



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y RADICULAR DE
PLÁNTULAS DE CACAO TRATADAS CON MICROORGANISMOS
EN SUSTRATOS DE DOS ZONAS DE LA COSTA ECUATORIANA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: John Rolando Limones Muñoz

LA LIBERTAD, AGOSTO 2026



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA**

**RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y RADICULAR DE
PLÁNTULAS DE CACAO TRATADAS CON MICROORGANISMOS
EN SUSTRATOS DE DOS ZONAS DE LA COSTA ECUATORIANA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: John Rolando Limones Muñoz

Tutor: Ing. Marlon Alexis Mena Montoya Mgtr.

LA LIBERTAD, AGOSTO 2026

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **John Rolando Limones Muñoz** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 12/Agosto/2026

Ing. Zoot. Verónica Cristina Andrade
Yucailla, Ph.D.

**DIRECTORA DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Ing. Carlos Eloy Balmaseda Espinosa,
Ph.D.

**PROFESOR ESPECIALISTA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Agrop. Marlon Alexis Mena
Montoya Mgtr

**PROFESOR TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Msc. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D.

**PROFESORA GUÍA DE LA UIC
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Com. Washington Vidal Perero
Vera, Mgtr.

**ASISTENTE ADMINISTRATIVO
SECRETARIO**

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, en especial a la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Carrera de Agropecuaria, por brindarme la formación académica, los conocimientos y las herramientas necesarias para culminar con éxito este trabajo de titulación.

Agradezco de manera especial a mi tutor, Ing. Marlon Alexis Mena Montoya, Mgtr., Por su orientación, paciencia, compromiso y valiosos aportes durante el desarrollo de esta investigación. Sus conocimientos, observaciones y varios llamados de atención fueron fundamentales para alcanzar finalmente una correcta ejecución y culminación de este trabajo.

Agradezco mucho a mi familia por apoyarme en este largo y cansado proceso universitario, por su amor, comprensión y confianza, en especial a mi papá por ese apoyo incondicional, por motivarme a perseverar frente a las dificultades y por ser el principal impulso para alcanzar esta meta de todas las formas posibles y ser parte de los pilares fundamentales que me dieron la fuerza para finalizar este proceso.

Asimismo, expreso un gran agradecimiento a amigos Harryson, Bryan, Lester y Anthony, quienes hicieron que este proceso fuera más llevadero y enriquecedor. Gracias por su amistad, compañerismo, apoyo constante y por los momentos compartidos que hicieron de esta etapa una experiencia más agradable y divertida. Agradezco también a Jusely por su apoyo durante este proceso, por su disposición para ayudarme cuando lo necesité y, sobre todo, por brindarme una valiosa amistad.

A todas las personas que, de una u otra manera, contribuyeron al desarrollo de este trabajo de titulación, mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación, en primer lugar, a Dios, por brindarme fortaleza, sabiduría y la oportunidad de culminar esta importante etapa de mi vida.

A mis padres, por su amor incondicional, esfuerzo, sacrificio y apoyo constante. Gracias por creer en mí, por motivarme a seguir adelante y por ser el pilar fundamental en cada uno de mis logros. Mi madre por guiarme a ser fuerte, dedicado y perseverante, por guiarme en cada etapa de mi vida e inculcarme valores como la responsabilidad, puntualidad, honestidad y respeto, principios que me han permitido crecer como persona y afrontar cada desafío con compromiso y determinación.

A mi padre, por enseñarme con esfuerzo, sacrificios y trabajo diario que la constancia y la disciplina son el camino para alcanzar los sueños. Gracias por su apoyo incondicional, sus consejos y por inspirarme a nunca rendirme.

A ambos, les dedico este logro con profundo amor y gratitud, porque sin su apoyo, confianza y sacrificio, alcanzar esta meta no habría sido posible.

A toda mi familia, en especial a mis abuelos maternos y paternos, así como a tíos y tías, por su cariño, consejos y palabras de aliento, también por el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

Con profundo cariño y gratitud, dedico este logro a todas las personas que han formado parte de mi vida y que, con su apoyo, confianza y enseñanzas, contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad. Cada esfuerzo, cada sacrificio y cada desafío superado durante este camino tiene hoy su recompensa. Que este trabajo sea reflejo de la perseverancia, el compromiso y el deseo constante de seguir creciendo tanto en lo personal como en lo profesional.

“No importa lo lento que vayas, siempre que no te detengas”

----Confucio

RESUMEN

La presencia de cadmio en los sistemas de producción de cacao constituye una problemática que afecta la calidad e inocuidad del grano, limitando su comercialización en mercados internacionales y haciendo necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles para reducir sus efectos sobre el cultivo. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar las concentraciones de cadmio en suelo y grano de cacao de dos zonas productoras, así como la respuesta morfofisiológica y radicular de plántulas tratadas con microorganismos benéficos. El estudio se desarrolló en dos fases. En la primera se determinaron las concentraciones de Cd, el pH y la conductividad eléctrica (CE) en muestras de suelo, además del contenido de Cd en granos de cacao procedentes de Río Verde y Cerecita. En la segunda fase se estableció un experimento en vivero bajo un DCA con arreglo factorial 2×5 , evaluando el efecto de *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* sobre variables de germinación, crecimiento, estado fotosintético y desarrollo radicular de plántulas de cacao. Los resultados mostraron concentraciones de Cd en suelo entre 0.21 y 0.28 mg kg⁻¹ de materia seca, mientras que en el grano se registraron valores de 0.48 mg kg⁻¹ en Río Verde (Nacional) y 1.74 mg kg⁻¹ en Cerecita (CCN-51). Asimismo, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* mostraron un comportamiento favorable en la germinación; sin embargo, varias variables de crecimiento y desarrollo radicular no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados sugieren que la acumulación de Cd en el grano no depende únicamente de su concentración en el suelo. Los microorganismos favorecieron algunas variables de germinación y crecimiento inicial, pero no fue posible establecer su efecto sobre la reducción o inmovilización del Cd, debido a que esta variable no fue evaluada durante la fase experimental, durante el periodo de evaluación establecido para las plántulas en vivero.

