibles. La polinización es relativamente inespecífica, es realizada por varios insectos, por ejemplo, trips, hormigas, áfidos y mosquitos pequeños. Después de una polinización exitosa, la fructificación se inicia dentro de 36 horas, los pétalos se caen y después de 72 horas los ovarios ya están hinchados. La autoincompatibilidad puede manifestarse incluso unas semanas después de la fructificación, llevando a la caída de los frutos. La duración del desarrollo del fruto es 150-180 días hasta que está totalmente maduro y depende principalmente del cultivar y la procedencia (Motamayor et al. 2013).

2.4.8. Propagación en cacao

- **Propagación generativa.** La forma más fácil y económica de propagar el cacao es por medio de semillas. Semillas maduras tienen, sin embargo, sólo un corto periodo viable y no se deben secar. Una desventaja de la propagación por semillas es la predominancia de la polinización cruzada y la resultante variabilidad de la progenie. Algunos cultivares (Ameloado y

algunas formas de Criollo) son, sin embargo, autocompatibles y pueden ser propagados con identidad varietal a través de semillas (Duguma et al. 2013).

Las semillas se sacan del fruto carnoso, por lo general, inmediatamente después de la cosecha y se siembran en viveros sombreados. Las semillas pueden también ser sembradas directamente en la plantación, en cuyo caso deben ser protegidas con mallas plásticas alrededor. La siembra en vivero se realiza en sustratos de siembra de turba y perlita, o en humus. La siembra se realiza con el hilum de las semillas hacia abajo, en una profundidad de ca. 10-20 mm. Las macetas de siembra deben ser de al menos 5 x 5 x 12 cm. También se puede sembrar en bolsas plásticas (20 x 12 cm con hoyos). La germinación ocurre generalmente en pocos días, dependiendo de la temperatura. La tasa de germinación de semillas frescas es de casi 90 %. Una disponibilidad de agua suficiente, sombra y protección del viento son importantes para el crecimiento de las plántulas. Además, las plantas son sensibles a la sobre fertilización. El primer trasplante se realiza normalmente cuando las plántulas han alcanzado un tamaño de 0.6 m. Las plantas juveniles pueden mantenerse en vivero hasta por 12 meses en macetas de tamaño adecuado, antes de ser llevadas a la plantación; sin embargo, la plantación toma lugar, generalmente, 4-5 meses después de la siembra (Motamayor et al. 2013).

- **Propagación vegetativa.** El cacao puede ser propagado con identidad varietal, de manera vegetativa, vía injerto, sobre un patrón apropiado, esquejes, acodos o también mediante cultivo de tejidos (Ndukwu et al. 2014).

Las plantas de cacao que se han propagados mediante vástagos o estacas de tallos horizontales se desarrollan en árboles profusamente ramificados, mientras que esquejes obtenidos de ejes verticales muestran, por el contrario, un crecimiento similar al de plantas propagadas por semilla (Hall et al. 2014).

Para la propagación por esquejes se utilizan esquejes de tallos con 2-5 hojas o dos yemas. Para esquejes de hoja, la hoja se divide por la mitad y la estaca se hace enraizar bajo malla plástica. Para acodos se forma una nueva planta de uno de los ejes de la planta. Para ellos se desprende un trozo de la corteza, y ese lugar se envuelve en plástico con aserrín, turba o un medio similar. La parte envuelta enraíza lentamente. Después del enraizamiento se separa el eje de la planta madre y se planta. El método es bastante laborioso, pero es muy simple de realizar y no necesita, en comparación con el injerto, un cultivo de plantas juveniles. También se han desarrollado métodos para el cultivo de tejido de cacao, pero hasta ahora no se han empleado de manera masiva. Especialmente importante es la propagación por injertos en patrones adecuados: en injertos de yema se extrae cuidadosamente una yema con un trozo de corteza (> 2.5 x 0.5 cm), normalmente de un chupón (eje vertical) y se coloca en otra planta. Para evitar la pérdida de humedad, la yema se fija a la planta con rafia y cinta de injerto y el lugar del injerto se sella con cera de injerto (Motamayor et al. 2013).

Como patrón se usan normalmente plántulas de 60-90 días de edad. Después de cerca de 3 semanas, cuando el "ojo" se ha injertado completamente, se remueve la cinta con la cera y se poda completamente la parte antigua del patrón por arriba de la posición del injerto. Este método no puede ser utilizado cuando el árbol sobre el que se propagará el injerto está infectado con el Virus CSS u otra enfermedad sistémica. Injertos de hendidura superior también se pueden practicar exitosamente en árboles adultos. Del árbol a injertar se extraen las ramas más robustas, en los cantos cortados se hace una hendidura lisa y los vástagos de los árboles a ser injertados se disponen en hendidura de modo que ambos cambium es entren en contacto. La posición del injerto es cubierta con cinta de injerto y malla plástica. Con este método se alcanzan tasas de éxito de cerca del 90 %. En injertos de hendidura superior en una planta adulta se pueden producir los primeros frutos en un plazo de dos años (Días dos Santos et al. 2015).

2.4.9. Formas de cultivo

El cacao puede ser cultivado tanto como monocultivo, así como en plantaciones forestales y en cultivos frutales intercalados. Tradicionalmente, el cacao se cultiva a la sombra de bosques raleados o en remanentes de bosque y se mantiene más o menos la estructura natural del bosque. La composición botánica de los árboles de sombra es, por lo tanto, compleja y diferente en cada región. Cultivos intercalados se practican, por ejemplo, en coco, caucho, nueces de areca, canela y plantaciones frutales de todo el mundo (Hebbar et al. 2015).

También se practica el cultivo en combinación con especies arbóreas madereras y con leguminosas arbóreas. En parte, se utilizan en estas modalidades de cultivo más de tres especies de plantas en un mismo cultivo. Se asume hoy en día que el cultivo intercalado y el manejo forestal, más allá de la función de sombreado, disminuye la aparición de enfermedades del cacao, mantiene la fertilidad natural del sistema de producción, compensa los periodos secos y fomenta el mantenimiento de la biodiversidad (Somarriba y Berr 2015).

El cultivo de cacao en monocultivos, es decir, cultivos intensivos sin sombreado, se realiza especialmente en África occidental sobre bosques talados o terrenos de barbecho. La instalación de las plantaciones se efectúa normalmente con sombreado temporal con, por ejemplo, matas de plátano o leguminosas diversas (por ejemplo, *Gliricidia sepium*, *Inga* spp., *Albizia* spp.). El cacao es un árbol tolerante a la sombra, pero se cultiva tradicionalmente bajo árboles de sombra, algunos estudios muestran que un sombreado muy intenso (árboles de sombra y autosombreado) no sólo disminuye el rendimiento, sino que también favorece la aparición de enfermedades (Zuidema et al. 2015).

La plantación se realiza al comienzo del periodo de lluvias, con suficiente humedad en el suelo. Protección del viento y sombreado son condiciones esenciales para el establecimiento de la plantación. Matas de plátano se plantan frecuentemente para el sombreado en los primeros años y para la

generación de ingresos durante la fase de establecimiento de la plantación. La distancia entre plantas de cacao depende fuertemente del tipo de cultivo y oscila entre 2.5 x 2.5 m y 5 x 5 m. La densidad de plantas corresponde por lo tanto a 750-1500 plantas por hectárea (Hall et al. 2014).

En cultivos mixtos con otras especies, la densidad de plantas puede llegar a sólo 400-600 plantas por hectárea. En Asia el promedio es de casi 1000 plantas/ha. Los cuidados culturales del cacao comprenden, aparte de la fertilización y la remoción de malezas, una poda regular de los árboles de cacao. Para la fertilización se emplean frecuentemente fertilizantes comerciales (NPK) incluyendo micronutrientes (Fe, Zn, B) en una cantidad aproximada de 500 kg/ha/año. La plantación también se apoya con fertilizantes orgánicos (estiércol). El uso prolongado de fertilizantes químicos sintéticos lleva, sin embargo, a un empobrecimiento del suelo y a un empeoramiento de la estructura edáfica, que puede prevenirse por medio de la utilización de fertilizantes orgánicos. En relación con las podas, se remueven los ejes más delgados y los que se han secado (Vos et al. 2013).

La poda también determina el tamaño de las plantas de cacao y debe adaptarse a las prácticas locales de manejo y cosecha. La remoción de ejes verticales no productivos (chupones), que normalmente se originan por debajo de la primera ramificación (horqueta), favorece la formación de frutos y facilita el control de plagas. También los ejes entrecruzados deben removerse para asegurar una entrada de luz uniforme. La remoción de malezas se realiza manualmente, con herbicidas o se cortan y son posteriormente utilizadas para el acolchado o "mulching" del cacao (38). Las malezas son particularmente importantes en los primeros años, hasta que las copas forman una cobertura continua (Motamayor et al. 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de estudio

- **Ubicación geográfica y política**

La investigación se realizó en el vivero de la Municipalidad Provincial de Jaén “Manuela Díaz Estela” ubicado en el distrito y provincia de Jaén, región Cajamarca.



Figura 1. Ubicación del campo experimental

- **Clima**

El área de estudio presenta un clima seco con una temperatura media anual que oscila entre 24 a 26 °C, con máximas que alcanzan los 30 °C y mínimas

que están alrededor de 20 a 21 °C. La temperatura promedio se mantiene a lo largo del año. La precipitación promedio anual varía desde 350 mm hasta 1 000 mm, y se presenta un período seco, de menor precipitación, entre los meses de mayo a octubre, y de mayor precipitación entre octubre y abril. La zona de estudio se encuentra dentro de la zona de vida bosque muy seco Tropical (bms-T) y monte espinoso Tropical (mte-T) (Marcelo et al. 2010).

- **Ecología**

La zona de estudio se encuentra dentro de la zona de vida bosque muy seco Tropical (bms- T), está ocupada por especies perennifolias y caducifolias de porte arbóreo y arbustivo (Peisa 2004).

- **Hidrología**

El área de estudio se encuentra dentro del ámbito de la cuenca Amojú, la cual está disectada por el cauce del río del mismo nombre, fuente primaria proveedora de agua para riego y para satisfacer las necesidades de las poblaciones asentadas en el valle de Jaén. El recorrido de las aguas del río Amojú es de norte a sur, y aguas abajo, confluyen en la margen izquierda del río Marañón, que es su único colector (Marcelo et al. 2010).

3.2. Materiales

- **Biológico.** Micorrizas arbusculares nativas aisladas provenientes del Área de Conservación Municipal Bosque de Huamantanga y semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- **Laboratorio.** Microscopio, refrigeradora, autoclave, embudos de vidrio, matraz, placas Petri, mechero de bunsen, tubos de ensayo, balanza analítica, estufa, tamiz, vaso de precipitación, probetas, pipetas, baguetas, láminas y laminillas.
- **Reactivos.** Caldo peptonado, agua destilada, ácido clorhídrico, azul de tripano, agua oxigenada y agar nutritivo.
- **Equipo de gabinete.** Impresora y computadora portátil.

- **Informático.** Microsoft Word y Microsoft Excel 2013, software estadístico Minitab versión 2015 y SAS versión 5.0.