Palabras clave: Conductividad eléctrica; Germinación; Metales pesados; Rizósfera; SPAD

ABSTRACT

The presence of cadmium in cocoa production systems is a problem that affects the quality and safety of the beans, limiting their sale in international markets and making it necessary to seek sustainable alternatives to reduce its effects on the crop. The objective of this study was to evaluate cadmium concentrations in soil and cocoa beans from two producing regions, as well as the morphophysiological and root responses of seedlings treated with beneficial microorganisms. The study was conducted in two phases. In the first phase, Cd concentrations, pH, and electrical conductivity (EC) were determined in soil samples, along with the Cd content in cocoa beans from Río Verde and Cerecita. In the second phase, a nursery experiment was set up under a controlled atmosphere (CA) system using a 2×5 factorial design to evaluate the effect of *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas spp.* on variables related to germination, growth, photosynthetic status, and root development of cocoa seedlings. The results showed Cd concentrations in soil ranging from 0.21 to 0.28 mg kg⁻¹ of dry matter, while values in grain were 0.48 mg kg⁻¹ in Río Verde (Nacional) and 1.74 mg kg⁻¹ in Cerecita (CCN-51). Likewise, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas spp.* had a favorable effect on germination; however, several variables related to growth and root development did not show significant differences among treatments. The results suggest that Cd accumulation in the grain does not depend solely on its concentration in the soil. The microorganisms promoted certain germination and early growth variables, but it was not possible to determine their effect on Cd reduction or immobilization, as this variable was not evaluated during the experimental phase within the established evaluation period for the seedlings in the nursery.

Keywords: Electrical conductivity; Germination; Heavy metals; Rhizosphere; SPAD

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

El presente Trabajo de Integración Curricular titulado **“RESPUESTA MORFOFISIOLÓGICA Y RADICULAR DE PLÁNTULAS DE CACAO TRATADAS CON MICROORGANISMOS EN SUSTRATOS DE DOS ZONAS DE LA COSTA ECUATORIANA”** y elaborado por **John Rolando Limones Muñoz**, declara que la concepción, análisis y resultados son originales y aportan a la actividad científica educativa agropecuaria.

Transferencia de derechos autorales.

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".

John Rolando Limones Muñoz

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Problema Científico.....	3
Objetivos.....	4
Objetivo General:	4
Objetivos Específicos:	4
Hipótesis	4
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Origen e importancia del cultivo de cacao	5
1.2 Taxonomía y características del cultivo de cacao	5
1.3 Características morfológicas del cacao	5
1.4 Manejo agronómico del cultivo de cacao	6
1.5 Cadmio en los sistemas agrícolas y cacaoteros	7
1.6 Factores que regulan la disponibilidad de Cd en el sistema suelo – planta.....	8
1.6.1 pH del suelo	8
1.6.2 Materia orgánica	9
1.6.3 Textura y conductividad eléctrica.....	9
1.6.4 Integración de las propiedades edáficas y la disponibilidad de Cd	9
1.7 Influencia del genotipo en la bioacumulación de Cd en cacao.....	10
1.7.1 Bioacumulación en cacao fino aroma	10
1.7.2 Bioacumulación en variedad CCN-51	10
1.8 Respuesta morfofisiológica de plántulas de cacao frente al Cd.	11
1.9 Estrategias para reducir la disponibilidad del Cd en el suelo	12
1.9.1 Métodos físicos	12
1.9.2 Métodos químicos.....	12
1.9.3 Método biológico	13
1.10 Microorganismos asociados a la interacción suelo–Cd-planta.....	13
1.10.1 Aspergillus spp.	13
1.10.2 Trichoderma spp.	14
1.10.3 Bacillus subtilis.....	14
1.10.4 Pseudomonas spp.	15
1.11 Investigaciones relacionadas	16
1.12 Integración conceptual de la interacción procedencia del sustrato – Cd – microorganismos – planta.....	16
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1 Caracterización del área de estudio	19
2.2 Zona de muestreo	19
2.2.1 Centro de Apoyo – Río Verde (CARV).....	19
2.2.2 Cerecita	20
2.2.3 Justificación de la selección de las zonas de estudio	21
2.3 Área experimental	21
2.4 Materiales, equipos y reactivos	22
2.4.1 Material biológico.....	22
2.4.2 Material de campo para colecta de muestras	23
2.4.3 Material de laboratorio.....	23
2.4.4 Material de vivero	23
2.4.5 Equipos de laboratorio	23
2.4.6 Reactivos.....	24
2.5 Tipo de investigación	24

2.6	Diseño de investigación.....	24
2.6.1	Diseño experimental	24
2.7	Manejo del experimento	26
2.6.1	Sitios de muestreo.....	26
2.7.2	Preparación del sustrato	29
2.7.3	Preparación de semillas.....	30
2.7.4	Siembra	31
2.7.5	Aplicación de microorganismos	31
2.7.6	Plan de fertilización	32
2.8	Parámetros evaluados	33
2.8.1	Variables de caracterización inicial	33
2.8.2	Variables germinativas	33
2.8.3	Variables morfológicas	34
2.8.4	Variable radicular.....	35
2.9	Análisis estadístico de los resultados	35
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		37
3.1	Concentraciones de cadmio en suelo y grano de cacao.....	37
3.1.1	Suelo	37
3.1.2	Grano	38
3.2	Respuesta germinativa de plántulas de cacao.....	40
3.2.1	Porcentaje de germinación (%).....	40
3.2.2	Porcentaje de emergencia (%)	42
3.3	Respuesta morfológica de plántulas de cacao	44
3.3.1	Altura de planta (cm)	44
3.3.2	Diámetro de tallo (mm).....	47
3.3.3	Índice de vigor (cm ³)	50
3.4	Respuesta fisiológica de plántulas de cacao	53
3.4.1	Estado fotosintético (SPAD).....	53
3.5	Desarrollo radicular de plántulas de cacao	56
3.5.1	Longitud de raíz (cm)	56
3.6	Comportamiento del pH y Conductividad eléctrica del sustrato.....	59
3.7	Síntesis del comportamiento de los microorganismos	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		65
Conclusiones.....		65
Recomendaciones		66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		67
ANEXOS		74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	La interacción procedencia del sustrato – Cd – microorganismos – planta.....	17
Figura 2	Vista satelital del Centro de Apoyo Río Verde.....	20
Figura 3	Vista satelital de la finca “La primavera” – Recinto Cerecita	21
Figura 4	Vista satelital del área experimental	22
Figura 5	Croquis del área	26

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Detalle de ficha técnica de <i>Trichoderma spp.</i>	94
Ilustración 2 Detalle de ficha técnica de <i>Bacillus subtilis.</i>	95
Ilustración 3 Detalle de ficha técnica de <i>Pseudomonas spp.</i>	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía del cacao (Bhattacharjee, 2018)	5
Tabla 2 Características agronómicas del cultivo de cacao evaluado en el centro de apoyo Río Verde.....	20
Tabla 3 Características generales del cultivo de cacao.....	21
Tabla 4 Descripción de los microorganismo utilizados en el experimento.	22
Tabla 5 Esquema ANOVA	25
Tabla 6 Descripción de los tratamientos.....	25
Tabla 7 Proporción y cantidad de los componentes utilizados en la preparación del sustrato	30
Tabla 8 Preparación de la suspensión de microorganismo para cada aplicación	32
Tabla 9 Dosificaciones de fertilizante por planta	33
Tabla 10 Criterios de evaluación de estado fotosintético	35
Tabla 11 Concentraciones de cadmio (mg Kg – 1 de materia seca) determinadas en las muestras de suelo según sitio y profundidad de muestreo.....	38
Tabla 12 Concentraciones de cadmio (mg Kg – 1 de materia seca) en grano de cacao según zona y material genético.	40
Tabla 13 Porcentaje de germinación (%) de plántulas de cacao cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismos benéficos.	41
Tabla 14 Porcentaje de emergencia (%) de plántulas de cacao a los 15 días, cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismos benéficos.....	43
Tabla 15 Altura de planta (cm) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia, cultivadas en sustratos preparados con suelos de las zonas de estudio e inoculados con microorganismos benéficos.....	46
Tabla 16 Diámetro de tallo (mm) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia, en función de la interacción entre los sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio y los microorganismos evaluados.....	49
Tabla 17 Índice de vigor (cm ³) de plántulas de cacao en función de la interacción entre los sustratos con suelos de las zonas de estudio y los microorganismos	52

Tabla 18 Estado fotosintético (unidades SPAD) a los 21, 28, 35 y 42 días después de la emergencia, cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismo benéficos.....	55
Tabla 19 Longitud de raíz (cm) de plántulas de cacao inoculadas con microorganismos y cultivadas en sustratos con suelo de dos zonas de estudio.	58
Tabla 20 Comportamiento del pH y la conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sustrato elaborado con suelos de las zonas de estudio en plántulas de cacao inoculadas con microorganismos en dos zonas de estudio.....	62
Tabla 21 Comportamiento general de los microorganismos evaluados en plántulas de cacao.	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Fase1: Muestreo de suelo y mazorca

Anexo A 1 Recolección de muestra de suelo

Anexo A 2 Recolección de mazorca

Anexo A 3 Secado del grano

Anexo A 4 filtrado del suelo

Anexo A 5 Medición de pH

Anexo A 6 Medición de conductividad eléctrica

Anexo A 7 Etiquetado de las muestras de suelo y grano de cacao

Anexo A 8 Equipo de trabajo

Anexo A 9 Resultados del análisis de cadmio en suelo y grano de cacao

Anexo B Fase 2: Experimental

Anexo B 1 Adecuación del vivero

Anexo B 2 Preparación del sustrato

Anexo B 3 Llenado de fundas de germinación

Anexo B 4 Imbibición y desinfección de semillas de cacao

Anexo B 5 Siembra y distribución de las unidades experimentales

Anexo B 6 Germinación de la semilla

Anexo B 7 Preparación de la solución

Anexo B 8 Aplicación de los microorganismos

Anexo B 9 Variable diámetro de tallo

Anexo B 10 Variable altura de la planta

Anexo B 11 Variable estado fotosintético

Anexo B 12 Variable longitud de raíz

Anexo B 13 Variable volumen radicular

Anexo B 14 Observación de coloración de raíz y numero de raíces secundarias

Anexo B 15 Deformación de raíz

Anexo B 16 Deformación de raíz

Anexo C Análisis de varianza de las variables

Anexo C 1 Análisis de varianza porcentaje de germinación y emergencia

Anexo C 2 Análisis de varianza altura de planta

Anexo C 3 Análisis de varianza diámetro de tallo

- Anexo C 4** Análisis de varianza de índice de vigor
- Anexo C 5** Análisis de varianza de estado fotosintético
- Anexo C 6** Análisis de varianza longitud radicular
- Anexo C 7** Análisis de varianza de pH y conductividad eléctrica
- Anexo C 8** Análisis de Shapiro - Wilks variables germinativas
- Anexo C 9** Análisis de Shapiro - Wilks altura de planta
- Anexo C 10** Análisis de Shapiro - Wilks diámetro de tallo
- Anexo C 11** Análisis Shapiro-Wilks índice de vigor
- Anexo C 12** Análisis Shapiro-Wilks Estado fotosintético
- Anexo C 13** Análisis Shapiro-Wilks longitud raíz principal

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los productos locales de mayor importancia económica y social a nivel mundial. Su producción constituye una fuente de ingresos para millones de pequeños agricultores y representa una actividad estratégica para numerosos países productores (Velázquez *et al.*, 2022). Ecuador, con una tradición cacaotera de más de cuatro siglos, ha tenido un papel destacado en este sector gracias a su adaptación tecnológica y expansión de áreas de cultivo. Esto ha permitido mejorar la calidad y resistencia del grano frente a factores climáticos y fitosanitarios (Chaustre y Castillo, 2018). El país no solo ha mantenido su relevancia histórica en el mercado internacional, sino que también ha consolidado al cacao como un producto clave en su economía, generando empleo para más de 600.000 personas y contribuyendo significativamente al PIB nacional (Vargas *et al.*, 2022).