3.3. Metodología

3.3.1. Trabajo de laboratorio y campo (vivero)

a. Producción de las plántulas de cacao

Preparación y obtención del sustrato:

Se seleccionó una parcela cerca de la Universidad Alas Peruanas de propiedad de la Sra. Laura Iglesia Díaz, en el cual no se ha efectuado ningún tipo de producción agrícola, y se procedió a tomar una muestra para su evaluación de presencia de micorrizas arbusculares nativas a través de la técnica de tamizado y decantación descrita por Gerderman y Nicholson (1963) (Foto 4, Anexo 3). Al verificar la inexistencia de micorrizas arbusculares nativas en el suelo, se obtuvo 1 m³ de este suelo a través de la trituración y tamizado del mismo. Este volumen de suelo fue utilizado para la producción de los plantones de cacao, previa desinfección con solución de hipoclorito de sodio al 2 %, ventilación y remoción por tres días. Las bolsas empleadas para el llenado del sustrato preparado fueron de medida 10" * 12".

Preparación y obtención de las semillas:

Se germinaron semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedentes del banco de germoplasma de cacao del campo experimental de la Agencia Agraria Jaén, ubicada en la Estación Experimental de Yanuyacu.

Al abrir las bayas de cacao se descartó las semillas de ambos extremos en un promedio de 5 a 10 semillas de cada lado, y se seleccionó las semillas ubicadas en centro de la baya con la finalidad de garantizar la producción.

Una vez obtenidas las semillas de cacao fueron vertidas en un depósito con agua y arena para eliminar la miel. La arena fue utilizada como un medio para agilizar el proceso (Fotos 1 y 2, Anexo 3). Posteriormente se procedió a enjuagar las semillas, dejándolas en remojo por tres días en agua limpia, como tratamiento de germinación. Al verificar que el 90 % de semillas han germinado, fueron utilizadas para la siembra directa en bolsa.

b. Tratamientos y métodos en estudio

Testigo: Sin ningún tipo de tratamiento, identificado con el código **T**.

Tratamiento 1: se empleó 1 cepa (denominada MAN7), identificado con el código **T1**.

Tratamiento 2: se empleó 3 cepas (denominadas MAN3, MAN8 y MAN9, identificado con el código **T2**.

Métodos de inoculación en estudio

Directo al sustrato: consiste en inyectar inóculo MAN con una jeringa en directriz al sustrato, identificado con el código **D**.

Sumergimiento de raíz: consiste sumergir la raíz de la planta en caldo peptonado de MAN, identificado con el código **S**.

c. Aislamiento de micorrizas arbusculares nativas según tratamientos y métodos de aplicación

Las micorrizas arbusculares nativas fueron donadas por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca- Filial Jaén, las cuales fueron aisladas del Área de Conservación Municipal Bosque de Huamantanga. Para la preparación del inóculo se hizo lo siguiente.

Se preparó caldo peptonado, al contar con la solución, se aisló el inóculo de micorriza en los frascos según tratamientos a aplicados: T1

(1 cepa) y T2 (3 cepas), se mantuvo en refrigeración y constante movimiento por 24 horas, con la finalidad de multiplicar las esporas de la micorriza arbuscular nativa utilizada (Foto 3, Anexo 3).

Luego de preparada la solución conteniendo las micorrizas arbusculares nativas, se procedió a aplicar a las plántulas de cacao según los tratamientos y métodos de inoculación en estudio: directo al sustrato y sumergimiento de raíz.

El método de inoculación directa al sustrato consistió en aplicar 10 ml de inóculo de micorriza arbuscular nativa a plántulas de cacao de 12 días de germinación, empleando una jeringa se vertió el inóculo directo al sustrato, según tratamientos.

El método de sumergimiento consistió en sumergir las raíces de plántulas de cacao en solución, tratamiento 1 (1 cepa) y tratamiento 2 (3 cepas), tomando en cuenta que el volumen de solución de caldo peptonado por plántula es de 10 ml y con un tiempo de reposo de media hora, para permitir que el inóculo de micorriza arbuscular nativa se adhiera a la raíz. Finalmente fueron trasplantadas en sus respectivas bolsas de las cuales fueron extraídas.

d. Evaluación de colonización de micorrizas arbusculares nativas

Se seleccionó al azar 5 plantas por tratamiento y testigo, siendo éstas las muestras para la evaluación de la colonización de las micorrizas arbusculares nativas en la raíz de la planta. Para realizar la evaluación transcurrieron 2 meses después de la siembra.

Se extrajo las plántulas de cacao de la bolsa en las cuales fueron sembradas, y se eliminó todo el sustrato de la raíz a través del lavado en agua corriente. Después se realizó la medida de altura, cantidad de hojas, tamaño de raíz y cantidad de raíces secundarias.

Para realizar la evaluación de colonización de las micorrizas arbusculares nativas se utilizó la técnica de Philips y Hayman (1970) “Técnica de tinción y recuento de raíces micorrizas”, para ello fueron utilizadas muestras de raíz en un aproximado de 1 centímetro.

3.3.2. Diseño experimental

A partir de un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) el experimento consistirá en 2 tratamientos, 2 métodos y cuatro repeticiones, multiplicando un total de 10 unidades experimentales con 40 individuos.

Tabla 1. DCA aplicado al experimento

TRATAMIENTO	DIRECTA AL SUSTRATO				SUMERGIMIENTO DE RAÍZ			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
T1	T1D-1	T1D-2	T1D-3	T1D-4	T1S-1	T1S-2	T1S-3	T1S-4
T2	T2D-1	T2D-2	T2D-3	T2D-4	T2S-1	T2S-2	T2S-3	T2S-4

3.3.3. Evaluación

- **Crecimiento**

La evaluación del efecto se hizo a partir de mediciones a la plántula de cacao con variables como altura total (ALT), longitud de la raíz principal (LRAIZ) y número de raíces secundarias (NRAÍZ).

- **Colonización**

Se cuantificó el porcentaje de colonización con la técnica de Phillips y Hayman (1970), observando al microscopio óptico en 10 segmentos de raíz.

3.3.4. Análisis estadístico

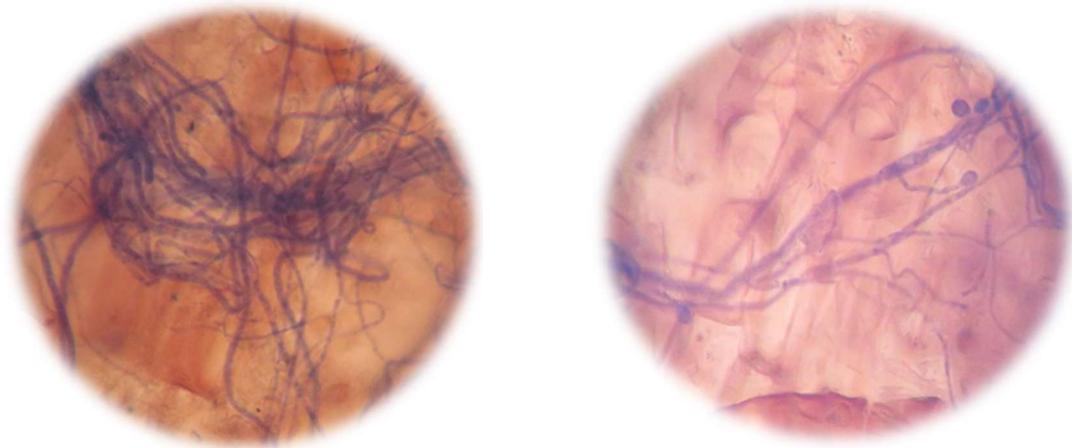
El análisis estadístico se realizará mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y comparaciones de medias de Tukey con $\alpha = 0,05$ utilizando el programa Minitab versión 2015 y SAS versión 5.0. (SAS 1985).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Colonización de las micorrizas arbusculares nativas en raíces

La forma de aplicación que logró mejor colonización de las micorrizas arbusculares nativas como biofertilizante en plántulas de cacao fue a través del método de sumergimiento de raíz empleando 3 cepas, obteniéndose 100 % de colonización en todas las raíces y segmentos, y mayor porcentaje en los campos evaluados.

Restrepo, Jaramillo y Cotes (2009) también encontraron resultados favorables al evaluar el efecto de dos microorganismos *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens* junto con un consorcio de micorrizas (producto comercial de micorrizas "Mikorhyze lote C7 conformado por *Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* y *Entrophospora colombiana*, en combinación con viruta de pino sobre el control de sarna polvosa (*Spongospora subterranea*) en *Solanum tuberosum*, concluyendo que el tratamiento en el cual se utilizó sumergimiento obtuvo mejores resultados.



Figuras 2 y 3. Vistas microscópicas de colonización, método de sumergimiento (40 X)

En las figuras 2 y 3 se aprecian la vista completa de la colonización de las micorrizas arbusculares nativas usadas como biofertilizantes de *Theobroma*

cacao L. a través del método de sumergimiento usando 3 cepas, observándose presencia de hifas del micelio.

4.2. Porcentaje de colonización de las micorrizas arbusculares nativas en raíces

Se determinó el porcentaje de raíces colonizadas al que se denominó extensión de la colonización y el porcentaje de colonización en función al número de colonias encontradas. Los resultados se muestran en las siguientes tablas y figuras.

4.2.1. Porcentaje de extensión de la colonización de las micorrizas arbusculares nativas en las raíces de los plantones de cacao

El porcentaje de raíces colonizadas según los tratamientos realizados se muestran en la tabla 2 y figura 4:

Tabla 2. Porcentaje de extensión de colonización

N°	Tratamiento – Método		N° raíces evaluadas **	N° raíces infectadas *	Raíces infectadas (%)
	Código	Descripción			
1	T1D	1 Cepa - directo al sustrato	50	49	98.00
2	T1S	1 Cepa - sumergimiento	50	50	100.00
3	T2D	3 Cepas - directo al sustrato	50	49	98.00
4	T2S	3 Cepas – sumergimiento	50	50	100.00
5	T	Testigo	50	0	0.00

* Según PHILLIPS y HAYMAN (1970)

** Segmentos evaluados de raíces (Anexo 1)

En la tabla 2, se observa que en los dos tratamientos ya sea a través de inoculación por sumergimiento y directo al sustrato se ha logrado la infección de casi la totalidad de las raíces, notando una ligera inclinación a través de sumergimiento, lo cual señala una excelente colonización micorrízica nativa en la especie de cacao; situación contraria señala Ballesteros et al. (2004), quien al cuantificar el porcentaje de infección de raíces obtuvo 8 % para *Theobroma cacao* presentando los valores más bajos en su investigación.



Figura 4. Porcentaje de extensión de colonización

En la figura 4, se observa una similitud entre los tratamientos utilizados pero una gran superioridad de los tratamientos frente al testigo. Infante (2013), también señala que el nivel de infección micorrízica en árboles de pijuayo en Yurimaguas, Perú fue de 46 % en suelos de textura areno franca y 80 % en textura franco-arenosa.

A los resultados que se observan en la tabla 2 y figura 4 se hizo un análisis de varianza para determinar la existencia de una diferencia estadística significativa de las medias entre los tratamientos y métodos, descartando el testigo (Tabla 3):

Tabla 3. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.2	3	0.06667	0.66667	0.58467	3.23887
Dentro de los grupos	1.6	16	0.1			
Total	1.8	19				

$$\alpha = 0.05$$

La tabla 3, muestra el análisis de varianza, el cual confirma que no existe significancia estadística entre las diferencias de las medias de los tratamientos y métodos, por lo que se puede afirmar que la inoculación directa o por sumergimiento son métodos que ejercen resultados similares.

4.2.2. Porcentaje de colonización de las micorrizas arbusculares nativas en las raíces de los plantones de cacao

El porcentaje de colonias contabilizadas de micorrizas arbusculares nativas en las raíces de plantones de cacao según tratamiento (Tabla 4):

Tabla 4. Porcentaje de colonización obtenido

N°	Tratamiento - método		N° Campos evaluadas *	N° Campos infectadas **	Campos infectadas (%)
	Código	Descripción			
1	T1D	1 cepa - directa al sustrato	800	390	48.75
2	T1S	1 cepa - sumergimiento	800	656	82.00
3	T2D	3 cepas - directa al sustrato	800	532	66.50
4	T2S	3 cepas - sumergimiento	800	642	80.25
5	T0	Testigo	800	0	0.00

** Número de campos evaluados con infección

* Campos de segmentos evaluados de raíces (Anexo 1)

En la tabla 4 se muestra el resumen de los resultados de la evaluación de colonización por plantón, segmento y por campo evaluado (Anexo 1), se señalan 800 campos evaluados, en base 5 plantas por tratamiento y método, los cuales se han obtenido muestras de 10 raicillas de 1 cm por planta y habiendo evaluado 16 campos por raicilla ($5P \times 10$ raicillas = 50×16 campos = 800).

Además, se muestra que el porcentaje de campos infectados es mayor en el T1S y T2S, reiterando que el método de sumergimiento de raíz obtiene la mayor cantidad de campos infectados así como en la tabla 3 se señala el mayor porcentaje de raíces infectadas, pero para especies de nogal sucede presenta una variación del porcentaje de colonización que fluctúa desde un 13 a 32 % durante los seis meses de muestreo, según indica Muñoz et al. (2009), a través de la identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. Además, Chacón y Guerra (2012) observaron porcentajes de colonización micorrízica superiores al 70 % en *Brachiaria decumbens* "pasto amargo", evaluadas dentro de una plantación de palma aceitera.

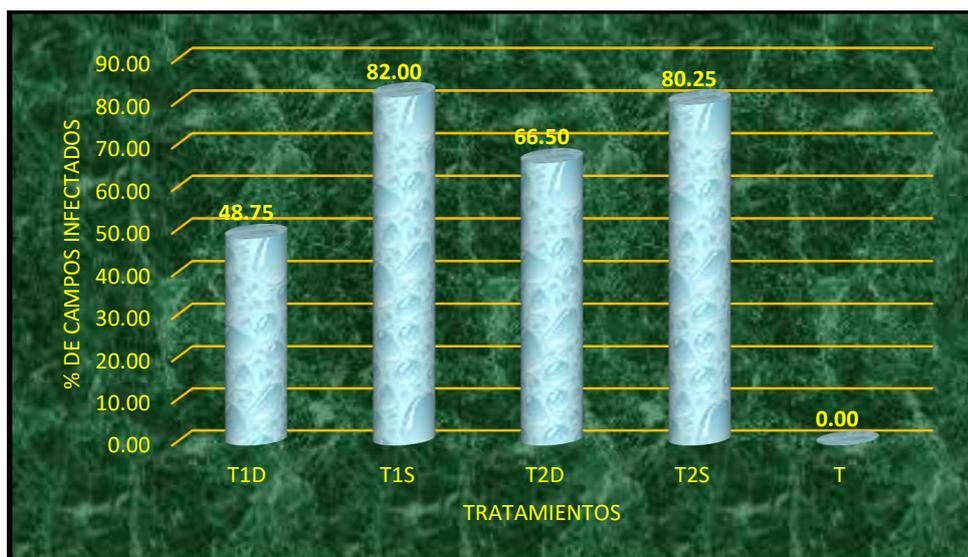


Figura 5. Porcentaje de colonización obtenido

En la figura 5, es fácil observar que los tratamientos empleados a través de método de sumergimiento de raíz sobresalen frente al método de inoculación directa, sobretodo es muy evidente notar que el mínimo porcentaje de colonias contabilizadas de micorrizas en las raíces de plántulas de cacao se observa en el testigo.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias de los métodos empleados donde se aplicó micorrizas arbusculares nativas, descontándose al testigo.

Tabla 5. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8100	3	2700	9.26482	0.00087	3.23887
Dentro de los grupos	4662.8	16	291.425			
Total	12762.8	19				

$\alpha = 0.05$

La tabla 5, muestra el análisis de varianza para los métodos respecto al porcentaje de colonización obtenido, confirmando que si hay significancia estadística entre las diferencias de las medias de los métodos, por lo que se puede afirmar que el método de sumergimiento de raíz es el más adecuado

para obtener el mayor porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares nativas en cacao, lo cual coincide con Monroy et al. (2013), quien reportó una colonización de 47 % a través de inoculación y 94 % para sumergimiento en gramíneas y leguminosas.

4.3. Efecto del tipo de inoculación de micorrizas arbusculares nativas en el crecimiento de plántones de cacao

4.3.1. Efecto en el crecimiento en altura

El efecto de la biofertilización generado por las micorrizas arbusculares nativas en el crecimiento de altura del plánton de cacao se muestra en la tabla 6 y figura 6:

Tabla 6. Crecimiento en altura de los plántones de cacao

N°	TRATAMIENTO - METODO		N° DE PLANTAS	PROMEDIO DE ALTURA (cm)
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	5	24.04
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	5	22.48
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	5	25.02
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	5	21.9
5	T	TESTIGO	5	22.64

En la tabla 6, se muestra el promedio de los resultados de la biofertilización en los plántones de cacao (Anexo 2), el cual el método que ha influenciado en el crecimiento en altura de los plántones de cacao de mayor a menor de la siguiente manera: T2D, T1D, T1S, T, T2S, al analizar este orden podemos señalar que el testigo ha obtenido un promedio en altura incluso mayor que uno de los tratamientos de sumergimiento, el cual es uno de los más adecuados en el porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares nativas en las raíces, lo que a su vez indica que las micorrizas arbusculares nativas puede tener importancia en la colonización de raíces más no influencia en el crecimiento en altura.

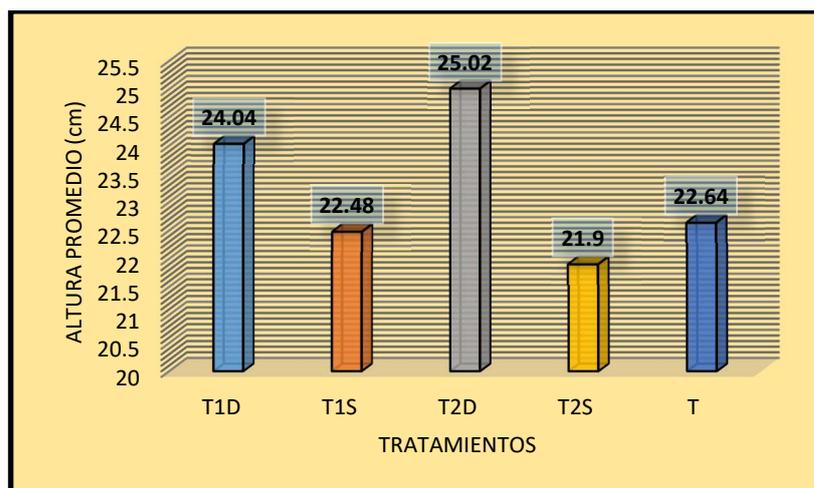


Figura 6. Crecimiento en altura de los plantones de cacao

En la figura 6, el crecimiento en altura se ve favorecido según el tratamiento y método T2D, resultados similares señala Reyes (1998), al evaluar la actividad de las micorrizas en condiciones de vivero, donde evaluó el efecto de *Glomus* spp., bacterias, vermicomposta y un testigo en el desarrollo de plántulas de aguacate, investigación en la que indicó que la altura y diámetro del tallo se favorecieron con los tratamientos de vermicomposta y la micorriza *Glomus*.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias. Esto se muestra en la tabla 7:

Tabla 7. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	36.6696	4	9.1674	1.43200	0.25999	2.86608
Dentro de los grupos	128.036	20	6.4018			
Total	164.7056	24				

$\alpha = 0.05$

En la tabla 7, se observa que no hay significancia estadística para las medias de los tratamientos y métodos respecto al crecimiento en altura de los plantones de cacao, resultado similar al obtenido por Barrera et al. (1999), quien evaluó el efecto de la aplicación de micorrizas y de inóculos en

el desarrollo de plántulas de chachafruto (*Erythrina edulis*), y observó que en relación con la altura, los valores para todos los tratamientos no tuvieron variación significativa con respecto al testigo (suelo cafetero).

4.3.2. Efecto en el número de hojas producidas

El efecto en la producción de hojas de la biofertilización generado por las micorrizas arbusculares nativas en los plántones de cacao se muestra en la tabla 8 y figura 7.

Tabla 8. Producción de número de hojas de los plántones de cacao

N°	TRATAMIENTO – MÉTODO		N° DE PLANTAS	PROMEDIO N° HOJAS
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	5	7.6
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	5	7.8
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	5	8.6
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	5	8.8
5	T	TESTIGO	5	6.8

En la tabla 8 y figura 7, se muestra la producción del número de hojas de los plántones de cacao de acuerdo a la biofertilización de micorrizas arbusculares nativas en el cual se logra demostrar que el promedio de hojas es similar entre los tratamientos.