Ecuador se ha transformado en uno de los precursores globales en cacao fino y aroma; por ende, este país abarca cerca del 70 % del volumen total y sigue siendo uno de los principales exportadores a nivel mundial. Guayas y Los Ríos, de acuerdo con la Corporación Nacional Financiera (CFN, 2020), acaparan alrededor del 55 % de la producción total del país; después se encuentran Manabí, Esmeraldas y El Oro. Además, el cacao es un sector de exportación fundamental que tiene como destinos primordiales a Estados Unidos e Indonesia. Esto genera un superávit en la balanza comercial y contribuye a la creación de empleo en la nación.

A nivel local, Santa Elena ha diversificado sus actividades agrícolas, destacándose el cultivo de cacao en varias parroquias y comunas como Río Verde, Colonche, Manglaralto, entre otras (Candel *et al.*, 2021). No obstante, una de las principales limitantes en estos sistemas productivos es la contaminación del suelo, asociada al uso intensivo de insumos químicos y otras actividades antrópicas. En este contexto, organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), han manifestado su preocupación por la presencia de contaminantes en los productos derivados del cacao, particularmente metales pesados como el cadmio (Ortiz *et al.*, 2022). Desde una perspectiva ambiental, la presencia de metales pesados representa una de las principales amenazas para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Estos elementos pueden incorporarse a la cadena alimentaria mediante

procesos de bioacumulación y biomagnificación, afectando tanto la calidad de los productos agrícolas como la salud humana (Cabrera, 2024).

En Ecuador se han reportado concentraciones elevadas de cadmio en grano de cacao provenientes de distintas provincias productoras. Alvarez (2021) registró valores de hasta 4.08 mg kg^{-1} de materia seca en El Oro, 3.57 mg kg^{-1} de materia seca en Guayas, 3.46 mg kg^{-1} de materia seca en Manabí y 0.57 mg kg^{-1} de materia seca en Los Ríos. Estos resultados evidencian que la acumulación de cadmio en el grano representa un desafío para el sector cacaotero y resalta la necesidad de comprender los factores que regulan su absorción y acumulación en la planta.

La incorporación del cadmio al cultivo puede iniciarse desde las primeras etapas de desarrollo. Durante la fase de vivero, las plántulas son capaces de absorber este metal a través del sistema radicular y acumularlo en raíces, tallos y hojas, afectando procesos relacionados con el crecimiento, la absorción de nutrientes, la producción de biomasa y otros mecanismos fisiológicos (Barraza *et al.*, 2017; Correa *et al.*, 2021). La magnitud de esta acumulación depende de diversos factores, entre ellos las propiedades fisicoquímicas del suelo, la disponibilidad del metal y la variabilidad genética de los cultivares. Asimismo, se ha demostrado que la eficiencia de la absorción y transferencia del cadmio desde las raíces a los tejidos aéreos difiere entre genotipos, lo que convierte a la selección genética en una estrategia importante para reducir su acumulación en el grano (Lewis *et al.*, 2018).

La producción de cacao en Santa Elena se ve afectada por la contaminación de cadmio (Cd), que es capaz de penetrar en los tejidos vegetales y afectar la fisiología y, por lo tanto, la calidad y seguridad. En este contexto, esta investigación buscó evaluar cómo respondieron las plántulas de cacao en su forma, función y raíces cuando se les aplicaron microorganismos benéficos y se cultivaron en suelos de zonas con cadmio en Santa Elena. Los resultados permitirán ampliar el conocimiento sobre la interacción entre el sustrato de origen, los microorganismos y el desarrollo inicial de las plántulas, aportando información para futuras investigaciones orientadas al manejo sostenible del cultivo.

Problema Científico

El crecimiento inicial de las plantas de cacao es muy importante para que el cultivo se establezca adecuadamente. El tipo de sustrato y los microorganismos benéficos pueden afectar el crecimiento de las plántulas, tanto a nivel de apariencia como de funciones internas y del sistema radicular. En regiones como Santa Elena, Río Verde y Cerecita, los sustratos difieren, lo que puede generar diferencias en el desarrollo de las plántulas. Aunque los microorganismos benéficos ayudan a mejorar el crecimiento de las plantas, sus efectos dependen del tipo de microorganismo y de las condiciones del sustrato. Aún hay poca información sobre cómo las plantas de cacao responden en su forma, función interna y raíces cuando se exponen a diferentes microorganismos, especialmente en sustratos de las zonas costeras del Ecuador. Además, el cadmio en estas zonas puede ayudar a comprender mejor las propiedades del sustrato, pero no se considera una variable que cambie después de la aplicación microbiana.

En este contexto, es necesario generar información sobre la respuesta morfofisiológica y radicular de plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos y cultivadas en sustratos provenientes de dos zonas de la costa ecuatoriana, considerando variables relacionadas con la germinación, emergencia, crecimiento, estado fisiológico y desarrollo del sistema radicular.

¿Cómo responden morfofisiológica y radicularmente las plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos cuando se desarrollan en sustratos provenientes de dos zonas de la costa ecuatoriana?

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la respuesta morfofisiológica y radicular de plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos y cultivadas en sustratos provenientes de dos zonas de la costa ecuatoriana.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar las concentraciones de cadmio en muestras de suelo y grano de cacao procedentes de las zonas de Río Verde y Cerecita, como referencia de las condiciones de las zonas de estudio.
2. Evaluar la respuesta morfológica inicial de las plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos mediante las variables de germinación, emergencia, altura, diámetro del tallo e índice de vigor en los sustratos provenientes de las zonas evaluadas.
3. Determinar la respuesta fisiológica de las plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos mediante el contenido relativo de clorofila, expresado como índice SPAD.
4. Evaluar el desarrollo radicular de las plántulas de cacao tratadas con diferentes microorganismos mediante las características del sistema radicular en los sustratos provenientes de las zonas evaluadas.