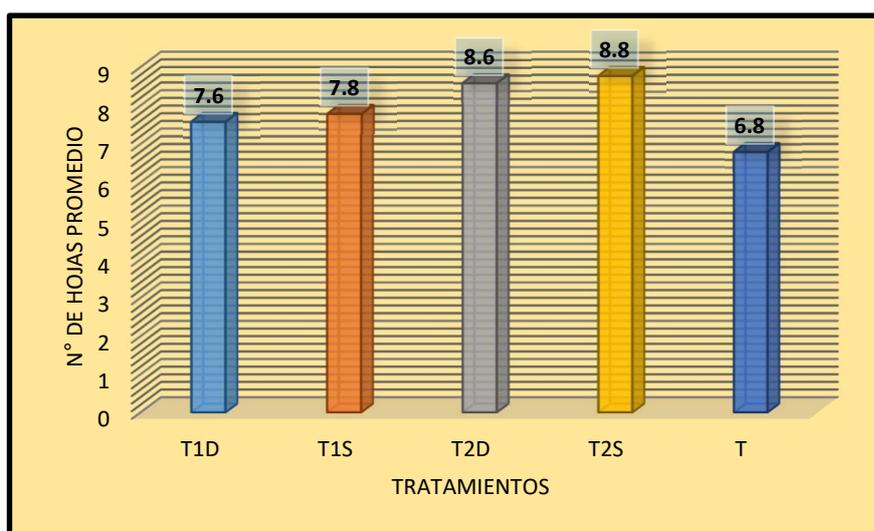


Figura 7. Producción de número de hojas de los plántones de cacao

De acuerdo a la figura 7, se señala que el T2S, presenta una ligera superioridad en cuanto a la producción del número de hojas en plántulas de cacao, así mismo en chile ancho inoculado con *Glomus intraradices*, en suelo franco arenoso, con bajo contenido de fósforo, se obtuvo incremento en el número de hojas, área foliar, frutos y biomasa de raíces según señala (Aguilera et al. 2017). Al mismo tiempo Bashan et al. (2016), señala que entre los microorganismos más importantes que proporcionan fósforo a las plantas están los hongos micorrízicos que presentan asociación simbiótica con las plantas como es *Glomus intraradices*.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias. Esto se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 9. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	15.44	4	3.86	1.78704	0.17107	2.86608
Dentro de los grupos	43.2	20	2.16			
Total	58.64	24				

$\alpha = 0.05$

En la tabla 9, se demuestra lo que se indica en la tabla 8 y figura 7 (resultados similares para todos los tratamientos), por lo que el análisis de varianza confirma lo publicado por Reyes (1998), al indicar que la vermicomposta y la multicepa *Glomus* spp., en plántulas de aguacate, promovieron mayor número de hojas, mayor superficie de área foliar y peso seco de la parte aérea con respecto al testigo, pero no existió significancia estadística según su análisis de varianza.

4.3.3. Efecto en el crecimiento de la raíz

El efecto de la biofertilización generado por las micorrizas arbusculares nativas en el crecimiento de la raíz de los plantones de cacao, se muestran en la tabla 10 y figura 8:

Tabla 10. Crecimiento de la raíz de los plantones de cacao

N°	TRATAMIENTO – MÉTODO		N° DE PLANTAS	LONGITUD PROMEDIO DE RAIZ (cm)
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	5	27.96
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	5	25.46
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	5	27.64
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	5	20.58
5	T	TESTIGO	5	18.52

En la tabla 10, se aprecia que el tratamiento T1D y T2D, han logrado mayor crecimiento en longitud de la raíz, sin embargo también se deduce de éstos resultados (directo al sustrato y sumergimiento) que la diferencia no es muy distante entre los mismos, pero en este proceso se acepta que el papel clave de las micorrizas radica en que las hifas del hongo extienden el campo de absorción de la raíz más allá de la zona normal de agotamiento radicular (en 1-5 mm), y permiten a la raíz incrementar su superficie de absorción y explorar un volumen de suelo mayor del que lo hacen las raíces no micorrizadas, concretamente hasta 7 cm de la superficie radicular, señalado por Molina et al. (2005).

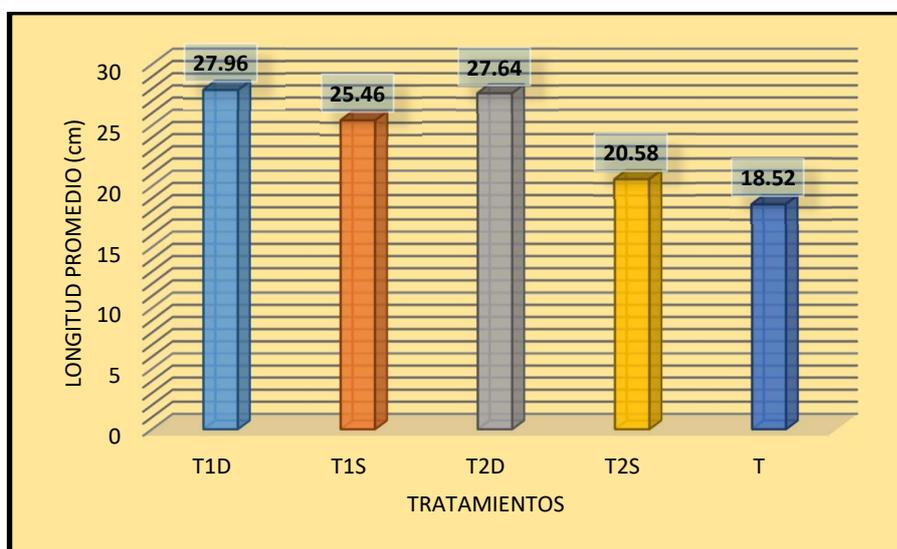


Figura 8. Crecimiento de la raíz de los plantones de cacao

En la figura 8, se observa que entre el tratamiento T1D frente al T, hay una diferencia de 9.44 cm, por lo que se pone de manifiesto lo señalado por Molina et al. (2005), quien indica que las raíces micorrizadas absorben más

eficazmente los nutrientes (fosfatos) que las no micorrizadas y han calculado que en un centímetro de raíz micorrizada posee unos 80 cm de hifas externas. Sin embargo, Miyasaka (2003), en estudios realizados concluyó, que la absorción más eficiente por las raíces micorrizadas se debe fundamentalmente a una aceleración de la disociación del fosfato insoluble.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	363.9224	4	90.98060	3.31144	0.03094	2.86608
Dentro de los grupos	549.492	20	27.4746			
Total	913.4144	24				

$\alpha = 0.05$

El análisis de varianza admite una significancia entre las medias de los métodos respecto al crecimiento de la raíz de los plántones de cacao. Además de las explicaciones mencionadas, Alarcón y Ferrera (1996) reportan que el beneficio no sólo se debe al establecimiento de los hongos en el sistema radical, sino que también intervienen diversos factores edáficos y ambientales e incluso de manejo de los agroecosistemas, que interactúan potencializando la capacidad del hongo para compensar o superar las funciones de la raíz en la absorción de nutrimentos y agua.

4.3.4. Efecto en el número de raíces secundarias

El efecto que produjo la biofertilización de las micorrizas arbusculares nativas en el número de raíces secundarias en los plántones de cacao se muestra a continuación:

Tabla 12. Número de raíces secundarias de los plantones de cacao

N°	TRATAMIENTO - MÉTODO		N° DE PLANTAS	PROMEDIO RAÍCES SECUNDARIAS
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	5	100.4
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	5	242.2
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	5	174.8
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	5	224.2
5	T	TESTIGO	5	73.2

De la tabla 12, podemos sostener lo que señala Miyasaka (2003), quien presenta la longitud, el diámetro, el área de superficie y la densidad de vellosidades de la raíz, como parámetros importantes influenciados por las micorrizas para aumentar los nutrientes tomados por la planta (Anexo 2).

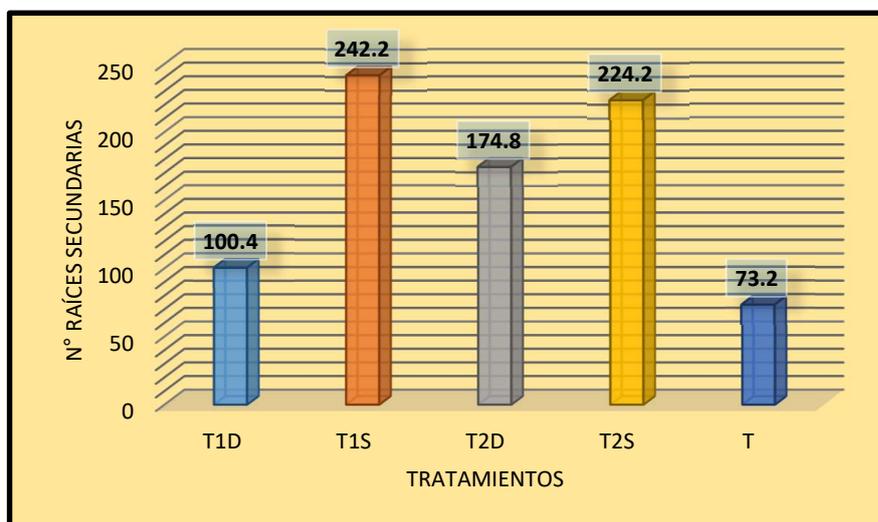


Figura 9. Número de raíces secundarias de los plantones de cacao

En la tabla 12 y figura 9 se puede apreciar que el crecimiento de raíces secundarias es más evidente en el método de sumergimiento como en el tratamiento 1 y 2, por lo que se puede confirmar que la presencia de micorrizas arbusculares nativas incrementan el crecimiento de las raíces secundarias, tal y como señala Rajan et al. (2000), al publicar que las plantas micorrizadas crecen mejor que las no micorrizadas en suelos infértiles, por producir un incremento en la nutrición mineral a través de las hifas, quienes ayudan a explorar un mayor volumen de suelo que los pelos radiculares de las mismas plantas.

Así mismo Rojas y Ortuño (2007), indican que las plantas inoculados con micorriza en combinación con humus de lombriz y gallinaza (T3, T4, T5) evaluados en el cultivo de cebolla, permitieron la obtención de altos rendimientos y un mayor desarrollo de la planta (mayor altura de planta, mayor diámetro de bulbo, mayor desarrollo radical, mayor vigor y mayor sanidad de las plantas) en ausencia de fertilizantes químicos.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza para los tratamientos

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	110700.56	4	27675.14	22.4250	0.00000037	2.8661
Dentro de los grupos	24682.4	20	1234.12			
Total	135382.96	24				

$\alpha = 0.05$

En la tabla 13, muestra la no significancia estadística entre las medias de los tratamientos, indicando que los tratamientos son similares estadísticamente y ninguno es superior sobre el otro respecto al incremento de raíces secundarias, lo mismo señala Rojas y Ortuño (2007) al no encontrar diferencias significativas al evaluar micorrizas arbusculares en interacción con abonos orgánicos como coadyuvantes del crecimiento en la producción hortícola.