Hipótesis

H0: La procedencia del sustrato, la aplicación de microorganismos benéficos y la interacción entre ambos factores no producen diferencias significativas en la respuesta morfofisiológica y radicular de las plántulas de cacao.

H1: La procedencia del sustrato, la aplicación de microorganismos benéficos y la interacción entre ambos factores producen diferencias significativas en la respuesta morfofisiológica y radicular de las plántulas de cacao.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Origen e importancia del cultivo de cacao

El cacao es un árbol tropical de gran valor social, económico y agrícola. Se estima que su domesticación se remonta al año 2000 a. C. en Mesoamérica (México, Guatemala, Honduras). Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que el origen más antiguo del cacao se encuentra en la Alta Amazonía ecuatoriana, donde ha sido utilizado desde hace aproximadamente 3300 años a. C. (Vergara, 2021).

Según la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao del Ecuador (ANECACAO, 2024), el cultivo de cacao en Ecuador es un importante producto de exportación agrícola. De todas las formas cultivadas de cacao, el Nacional ha sido el más conocido hasta la fecha y tiene un sabor y aroma finos. Pero las enfermedades (moniliasis y escoba de bruja) facilitaron la importación de material genético extranjero para combatirlas.

1.2 Taxonomía y características del cultivo de cacao

El cacao fue descrito científicamente por Carlos Linneo en la obra *Species Plantarum*, donde se establecieron las bases de la nomenclatura binomial y clasificación taxonómica moderna (Larios y Solís, 2024). La clasificación taxonómica del cacao se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1 Taxonomía del cacao (Bhattacharjee, 2018)

Categoría	Clasificación
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Malvaceae
Subfamilia	Byttnerioideae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i>

1.3 Características morfológicas del cacao

Las plántulas de cacao pueden absorber y bioacumular cadmio (Cd) en raíces, hojas y tejidos jóvenes de una manera que potencialmente se transfiere a las almendras que se cultivan para el consumo humano (Correa *et al.*, 2021).

- **Raíz:** Tiene una raíz pivotante y raíces secundarias encargadas de la absorción de agua y nutrientes que se extienden horizontalmente en los 30 primeros cm del suelo alrededor del árbol, zona donde ocurre una mayor interacción con nutrientes y los metales pesados presentes en el suelo (Barros, 2018).
- **Hojas:** Son simples, alternas y de forma ovada a elíptica, con venación pinnada y un pecíolo conspicuo. Tienen una longitud de 20-35 cm y muestran un color verde brillante en la adultez (Elodie *et al.*, 2022).
- **Fruto:** Es una baya de tamaño de 10 a 40 cm. Su forma puede ser ovalada, alargada o redonda, mientras que el color de la piel varía de verde a rojo dependiendo de la variedad (Velázquez *et al.*, 2022).
- **Semilla:** Es el principal órgano de interés comercial, ya que se utiliza para la producción de chocolate. Se ha reportado en la literatura la acumulación de cadmio en estas estructuras, lo que afecta la calidad y seguridad del producto final (Villarruel, 2022).

1.4 Manejo agronómico del cultivo de cacao

El manejo agronómico en vivero constituye una etapa fundamental para la producción de cacao, debido a que permite proporcionar condiciones adecuadas para su establecimiento y desarrollo inicial. De acuerdo con Agudelo *et al.* (2021), el establecimiento de viveros de cacao debe considerar factores como la disponibilidad de agua, adecuada ventilación y protección mediante sistemas de sombreado, los cuales contribuyen a reducir el estrés ambiental y favorecer el crecimiento vegetativo. Además, el adecuado manejo del riego permite mantener una humedad adecuada del sustrato, lo que favorece los procesos fisiológicos y el desarrollo de las plántulas durante las primeras etapas de crecimiento.

Las semillas son seleccionadas a partir de mazorcas fisiológicamente maduras y libres de daños ocasionados por plagas o enfermedades. Posteriormente, se eliminarán los restos del mucílago mediante lavado con agua y se seleccionarán aquellas semillas que presenten uniformidad en tamaño y buen estado fitosanitario.

Para la producción de plántulas se emplea un sustrato compuesto por suelo agrícola, materia orgánica, arena, previamente tamizado y desinfectado para reducir la presencia de microorganismos patógenos y semillas de maleza. El sustrato debe ser colocado en fundas

de germinación. En la siembra, se debe colocar una semilla por funda a una profundidad aproximada de 2 a 3 cm, cubriéndola ligeramente con sustrato y aplicando riego inmediatamente después de la siembra para favorecer el proceso de germinación. Las fundas serán distribuidas de manera que el manejo y evaluación sean fáciles (Merchán *et al.*, 2017).

Durante el desarrollo de las plántulas se efectúa un manejo fitosanitario preventivo mediante monitoreos periódicos para detectar la presencia de plagas, enfermedades o deficiencias nutricionales. Asimismo, se realiza el control manual de malezas, la regulación de la sombra y las labores de mantenimiento necesarias para garantizar un crecimiento uniforme de las plántulas hasta la etapa de evaluación experimental.

Las labores culturales en el cultivo de cacao comprenden actividades como la siembra, fertilización, poda, control fitosanitario y cosecha. Estas prácticas influyen directamente en el crecimiento y productividad del cultivo (García, 2019).

Por otra parte, el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas químicos ha generado impactos negativos sobre el ambiente y la salud humana. Diversos estudios indican que la aplicación continua de agroquímicos contribuye a la acumulación de contaminantes en el suelo, alterando sus propiedades químicas y microbiológicas (Alengebawy *et al.*, 2021; Shagñay, 2021).