4.3.5. Efecto en la producción de biomasa

a. Efecto en la producción de biomasa aérea

El efecto que generó la biofertilización de las micorrizas arbusculares nativas inoculadas a las raíces de los plantones de cacao en la biomasa aérea que estuvo conformada tanto por hojas como por tallos del plantón fue cuantificado y se muestra en la tabla 14 y figura 10:

Tabla 14. Biomasa aérea producida por los plántones de cacao

N°	TRATAMIENTO – MÉTODO		PESO HUMEDO (g)	PESO SECO (g)
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	20.33	5.17
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	17.29	4.78
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	21.73	5.7
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	20.55	5.61
5	T	TESTIGO	6.58	1.63

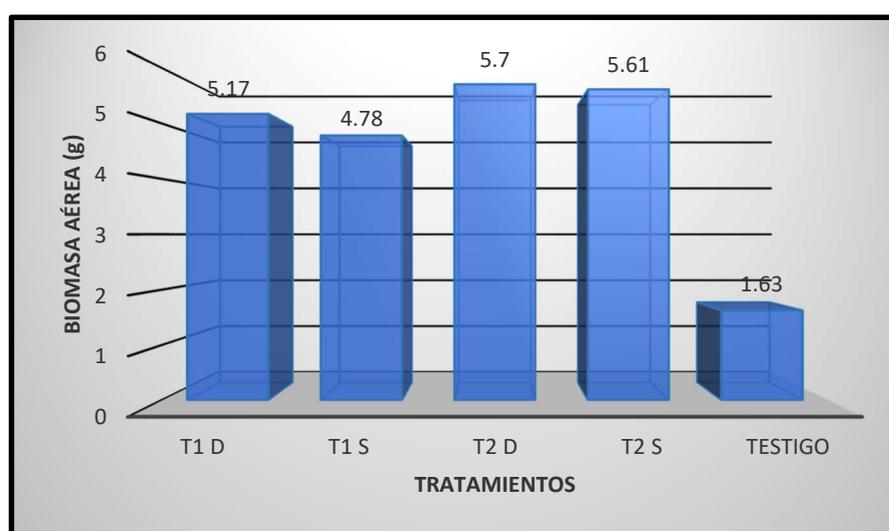


Figura 10. Biomasa aérea producida por los plántones de cacao

En la tabla 14 y figura 10, muestra que la biomasa aérea producida se encuentra en un rango de 4.7 g a 5.7 g siendo todos superiores en comparación al testigo, coincidiendo con Benedetto y Tognetti (2016) donde el crecimiento de una planta se representa gráficamente como un aumento del peso seco en función del tiempo. Este crecimiento como todo proceso fisiológico sufre modificaciones debido a los factores ambientales y depende directamente de la energía liberada durante la respiración. El área foliar puede dar una idea del crecimiento de la planta o se puede relacionar con la acumulación de materia seca. Por tal razón, la micorrización es beneficiosa al estimular el crecimiento inicial de muchas especies de plantas (Pérez et al. 2011).

Resultados diferentes inferiores fueron los encontrados por Usuga et al. (2008), quienes reportaron una acumulación de biomasa aérea de 3.243 g en plantas de banano como efecto de la micorrización y la fertilización.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias (Tabla 15):

Tabla 15. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	57.0294	4	14.25735	25.97204	0.000000113	2.86608
Dentro de los grupos	10.979	20	0.54895			
Total	68.0084	24				

$\alpha = 0.05$

En la tabla 15, evidencia significancia estadística entre las medias de los tratamientos para la producción de biomasa aérea, sin embargo, Reyes (1998), señaló que la vermicomposta y la multicepa *Glomus* spp., en plántulas de aguacate, promovieron mayor peso seco de la parte aérea con respecto al testigo, pero no existió significancia estadística según su análisis de varianza.

b. Efecto en la producción de biomasa de raíces

El efecto que generó la biofertilización de las micorrizas arbusculares nativas inoculadas a las raíces de los plantones de cacao en la producción de biomasa de raíces se midió y los resultados se muestran en la tabla 16 y Figura 11.

Tabla 16. Biomasa de raíz producida por los plantones de cacao

N°	TRATAMIENTO – MÉTODO		PESO HUMEDO (g)	PESO SECO (g)
	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN		
1	T1D	01 CEPA - DIRECTO AL SUSTRATO	3.88	1.11
2	T1S	01 CEPA - SUMERGIMIENTO	4.76	1.64
3	T2D	03 CEPAS - DIRECTO AL SUSTRATO	4.24	1.26
4	T2S	03 CEPAS - SUMERGIMIENTO	5.6	1.7
5	T	TESTIGO	1.16	0.4

En la tabla 16, muestra resultados similares a los obtenidos en la biomasa aérea producida por las micorrizas arbusculares nativas en los plantones de cacao expresados en la tabla 15, ya que el testigo obtiene el valor mínimo. De igual manera Reyes (1998), reportó un valor de 1.290 g para biomasa producida por raíces siendo un valor menor frente a 3.243 g reportado para la biomasa aérea obtenido.

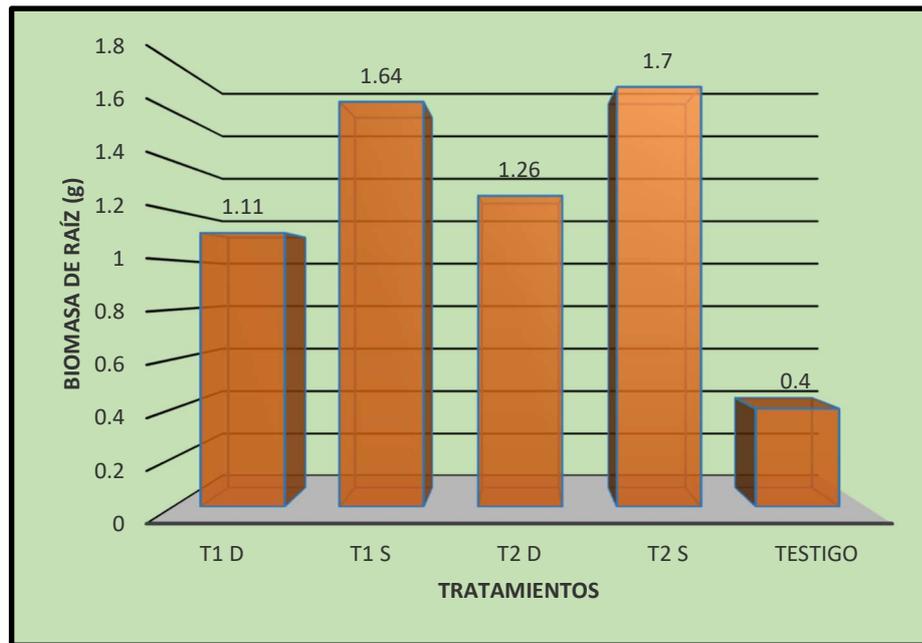


Figura 11. Biomasa de raíz producida por los plantones de cacao

La presencia de micorrizas favorece la producción de biomasa de raíces de acuerdo a lo que se observa en la figura 11, así mismo Usuga et al. (2008), señala que la acumulación de biomasa en términos generales presentó un comportamiento relativamente similar a la asociación de los hongos a las plantas de banano. Los resultados indican que el tipo de inóculo y el uso de materia orgánica favorecen la acumulación de biomasa tanto del sistema aéreo como radical.

A los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza para determinar si es que hay una diferencia estadística significativa de las medias, como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Análisis de varianza para los tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.4644	4	1.3661	5.57023	0.00352	2.86608
Dentro de los grupos	4.905	20	0.24525			
Total	10.3694	24				

$\alpha = 0.05$

En la tabla 17, evidencia significancia estadística entre las medias de los tratamientos para la producción de biomasa de raíces, confirmando lo señalado por Usuga et al. (2008), como se muestra en la Figura 11.

4.3.6. Efecto en la química del suelo

La biofertilización con micorrizas arbusculares nativas produjo pequeñas variaciones en la química del suelo usado como sustrato durante la investigación. Estas variaciones se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Influencia de la biofertilización en la química del suelo

N°	PROPIEDAD/ COMPONENTE	ANTES DE LA BIOFERTILI- ZACIÓN	DESPUÉS DE LA BIOFERTILIZACIÓN			
			T1 D	T1 S	T2 D	T2 S
1	Potencial de iones hidrógeno (pH)	7.03	5.40	5.34	4.83	5.44
2	Materia orgánica (%)	1.18	0.30	0.42	0.44	0.46
3	Fósforo (mg P/Kg de suelo)	8.50	22.50	16.50	14.50	15.00
4	Potasio (mg K/Kg de suelo)	170.00	32.50	25.00	22.50	25.00

En la tabla 18, la biofertilización no causó efecto en la materia orgánica y potasio.

Estudios similares a los encontrados, señaló Zulueta et al. (2016), al reportar que el contenido de nitrógeno en el sustrato final del experimento fue menor en las plantas inoculadas con el consorcio de hongos micorrízicos arbusculares en comparación con el control sin tratamiento, así mismo no hubo diferencia en el contenido de fosforo.

Sin embargo, en el análisis realizado después de dos meses de evaluación, se observó un incremento significativo en los niveles de fósforo, como lo señala Zavala (2011), quien afirma que la presencia de las micorrizas favorece la absorción del fósforo en plantas que crecen sobre suelos ácidos o de baja a moderada fertilidad. De igual forma Pérez, Rojas y Montes (2015) indican que los hongos micorrízicos arbusculares pueden interactuar con otros microorganismos del suelo (en las raíces, en la rizósfera y en la masa del suelo), incrementando la fijación del nitrógeno, aunque por sí solos no sean capaces de hacerlo.

Montaño et al. (2009), describe que dentro de los beneficios más visibles de las micorrizas arbusculares, se encuentra la capacidad de los hongos para estimular en las plantas hospederas un mayor tamaño y producción de semillas, a través de la incorporación de fósforo y otros nutrientes, situación favorable en los resultados encontrados en la presente investigación.

En cuanto a la propiedad físico-química del potencial de hidrógeno, ha bajado con el uso de micorrizas arbusculares nativas empleadas en esta investigación, teniendo un pH inicial de 7.03 y habiéndose regulado en un rango de 4.33 a 5.55, siendo en estos pH donde hubo alta grado de colonización de acuerdo a los datos estadísticos evaluados.

Podemos decir que las cepas fueron capaces de modificar el pH del suelo inicial y se puede notar que las modificaciones de los valores del pH del medio posiblemente tengan que ver con una estrategia de estos hongos para regular el ambiente en el que se desarrollan, tendiendo a modificar el pH hacia sus valores óptimos de crecimiento.

Cada tipo de hongo puede tener diferentes reacciones en cada valor de pH, pero la información concerniente al pH óptimo necesario para el establecimiento de una simbiosis entre un hongo específico y las raíces de su hospedero es todavía limitada (Hung y Trappe 1983). El pH del medio de cultivo afecta el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos (Zak 1973) y aunque se han registrado datos experimentales que indican un buen crecimiento a pH desde 3.2 hasta 6.5, el óptimo oscila entre 4.5 y 5.5 para la mayoría de los aislamientos probados.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El uso de micorrizas arbusculares nativas favoreció el crecimiento en plántulas de *Theobroma cacao* L. durante la etapa de vivero, obteniendo una respuesta positiva en la acumulación de materia seca aérea y de raíces.

El método de inoculación más eficiente es por sumergimiento usando tres sepas de la especie *Glomus* sp., de micorriza logrando un 100 % de colonización en raíces de *Theobroma cacao* L.

Las evaluaciones preliminares del plantón de *Theobroma cacao* L., inoculados con micorrizas arbusculares nativas muestran influencia en el crecimiento de raíz principal y volumen de raíces secundarias, atribuyendo una mayor absorción de fósforo.

Las micorrizas arbusculares nativas del género *Glomus* tienen buena adaptación en la inoculación y colonización en los plantones de *Theobroma cacao* L.

5.2. Recomendaciones

Promover formas de inoculación de micorrizas arbusculares nativas, al alcance del agricultor a fin de emplearlas en las distintas actividades agrícolas, con el propósito de reducir o evitar el uso de los fertilizantes químicos que degradan suelos.

Realizar investigaciones incrementando la variable del tiempo de sumergimiento con la finalidad de evidenciar en forma adecuada la influencia de las micorrizas arbusculares nativas en el crecimiento de las plantas de cacao.