Aquino (2024) determinó que el uso de herbicidas a base de glifosato y paraquat modificó el pH y la conductividad eléctrica del suelo en cultivos de cacao, afectando además la dinámica del cadmio en el sistema suelo-planta. Estos resultados evidencian que determinadas prácticas agrícolas pueden influir en la movilidad y disponibilidad de metales pesados en el suelo.

1.5 Cadmio en los sistemas agrícolas y cacaoteros

Los metales pesados pueden encontrarse naturalmente en los suelos como consecuencia de procesos geológicos, como el desgaste de las rocas y las emisiones volcánicas, pero también pueden incorporarse mediante actividades antropogénicas relacionadas con la minería, la industria y determinadas prácticas agrícolas (Angon *et al.*, 2024). Su importancia ambiental depende, además de su concentración total, de la fracción que permanece disponible para ser movilizada y absorbida por las plantas.

En los sistemas cacaoteros, el cadmio representa una preocupación debido a la capacidad del cultivo para absorberlo y distribuirlo hacia diferentes órganos de la planta. La presencia del metal en el suelo puede relacionarse con su acumulación en los tejidos vegetales y, posteriormente, en las almendras de cacao, afectando la calidad y seguridad del producto (Blommaert *et al.*, 2022; Lewis *et al.*, 2018).

La transferencia del cadmio desde el suelo hacia la planta no constituye un proceso uniforme. La cantidad del metal absorbida depende de su disponibilidad en el suelo, de las propiedades fisicoquímicas de la matriz y de las características genéticas de la planta (Correa *et al.*, 2021; Vanderschueren *et al.*, 2023). Por tanto, una determinada concentración de Cd total en el suelo no necesariamente representa una cantidad equivalente de Cd disponible para las raíces.

En este sentido, el comportamiento del Cd debe analizarse considerando la relación entre concentración, disponibilidad y absorción. Meter *et al.* (2019) señalan que la biodisponibilidad del Cd en cacao está relacionada con características como el pH, la materia orgánica, la textura, la conductividad eléctrica y la actividad microbiana. Asimismo, estudios realizados en Ecuador han encontrado relaciones entre el Cd disponible en el suelo y su acumulación en los granos de cacao (Chavez *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2022).

Por tanto, el problema del Cd en cacao no puede explicarse únicamente por la presencia del metal en el suelo. Es necesario considerar las condiciones que determinan su movilidad y disponibilidad, así como la capacidad de la planta para absorberlo, transportarlo y tolerarlo.

1.6 Factores que regulan la disponibilidad de Cd en el sistema suelo – planta

La disponibilidad del Cd para las plantas está condicionada por las propiedades fisicoquímicas del suelo. Entre los factores señalados se encuentran el pH, la materia orgánica, la textura, la conductividad eléctrica y las características generales de la matriz edáfica (Meter *et al.*, 2019; Vanderschueren *et al.*, 2021).

1.6.1 pH del suelo

El pH constituye una de las propiedades que condicionan la movilidad y disponibilidad de los metales en el suelo. Cambios en esta propiedad pueden modificar la

solubilidad del Cd y, por tanto, la cantidad del elemento que permanece disponible para ser absorbido por las raíces.

En sistemas agrícolas, las prácticas de manejo también pueden modificar el pH. Aquino (2024) reportó que la aplicación de herbicidas a base de glifosato y paraquat modificó el pH y la conductividad eléctrica del suelo en cultivos de cacao, observándose además cambios relacionados con la dinámica del Cd. Este antecedente evidencia que las propiedades químicas del suelo pueden variar como consecuencia del manejo y que dichas modificaciones pueden influir sobre el comportamiento del metal.

1.6.2 *Materia orgánica*

La materia orgánica interviene en la interacción entre los metales y la matriz del suelo. Su presencia puede modificar la retención y movilidad del Cd, dependiendo de las características del suelo y de las condiciones ambientales (Yuan *et al.*, 2021).

En este contexto, las enmiendas orgánicas, como compost, biochar y estiércol, han sido estudiadas como alternativas para disminuir la movilidad del Cd mediante el incremento de la capacidad de adsorción y la modificación de determinadas propiedades del suelo (Fernández *et al.*, 2020). Por ello, la materia orgánica debe considerarse como un componente que puede modificar el entorno químico en el que se encuentra el Cd.

1.6.3 *Textura y conductividad eléctrica*

La textura del suelo y la conductividad eléctrica también forman parte de las condiciones que pueden influir sobre la disponibilidad del Cd. La proporción de partículas minerales y la composición de la matriz determinan diferentes características de retención e interacción de los elementos presentes en el suelo (Joya *et al.*, 2023).

Meter *et al.* (2019) incluyen la textura y la conductividad eléctrica entre las propiedades relacionadas con la biodisponibilidad del Cd en sistemas cacaoteros. En consecuencia, la procedencia del sustrato puede generar condiciones diferentes para la interacción entre el Cd, los microorganismos y las raíces.

1.6.4 *Integración de las propiedades edáficas y la disponibilidad de Cd*

Los factores edáficos no actúan de manera aislada. El pH, la materia orgánica, la textura y la conductividad eléctrica forman parte de un conjunto de condiciones que

determinan el comportamiento del Cd en el suelo. Por ello, sustratos que presentan concentraciones pueden generar respuestas diferentes en las plantas si sus características fisicoquímicas son distintas (Argüello *et al.*, 2019).

Esta relación permite establecer una primera conexión conceptual para la investigación. La procedencia del sustrato puede determinar diferencias en sus propiedades fisicoquímicas y, a través de estas, modificar las condiciones de disponibilidad del Cd y del ambiente rizosférico.

1.7 Influencia del genotipo en la bioacumulación de Cd en cacao

La acumulación de Cd en cacao también presenta un componente genético. Investigaciones realizadas con diferentes materiales vegetales han demostrado variabilidad en la absorción, distribución y partición del metal dentro de la planta (Lewis *et al.*, 2018).

1.7.1 Bioacumulación en cacao fino aroma

En el cacao fino aroma se ha reportado una variabilidad en la bioacumulación de cadmio dependiendo de las condiciones edáficas y del material genético. En este contexto, Guevara (2021), en la investigación titulada Incidencia del suelo para la bioacumulación de Cadmio en la almendra de cacao de dos variedades Fino aroma y CCN-51 cultivadas en el cantón Santa Clara, provincia de Pastaza, evaluó la influencia de las propiedades fisicoquímicas del suelo sobre la acumulación de Cd en las almendras de cacao. Evidenciando que esta variedad presenta un comportamiento diferenciado en comparación con otros genotipos, lo que sugiere una menor o variable tendencia a la bioacumulación dependiendo del sitio del cultivo.

1.7.2 Bioacumulación en variedad CCN-51

Por otra parte, el clon CCN-51 ha sido ampliamente estudiado debido a su alta productividad y su comportamiento frente a la absorción de metales pesados. Guevara (2021) reportó que este clon presenta una tendencia distinta de bioacumulación de cadmio en comparación con el fino de aroma, evidenciando diferencias significativas en la bioacumulación del metal. De manera similar, Lewis *et al.* (2018) en la investigación Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L., evaluaron 77 genotipos de cacao y reportaron una amplia variabilidad genética en la absorción y distribución de Cd dentro de la planta. Los autores señalaron que algunos

genotipos, incluido el CCN-51, pueden presentar patrones diferenciados de translocación de Cd hacia almendras.

Asimismo, Barrezueta *et al.* (2021), en la investigación Comparación de los niveles de cadmio en hoja, testa y almendra en cultivares de *Theobroma cacao* L., encontraron diferencias significativas entre cultivares respecto a la acumulación del metal pesado en hojas, testa y almendras confirmando que el comportamiento del Cd varía según el material genético.

Por tanto, la respuesta al Cd debe entenderse como el resultado de la interacción entre las condiciones del suelo y las características de la planta. El genotipo puede modificar la absorción y distribución del metal, mientras que las propiedades del suelo condicionan la cantidad que permanece disponible para la raíz.

1.8 Respuesta morfofisiológica de plántulas de cacao frente al Cd.

La exposición al Cd puede generar alteraciones morfológicas y fisiológicas en las plantas, afectando procesos esenciales como la fotosíntesis, la absorción de nutrientes, el crecimiento radicular y la producción de biomasa (Chancay *et al.*, 2022).

El sistema radical constituye uno de los primeros órganos de la planta en contacto con el Cd disponible en el suelo. La presencia del metal puede afectar el desarrollo de las raíces y, posteriormente, modificar la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes. Estas alteraciones pueden reflejarse en variables relacionadas con crecimiento y biomasa (Luo y Zhang, 2021).

A nivel fisiológico, el Cd puede inducir estrés oxidativo y alterar procesos relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo vegetal. Chancay *et al.* (2022) señalan que la toxicidad del metal puede producir clorosis, disminución de la capacidad fotosintética y alteraciones en la actividad enzimática.

Sin embargo, la magnitud de estas respuestas no depende exclusivamente de la presencia del Cd. La concentración del metal, las condiciones ambientales, la etapa de desarrollo y el genotipo pueden modificar la respuesta de la planta. Algunas plantas presentan mecanismos de tolerancia relacionados con la producción de antioxidantes, la

quelación y la compartimentación del metal, que pueden limitar parcialmente sus efectos tóxicos (Luo y Zhang, 2021).

Por ello, las variables morfológicas y fisiológicas utilizadas para evaluar las plántulas pueden interpretarse como indicadores de la respuesta de la planta frente a condiciones del sistema, pero no deben atribuirse exclusivamente a una reducción del Cd sin realizar una medición directa del metal en la planta.

1.9 Estrategias para reducir la disponibilidad del Cd en el suelo

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos físicos, químicos y biológicos para la remediación de suelos contaminados con cadmio. Los cuales buscan reducir su biodisponibilidad y minimizar su incorporación a los cultivos agrícolas. Sin embargo, algunas de estas técnicas pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo y afectar su disponibilidad de micronutrientes esenciales (Villarruel, 2022).

1.9.1 Métodos físicos

Los métodos físicos incluyen principalmente la remoción, sustitución o aislamiento del suelo contaminado. La excavación del suelo permite eliminar directamente el contaminante del área afectada, aunque implica altos costos y limitada aplicabilidad en sistemas agrícolas extensivos. Otra estrategia es el confinamiento o encapsulamiento del suelo contaminado, que busca evitar la dispersión del cadmio hacia zonas productivas. También se emplean barreras físicas para reducir el contacto entre el contaminante y los cultivos agrícolas. Sin embargo, estas técnicas suelen ser poco viables en áreas agrícolas por su impacto económico y ambiental (Mu *et al.*, 2024).

1.9.2 Métodos químicos

Los métodos químicos se basan en la aplicación de enmiendas que modifican la movilidad y biodisponibilidad del cadmio en el suelo. Entre las más utilizadas se encuentran la cal agrícola, fosfatos y óxidos metálicos y materiales alcalinos, los cuales inmovilizan el cadmio mediante procesos de precipitación y reducción de su disponibilidad en el suelo. Estas enmiendas también modifican el pH del suelo, reduciendo la solubilidad del cadmio y su absorción por las plantas. No obstante, su uso debe ser controlado para evitar desequilibrios en la fertilidad del suelo (Bolan *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2024).

1.9.3 Método biológico

En el ámbito biológico, la fitorremediación y el uso de microorganismos benéficos han tomado relevancia como alternativa sostenible. El uso de enmiendas orgánicas como compost, biochar y estiércol contribuye a disminuir la movilidad del cadmio al incrementar la capacidad de adsorción del suelo y modificar su pH (Fernández *et al.*, 2020).

Asimismo, Barcia (2024) recomienda el uso combinado de enmiendas minerales y microorganismos como una estrategia eficiente para disminuir la concentración de Cd en suelos destinados al cultivo de cacao, evitando daños en la planta y reduciendo la contaminación del grano.