Desarrollar un plan de monitoreo permanente y continuo para analizar la nutrición mineral del suelo donde se instalen los plantones y evaluar los cambios en la concentración de nutrientes en el suelo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adesemoye, A., y Kloepper, J. 2014. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1-12. doi: 10.1007/s00253-009-2196-0.

Aguilera-Gómez, L., Davies F. T., Olalde-Portugal, V., Duray, S. A., Phavaphutanon, L. 2017. Influence of phosphorus and endomycorrhiza (*Glomus intraradices*) on gas exchange and plant growth of chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. cv. San Luis). *Photosynthetica*. 36:441-449.

Alarcón A, Ferrera-Cerrato R. 1996. Dinámica de colonización y efecto de hongos endomicorrícicos sobre el crecimiento de *Casuarina equisetifolia* L. In: J. Pérez-Moreno y R. Ferrera Cerrato (eds.). Nuevos horizontes en agricultura: Agroecología y desarrollo sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp. 298-302.

Alloush, G.A, Zeto, S.K, Clark, N. 2013. Phosphorus source, organic matter, and arbuscular mycorrhizal effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition*. 23(9):1351-1369.

Almario, F. Mojica P. Cuéllar S. Medina C. Tamayo, A. 2015. Tecnologías relacionadas con biofertilización. Boletín tecnológico Banco de Patentes SIC. Pontificia Universidad Javeriana - Vicerrectoría de Investigación Dirección de Innovación.

Arcos, A. 2000. Análisis sobre la actividad de hongos formadores de micorriza vesículo arbusculares. Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

Arshad, M., and Frankenberger Jr., W.T. 2013. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*. 133:1-8. Arshad, M., and Frankenberger Jr., W.T. 1998. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*. 62:45-151.

Arteaga C. M. N.; Pastor O. S. A.; Tafúr S. S. M. y Vaca M. S. P. 2011. Evaluación de los Hongos Micorrizágenos Asociados a la Rizósfera del Café en la Cuenca de Jaén – Perú. Universidad Nacional de Cajamarca. Vicerrectorado de Investigación y Responsabilidad Social. Código: 001380. Cajamarca.

Ballesteros, W. Unigarro, A. Rosero, Sh. Solarte, A. 2004. Determinación de hongos formadores de micorrizas (HMA) en *Theobroma cacao* L, *Musa* sp., *Simmonds*, *Borojoa patinoi*. Cuatr y *Bactris gasipaes* HBK en el Municipio de Tumaco, Nariño.

Barrera N, Gómez J, Daniel E, Mejía L. 1999. Nuevas investigaciones para un adecuado manejo del chachafruto *Erythrina edulis* especie para la alimentación del hombre y de los animales domésticos. VI Seminario Internacional sobre Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Cipav, Buga.

Bashan Y., and Holguin, G. 2016. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225-1228.

Benavides, Ó. Pinargote, C. Silva, W. Fiallos, F. Ávila, F. y Cedeño - Loja, P. E. 2014. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el trópico húmedo ecuatoriano. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 233-239.

Bennett, AB. 2013. Out of the Amazon: *Theobroma cacao* enters the genomic era. *Trends in Plant Science* 8(12):561-563

Bolan, N. S. y L. K. Abbott. 2013. Seasonal Variation in Infectivity of Vesicular Arbuscular Micorrhizal Fungi in Relation to Plant Response to Applied Phosphorus, *Aust. J. of Soil Res.*

Bolaños, B. Rivillas, O. Suárez, V. 2012. Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé* 51 (4):245-262.2012.

Bonfante-Fasolo, P.; A. Genre y V. Bianciotto. 2014. The Colonization Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: An Overview of their Cellular Interactions with

Plants and Bacteria, en: Frías–Hernández J. T.; V. Olalde Portugal; R. Ferrera–Cerrato (Eds.). Avance en el conocimiento de la biología de las micorrizas. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Bowen, G. D. 2017. The Biology and Physiology of Infection and its Development, en Safir, G. R. (Ed.) Ecophysiology of V-A Mycorrhizal Plants. CRC. Press Inc., Boca raton, Florida, USA.

Brosius, M. R., Evanylo, G. K., Bulluck, L. R., y Ristaino, J. B. 2015. Comparison of commercial fertilizer and organic by-products on soil chemical and biological properties and vegetable yields. En S. Brown, J. S. Angle y L. Jacobs (Eds.), Beneficial Co-Utilization of Agricultural Municipals and Industrial By-Products (pp. 195-202). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Cadenillas M. A. I.; Gallardo A. M.; Cachi S. R.; Cusquisiban J. P. y Ishpilco C. J. 2010. Efecto de la Fertilización Biológica, con Micorrizas (V-A) y la Fertilización Química En Plantones de Taya *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz. Universidad Nacional de Cajamarca. Vicerrectorado de Investigación y Responsabilidad Social. Código: 001239. Cajamarca.

Castellano M.A. 1987. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. In: Mukerji K. G. (ed.). Concepts in Mycorrhizal Research. Kluwer Academic Publ. The Netherlands. pp. 223-301.

Castellano M.A., Trappe J.M., Molina R. 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. Can. J. For. Res., 15: 10-13.

Chacón, R. Guerra, E. 2012. Simbiosis Micorrizica Arbuscular y acumulación de aluminio en *Brachiaria decumbens* y *Manihot esculenta*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 10. Nº 2. (87 - 98).

Cornish, A.S., and Page, W. J. 2000. Role of molybdate and other transition metals in the accumulation of protochelin by *Azotobacter vinelandii*. Applied and Environmental Microbiology. 66(4):1580- 1586.

Counet C, Oowerx C, Rosoux D, Collin S. 2014. Relationship between Procyanidin and Flavor Contents of Cocoa Liquors from Different Origins. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6243-6249.

David S. 2015. Learning about sustainable cocoa production: a guide for participatory farmer training. Integrated crop and pest management. Sustainable. Tree Crops Program, International Institute of Tropical Agriculture, Yaoundé, Cameroon.

De la Cruz M, Whitkus R, Gómez-Pompa A, Mota-Bravo L. 2015. Origins of cacao cultivation. *Nature* 375:542 – 543.

Dias dos Santos LA, Rocha RB, de Toledo Picoli AE. 2015. Distinctness of cacao cultivars using yield component data and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5(1):47-54.

Díaz Franco, A., Salinas García, J. R., Espinosa Sandoval, F., Peña del Río, M. D. L. Á., Requena, F. R., y Grageda Cabrera, O. A. 2014. Características de planta, suelo y productividad entre sorgo fertilizado e inoculado con micorriza arbuscular. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(3), 379-390.

Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R. M., and Ahmad, N. 2015. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. *Nitrogen Economy in tropical Soil. Fertilizar Research.* 42:339-346.

Duddridge, J; Malbari, A; Read, D. 1980. Structure and functions of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834-836.

Duguma B, Gockowski J, Bakala J. 2013. Smallholder Cacao (*Theobroma cacao* Linn.) cultivation in agroforestry systems of West and Central Africa: challenges and opportunities. *Agroforestry Systems* 51:177–188.

Espinoza, V.M.A., Armenta, B.A.D. y Olalde, P.V. 2013. Interacción de micorriza y *Bacillus subtilis* en la producción de plántula de chile en invernadero. XII Congreso nacional de Ingeniería agrícola y II foro de la agroindustria del mezcal (memorias). AMIA. Oaxaca, México.

Faggioli, V. Gudiño, S. Baigorria, T. Boccolini, M. Cazorla, C. 2013. Respuesta de cereales de invierno a la inoculación con micorrizas sobre la producción de material seco y absorción de fósforo del suelo. Área Suelos y Producción Vegetal. Universidad Nacional de Villa María – Córdoba.

Ferguson, J; Woodhead, S. H. 1982. Production of endomycorrhizal inoculum A. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Methods and principles of mycorrhizal research. Ed. by N.C. Schench. USA American Phytopathological. Society. p. 47-53.

Fernández, K. y Rivera, R. 2013. Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. En: Rivera R. y Fernández K., Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: el Caribe, edit. Ediciones INCA, La Habana, Cuba, p. 166, ISBN 959-7023-24-5.

Fundación Produce Sinaloa. 2016. Memoria Agricultura orgánica. Memorias del Curso Eco Agro de de Agricultura Orgánica. Fundación produce Sinaloa. Guamúchil, Sinaloa, México. pp. 7-9.

Garbaye J., Bowen G.D. 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res., 17: 941-943.

Gerdemann, J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244.

González S. C. P. 2014. Aplicación de micorrizas y un Mycobacter en vivero de cacao *Theobroma cacao* L. Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Ingeniería Agronómica. Machala, Ecuador.

Goodwin, G. 1976. Simulated fire reduces the density of arbuscular mycorrhizal fungi at the soil surface. Mycological Research, 103(4): 491-496.

Gousterova, A., Nustorova, M., Christov, P., Nedkov, P., Neshev, G., y Vasileva-Tonkova, E. 2016. Development of a biotechnological procedure for treatment of animal wastes to obtain inexpensive biofertilizer. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(11), 2647-2652. doi: 10.1007/s11274-008-9788-1

Gupta, V.P., Bochow, H., Dolej, S., Fischer, I. 2014. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium wilt*. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 107 (2):145-154.

Hall H, Yuncong Li, Comerford N, Arévalo Gardini E, Zuniga Cernades L, Baligar V, Popenoe H. 2014. Cover crops alter phosphorus soil fractions and organic matter accumulation in a Peruvian cacao agroforestry system. *Agroforestry Systems* 80(3):447-455.

Harley, J. and Smith, S. 1983. *Mycorrhizal simbiosis*. Academic Press. London.

Haug, R. T. 2013. *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Boca Ratón: CRC Press.

Hebbar P, Bittenbender HC, O'Doherty D. 2015. Farm and Forestry Production and Marketing Prople for Cacao (*Theobroma cacao*) (revised). In: Elevitch, C.R. (ed.). *Specialty Crops for Paci□c Island Agroforestry*. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai'i.

Herencia, J. F., Ruiz-Porras, J. C., Melero Sánchez, S., Morillo González, E. y Maqueda Porras, C. 2017. Comparison between organic and mineral fertilization for soil fertility levels, crop macronutrient concentrations, and yield. *Agronomy Journal*, 99, 973-983. doi: 10.2134/agronj2006.0168 7.

Hung L.L., Trappe J.M., 1987. Ectomycorrhizal inoculation of Douglas-fir transplanted container seedlings with commercially produced inoculum. *New Forests*, 1: 141-152.

Infante JM. Las micorrizas 2013 <http://www.tri-ton.cl/index.php.pagina=faq>

Johnson, A. 1987. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils*, 16(1): 66 – 70.

León, D. 2014. Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a *Manihot sculenta* sp. (Yuca) en dos regiones de la Amazonía colombiana. Tesis Mag. Sc. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 125 p.

Li y Castellano. 1987. Role of VAM on growth and phosphorus nutrition of maize with low soluble phosphate fertilization. *Acta Agronómica*, 59(1): 119-123.

Litterick, A.M., L. Harrier, P. Wallace, C.A. Watson and M. Wood. 2014. The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production – a review. *Critical Reviews in Plant Science*, 23(6):453-479

Lynch, J. M. 2013. *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, New York, USA

Marcelo J; Pennington R; Reynel C; Zevallos P. 2010. Guía ilustrada de la Flora Leñosa de los Bosques Estacionalmente Secos de Jaén, Perú. Universidad Nacional Agraria. La Molina / Royal Botanic Garden Edinburgh. Lima. 288 p.

Marx D.H., Kenney D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal inoculum. In: Schenck N. C. (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. pp. 131-146.

Marx D.H., Ruehle J.L., Kenney D.S., Cordell C.E., Riffle J.W., Molina R.J., Pawuk W.H., Navratil S., Tinus R.W., Goodwin O.C. 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Sci.*, 28: 373-400.

Marx, D. y Bell. 1985. Formation of *Pisolithus* ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with spore pellet inoculum applied at different times. USDA Forestry Service Research Paper SE-249, 6 p.

Menge, J.A.; Timmer, L.W. 1982. Procedures for inoculation of plants with vesicular-arbuscular mycorrhizae in the laboratory, greenhouse, and field. In: Methods and principles of mycorrhizal research. Ed. By N.C. Schenck. USA. American Phytopathological Society. p. 59-68.

Mikola, P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. International Review of Forest Research. 114 p.

Miyasaka S, Habte M. 2003. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. Journal Series N° 4468, College of tropical Agriculture and Human resources, Hawaii, Honolulu. pp. 1101 – 1133.

Molina R., 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. USDA Forest Service Re. Note, PNW-357. 12 p.

Molina, M. Mahecha, L. Medina, M. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. Rev Colom Cienc Pecua Vol.18 N° 2. Medellín. Print version ISSN 0120-0690.

Molina, R y Palmer, J. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En: Methods and principles of mycorrhizal reserch. N. C. Schenck (ed). Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. Pp. 115-129.

Monroy, J. Salamanca, C. Cano, C. Moreno, L. Orduz, J. 2013. Influencia de las coberturas en cultivos de cítricos sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares en Oxisoles del piedemonte llanero colombiano. Artículo científico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

Montaño, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R. y Monroy, A. 2009. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM-Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM.

Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2013. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). PLoS ONE 3(10).

Muñoz, E. Macías, C. Franco, A. Sánchez, E. Jiménez, J. y González, J. 2009. Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Av. 4ta. Sur 3820, Fracc. Vencedores del Desierto. 33089 Cd. Delicias, Chih., México.

Ndukwu MC, Ogunlowo AS, Olukunle, OJ. 2010. Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Drying Kinetics. Chilean journal of agricultural research 70(4):633-639.

Parke, J; Liderman, R; Black, C. 1983. The role of ectomycorrhizas in the drought tolerance of Douglas-fir seedlings. New Phytol. 95:83-95.

Peisa, 2004. Forest dynamics: an ecological model. Oxford University Press. Oxford, U.K. 309 p.

Pérez, A. Rojas, J. Montes, D. 2015. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo Bioprospección Agropecuaria. Rev. Colombiana cienc. Anim. 3(2).

Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55: 158-161.

Posada, R. H., Madriñan, S. y Rivera, E. L. 2012. Relationships between the litter colonization by saprotrophic and arbuscular mycorrhizal fungi with depth in a tropical forest. Fungal Biology, 116(7), 747-755.

Powell C.L., and Bagyaraj, D. J. 2014. Biological interaction with VA mycorrhizal fungi. En: CL Powell y DL Bagyaraj (Eds.). VA mycorrhizal CRC press. Pág. 131-186.

Prieto, O; Belezaca, E; Mora, W; Garcés, F; Sabando, F; Cedeño, P. 2012. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en sistemas agroforestales con cacao en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. Agronomía Mesoamericana 23(2):233-239. 2012 ISSN: 1021-7444.

Rajan SK, Reddy BJB, Bagyaraj, DJ. 2000. Screening of arbuscular mycorrhizal fungi for their symbiotic efficiency with *Tectona grandis*. *Forest. Ecol. Manage.* 126:91–95.

Restrepo, A. Jaramillo, S. Cotes, J. 2009. Efecto de dos microorganismos y un consorcio de micorrizas en combinación con viruta de pino sobre el control de sarna polvosa (*Spongospora subterranea*) en papa. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Volumen 62, Número 2, p. 5047-5054, 2009. ISSN electrónico 2248-7026. ISSN impreso 0304-2847.

Reyes JC, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. 1998. Endomicorriza vascular, bacterias y vermicomposta en plántulas de aguacate en vivero. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México, 1998, pp. 12 – 22.

Richards, B. N. 2017. *The microbiology of terrestrial ecosystems*. LST; John Wiley and Sons. Inc. New York. 327-329 pp.

Rinauldo et al. 2013. Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant and Soil*. August 2010, Volume 333, Issue 1, 7-20.

Rojas, D. Contreras, M. Santoyo, G. 2013. Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México. 58030.

Rojas, K y Ortuño, N. 2007. Evaluación de micorrizas arbusculares en interacción con abonos orgánicos como coadyuvantes del crecimiento en la producción hortícola del Valle Alto de Cochabamba, Bolivia. *Rev. Acta. Nova*. Vol. 3. Nº 4. Cochabamba. versión On-line ISSN 1683-078.

Rufino L. 2014. Fortalecimiento de la cadena productiva de cacao, en las provincias de San Ignacio, Jaén y Celendín. Expediente técnico. Cajamarca.

Ruiz, P. O., Rojas, K. C., y Sieverding, E. 2015. La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la Amazonía peruana. *Espacio y Desarrollo*, (23), 47-63.

Salazar y García S. 2002. Las micorrizas pueden mejorar la nutrición del árbol, en *Nutrición del aguacate principios y aplicaciones*. INIFAP-INPOFEOS. México.

Somarriba E, Beer J. 2015. Productivity of *Theobroma cacao* agroforestry systems with timber or legume service shade trees. *Agroforestry Systems*. 81(2):109-121.

Sorensen, J. 2013. Nitrogen effects on vegetable crop production and chemical composition. *Acta Horticulturae*, 506, 41-49.

Usuga, C. Castañeda, D. Franco, A. Gómez, F. Lopera, C. 2008. Efecto de la micorrización y la fertilización en la acumulación de biomasa en plantas de banano (*Musa aaa* cv. gran enano) (Musaceae). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* Vol. 61. N° 1. Medellín. Print ISSN 0304-2847.

Vera, J. Vallejo C. Párraga, D. Morales, W. Macías, J. Ramos, R. 2014. Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo-(UTEQ). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Pichilingue. ISSN 1390-4051 impreso; ISSN 1390-4043 electrónico. Ciencia y Tecnología. UTEQ. Quevedo-Ecuador.

Vos JGM, Ritchie BJ, Flood J. 2003. DISCOVERY LEARNING ABOUT COCOA - An inspirational guide for training facilitators. Cabi bioscience, Bakeham Lane, UK. 1-111.

Zambrano, A., Romero, C., Gómez, A., Ramos, G., La Cruz, C., Brunetto, M., Gallignani, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y. 2015. Evaluación química de precursores de aroma y sabor del cacao criollo merideño durante la fermentación en dos condiciones edafoclimáticas. *Agronomía Tropical* 60 (2): 211-219.

Zavala, F. J. 2011. Rendimiento del sorgo con micorriza y fertilización química. Trabajo de grado, Ingeniería Agrónoma. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan.

Zdor, R. E., and Anderson, A. J. 2013. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant Soil*. 140:99-107.

Zuidema PA, Leffelaar PA, Gerritsma W Mommer L, Anten NPR. 2015. A physiological production model for cocoa (*Theobroma cacao*): model presentation, validation and application. *Agricultural Systems*, 84:195-225.

Zulueta, R; Valerio, S; Murillo, B; Lara, L; Reyes, Juan; Hernández, L. 2016. Influencia de micorrizas arbusculares en el crecimiento y cambios fisiológicos de la albahaca dulce bajo invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas [en línea]* 2016, (noviembre-diciembre): [Fecha de consulta: 13 de noviembre de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149506014>>ISSN 2007-0934.

Pérez, A; Rojas, J; Montes, D. 2011. Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares: Una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3 (2): 366-385.

ANEXO

Anexo 1. Resultados de la evaluación de colonización por plantón, segmento y por campo evaluado

TRATAMIENTO		TRATAMIENTO 01: INOCULACION DIRECTO AL SUSTRATO - 1 CEPA (T1D)																					
N° SEGMENTO		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		TOTAL	
RESULTADO /CAMPO		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
REPETICIONES	R1 6	14	2	7	9	6	10	7	9	7	9	1	15	4	12	8	8	6	10	5	11	65	95
	R2 3	15	1	16	0	10	6	10	6	6	10	5	11	4	12	8	8	15	1	7	9	96	64
	R2 6	8	8	10	6	12	4	7	9	4	12	16	0	10	6	6	10	12	4	10	6	95	65
	R3 4	7	9	4	12	6	10	6	10	6	10	14	2	9	7	12	4	7	9	0	16	71	89
	R4 5	2	14	16	0	8	8	1	15	2	14	10	6	2	14	3	13	9	7	10	6	63	97
																					390	410	

TRATAMIENTO		TRATAMIENTO 02: SUMERGIMIENTO - 1 CEPA (T1S)																					
N° SEGMENTO		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		TOTAL	
RESULTADO /CAMPO		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
REPETICIONES	R1 7	9	7	15	1	14	2	5	11	14	2	15	1	11	5	13	3	14	2	9	7	119	41
	R1 10	16	0	13	3	15	1	10	6	14	2	12	4	14	2	8	8	15	1	15	1	132	28
	R2 6	7	9	13	3	9	7	12	4	12	4	8	8	7	9	15	1	11	5	12	4	106	54
	R3 8	15	1	16	0	15	1	16	0	16	0	16	0	16	0	16	0	16	0	14	2	156	4
	R4 10	16	0	15	1	14	2	15	1	14	2	15	1	14	2	14	2	13	3	13	3	143	17
																					656	144	

TRATAMIENTO		TRATAMIENTO 03: INOCULACION DIRECTA AL SUSTRATO - 3 CEPAS (T2D)																							
N° SEGMENTO		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		TOTAL			
RESULTADO /CAMPO		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
REPETICIONES	R1 10	10	6	4	12	0	16	7	9	6	10	10	6	8	8	12	4	10	6	7	9	74	86		
	R2 8	12	4	12	4	12	4	12	4	6	10	6	10	14	2	14	2	13	3	13	3	114	46		
	R2 9	6	10	6	10	6	10	11	5	9	7	11	5	10	6	15	1	10	6	4	12	88	72		
	R3 4	15	1	15	1	15	1	15	1	7	9	14	2	14	2	15	1	16	0	14	2	140	20		
	R4 8	16	0	16	0	14	2	12	4	8	8	14	2	12	4	4	12	8	8	12	4	116	44		
																						532	268		

TRATAMIENTO		TRATAMIENTO 04: SUMERGIMIENTO - 3 CEPAS (T2S)																							
N° SEGMENTO		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		TOTAL			
RESULTADO /CAMPO		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
REPETICIONES	R1 5	15	1	15	1	15	1	15	1	15	1	15	1	12	4	7	9	11	5	12	4	132	28		
	R1 6	15	1	15	1	15	1	9	7	13	3	15	1	14	2	12	4	8	8	6	10	122	38		
	R2 3	13	3	13	3	13	3	15	1	15	1	14	2	12	4	7	9	14	2	9	7	125	35		
	R3 4	14	2	13	3	14	2	11	5	11	5	14	2	11	5	9	7	8	8	12	4	117	43		
	R4 3	15	1	15	1	14	2	15	1	15	1	9	7	16	0	16	0	16	0	15	1	146	14		
																						642	158		

Anexo 2. Resultados de la biofertilización en los plantones de cacao

TRATAMIENTO	REPETICIÓN	ALTURA (cm)	LONGITUD RAIZ PRINCIPAL (cm)	N° DE RAICES SECUNDARIAS	N° HOJAS	BIOMASA AÉREA (g)	BIOMASA RAÍZ (g)
TRATAMIENTO 01: INOCULACION DIRECTO AL SUSTRATO - 1 CEPA (T1D)	R1 6	26.30	23.80	114	8	6.25	1.01
	R2 3	23.40	39.90	82	6	4.18	0.64
	R2 6	23.00	20.00	98	7	4.91	0.91
	R3 4	25.30	26.10	102	9	5.86	1.25
	R4 5	22.20	30.00	106	8	4.65	1.74

TRATAMIENTO	REPETICIÓN	ALTURA (cm)	LONGITUD RAIZ PRINCIPAL (cm)	N° DE RAICES SECUNDARIAS	N° HOJAS	BIOMASA AÉREA (g)	BIOMASA RAÍZ (g)
TRATAMIENTO 02: SUMERGIMIENTO - 1 CEPA (T1S)	R1 7	24.20	26.00	259	7	5.45	1.11
	R1 10	22.50	18.80	203	8	4.31	1.78
	R2 6	24.70	32.40	276	6	3.94	2.01
	R3 8	18.40	22.10	177	7	5.75	2.27
	R4 10	22.60	28.00	296	11	4.45	1.03

TRATAMIENTO	REPETICIÓN	ALTURA (cm)	LONGITUD RAIZ PRINCIPAL (cm)	N° DE RAICES SECUNDARIAS	N° HOJAS	BIOMASA AÉREA (g)	BIOMASA RAÍZ (g)
TRATAMIENTO 03: INOCULACION DIRECTO AL SUSTRATO - 3 CEPAS (T2D)	R1 10	23.70	29.70	153	9	6.20	2.07
	R2 8	26.00	18.00	113	9	6.38	0.71
	R2 9	24.70	32.40	177	6	5.94	1.52
	R3 4	21.70	24.70	173	10	4.97	0.85

TRATAMIENTO	REPETICIÓN	ALTURA (cm)	LONGITUD RAIZ PRINCIPAL (cm)	N° DE RAICES SECUNDARIAS	N° HOJAS	BIOMASA AÉREA (g)	BIOMASA RAÍZ (g)
TRATAMIENTO 04: SUMERGIMIENTO - 3 CEPAS (T2S)	R1 5	20.20	18.70	213	9	6.61	0.91
	R1 6	25.00	21.90	265	11	4.99	1.64
	R2 3	26.20	22.40	213	9	5.89	2.59
	R3 4	22.40	20.20	227	8	5.53	2.05
	R4 3	17.70	19.70	203	7	5.03	1.31

TRATAMIENTO	REPETICIÓN	ALTURA (cm)	LONGITUD RAIZ PRINCIPAL (cm)	N° DE RAICES SECUNDARIAS	N° HOJAS	BIOMASA AÉREA (g)	BIOMASA RAÍZ (g)
TESTIGO (T0)	T 2	23.00	18.00	71	8	2.18	0.22
	T 4	22.40	21.80	76	7	2.58	0.63
	T 6	18.50	14.00	62	5	0.95	0.27
	T 8	22.00	20.80	68	6	1.17	0.39
	T 9	23.00	18.00	89	7	1.27	0.49

Anexo 3. Panel fotográfico



Figura 12. Preparación de semillas de cacao



Figura 13. Semillas de cacao para germinación



Figura 14. Preparación de tratamientos



Figura 15. Técnica de tamizado en húmedo



Figura 16. Control de crecimiento



Figura 17. Evaluación de los tratamientos

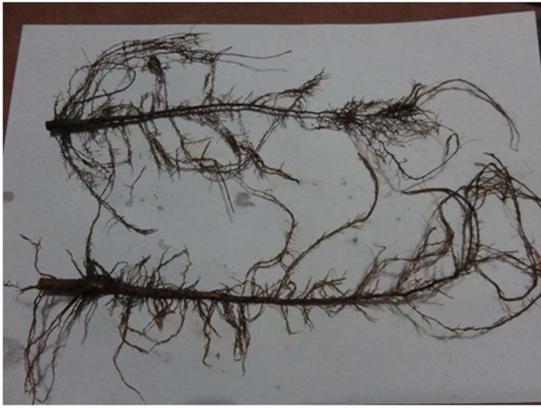


Figura 18. Raíces por inoculación directa



Figura 19. Raíces producidas por sumergimiento



Foto 20. Raíces en testigo



Figuras 21 y 22. Preparación de raíces de (*Theobroma cacao* L.) para proceso de tinción con la técnica de Phillips y Hayman 1970



Figuras 23 y 24. Raíces de *Theobroma cacao* L. en solución de hidróxido de potasio al 10% (baño maría)



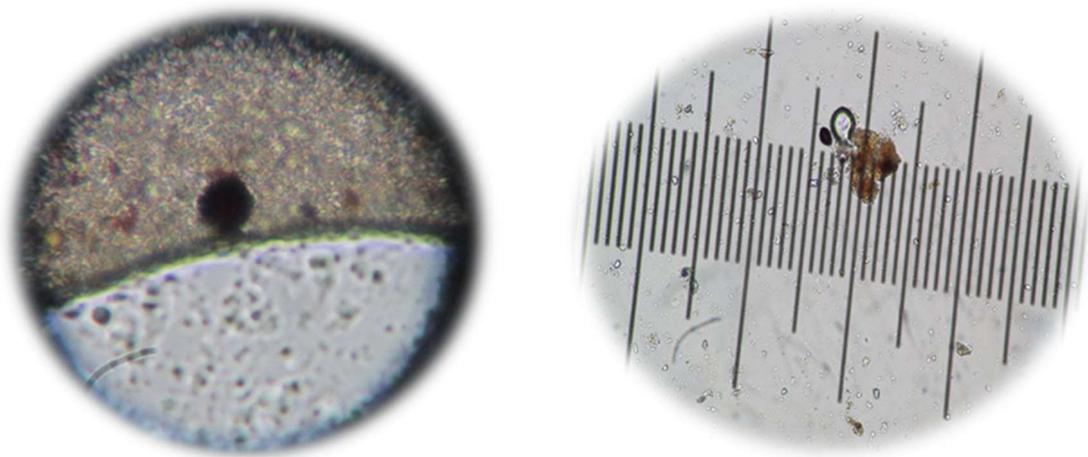
Figuras 25 y 26. Raíces de *Theobroma cacao* L. en solución de hidróxido de potasio al 10% + agua destilada al 10%.



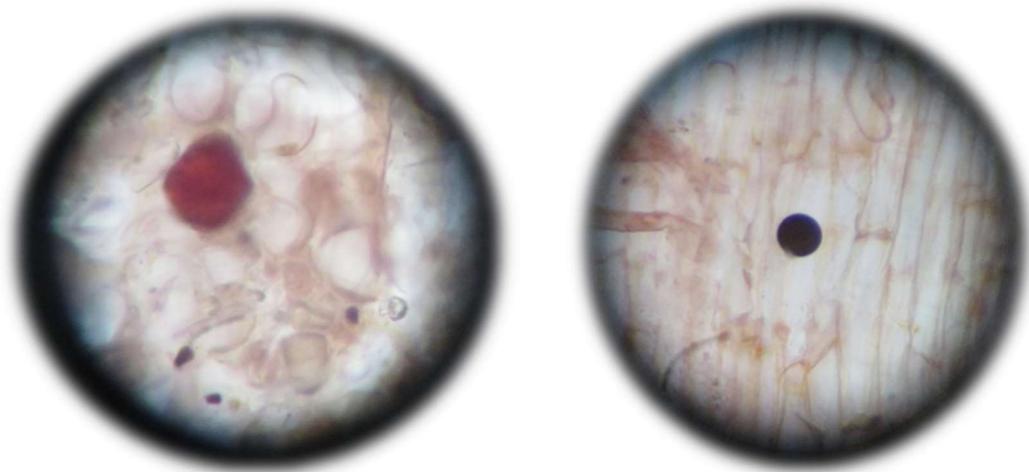
Figuras 27 y 28. Raíces de *Theobroma cacao* L. en solución azul de tripano al 0.05 % a baño maría



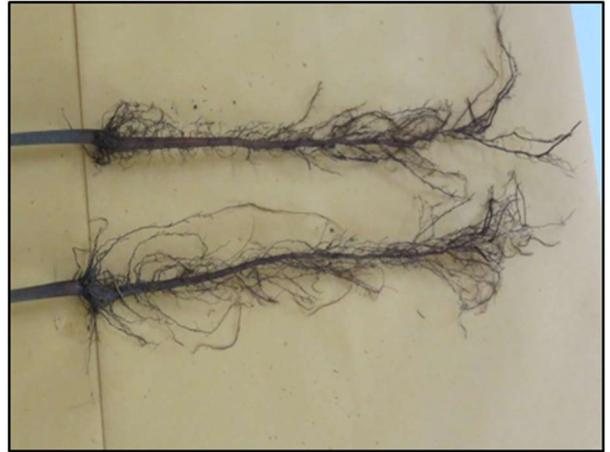
Figura 29. Evaluación del porcentaje de colonización



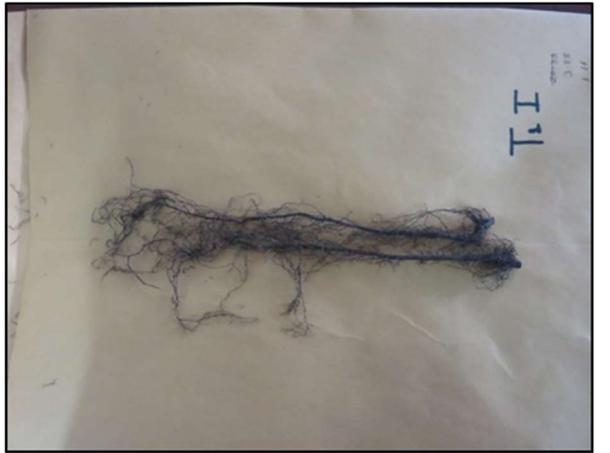
Figuras 30 y 31. Identificación de esporas en la evaluación final del sustrato



Figuras 32 y 33. Identificación de esporas presentes en las raíces evaluadas



Figuras 34 y 35. Plantones de *Theobroma cacao* L. en peso húmedo para determinación de biomasa foliar y de raíz



Figuras 36 y 37. Plantones de *Theobroma cacao* L. en peso seco para obtención de resultado de biomasa