1.10 Microorganismos asociados a la interacción suelo–Cd-planta

Los microorganismos presentes en la rizosfera pueden modificar las condiciones químicas y biológicas del suelo y establecer interacciones con las raíces. Algunos hongos y bacterias han mostrado capacidad para interactuar con metales mediante mecanismos como biosorción, bioacumulación, producción de exopolisacáridos y formación de complejos con compuestos orgánicos (Bhandari, 2017; Chávez *et al.*, 2013).

Estos mecanismos no significan necesariamente que todos los microorganismos produzcan la misma respuesta. La interacción microorganismo–Cd depende del microorganismo utilizado, de sus características fisiológicas y de las condiciones del sistema experimental. En consecuencia, la evaluación de microorganismos debe considerar su identidad y el mecanismo que potencialmente interviene en la respuesta observada (Bravo and Braissant, 2021; Khan *et al.*, 2022).

1.10.1 *Aspergillus spp.*

Las especies de *Aspergillus* son hongos filamentosos presentes en muchos ecosistemas, especialmente en suelos agrícolas, y son responsables de la degradación de materia orgánica. Este género se encuentra y crece rápidamente, se adapta a diferentes ambientes y produce metabolitos que son beneficiosos para la supervivencia en ambientes con metales pesados (Zulfiqar *et al.*, 2022). Su crecimiento mediante redes de hifas permite establecer una interacción amplia con la matriz del suelo y la rizosfera.

En relación con los metales pesados, se han descrito mecanismos como la adsorción del Cd en la pared celular, la bioacumulación y la producción de ácidos orgánicos, entre ellos los ácidos cítrico y oxálico (Ayangbenroy and Babalola, 2017; Zulfiqar *et al.*, 2022). Goutam *et al.* (2021) también señalan que los metabolitos producidos por *Aspergillus* pueden modificar determinadas propiedades fisicoquímicas del entorno.

Estos antecedentes indican un potencial de interacción con el Cd; sin embargo, las respuestas observadas deben interpretarse considerando la especie o cepa utilizada, las condiciones del suelo, la concentración del metal y el tiempo de exposición. Por tanto, la presencia de *Aspergillus* no permite asumir automáticamente una disminución del Cd en cualquier sistema.

1.10.2 *Trichoderma spp.*

Las especies del género *Trichoderma* son utilizadas en agricultura por su capacidad para colonizar la rizosfera y establecer interacciones con raíces. Durante la colonización, pueden producir enzimas y metabolitos asociados con el desarrollo vegetal y la interacción con el ambiente radicular (Cortés *et al.*, 2023).

En condiciones de presencia de Cd, se ha descrito la adsorción del metal en estructuras celulares del hongo y una posible contribución a la tolerancia de las plantas frente al estrés (Cayotopa *et al.*, 2021; Guartatanga y Siguencia, 2019). Asimismo, Cortés *et al.* (2023) relacionan la interacción con el desarrollo radicular y mecanismos de defensa vegetal.

Por consiguiente, los efectos atribuidos a *Trichoderma* deben diferenciarse entre dos posibles vías: una interacción directa con el Cd y una respuesta indirecta mediante modificaciones en el crecimiento y tolerancia de la planta. Ambas vías pueden ocurrir simultáneamente, pero no representan necesariamente una reducción comprobada del contenido de Cd en el sistema.

1.10.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria que es común en los suelos y es conocida por colonizar la rizosfera y fomentar el crecimiento de las plantas (Orozco *et al.*, 2021). A nivel del suelo, es capaz de crear biopelículas y desarrollar relaciones con las raíces de las plantas, por lo que ayuda a mejorar la estabilidad microbiana de la rizosfera y es más productiva para el crecimiento de las plantas.

En presencia de Cd, se ha reportado que la inoculación con *B. subtilis* puede estar asociada con una disminución del estrés oxidativo, cambios en el desarrollo radicular y modificaciones en la distribución del metal dentro de la planta. Maslennikova *et al.* (2023) encontraron que la inoculación con *B. subtilis* redujo el estrés oxidativo, favoreció el desarrollo de las raíces y limitó la translocación de Cd a las partes aéreas de las plantas,

Estos resultados evidencian que *B. subtilis* puede modificar la respuesta de la planta frente al Cd; sin embargo, la respuesta observada corresponde a las condiciones específicas del estudio citado. Por ello, no debe generalizarse que todas las cepas de *B. subtilis*, a cualquier concentración o bajo cualquier condición del suelo, produzcan el mismo efecto.

1.10.4 *Pseudomonas spp.*

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido ampliamente reconocidas como una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal, debido a su capacidad para estimular el desarrollo de diversos cultivos y proteger el sistema radicular frente a condiciones adversas y organismos fitopatógenos. De acuerdo a de Werra *et al.* (2009), estas bacterias favorecen el crecimiento de las plantas y contribuyen a la protección de las raíces mediante la producción de compuestos asociados al control biológico y la adaptación en la rizosfera.

En el suelo, *Pseudomonas spp.* contribuye al mantenimiento de la actividad microbiana y a la disponibilidad de nutrientes mediante la producción de diversos metabolitos biológicamente activos. Su capacidad de adaptación a ambientes contaminados le permite sobrevivir y desarrollarse en presencia de metales pesados (Saeed *et al.*, 2021).

En presencia de metales pesados, *Pseudomonas* puede interactuar con el Cd mediante mecanismos como biosorción, bioacumulación y producción de exopolisacáridos. También puede producir sideróforos y otros compuestos que modifican la disponibilidad de determinados elementos en la rizosfera (Orozco *et al.*, 2021).

Además de la interacción directa con el metal, las bacterias del género *Pseudomonas* pueden favorecer el crecimiento radicular y la disponibilidad de nutrientes mediante la producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal (Saeed *et al.*, 2021). Por tanto, la eventual mejora en las variables de crecimiento puede ser consecuencia de una interacción rizosférica y no necesariamente de una disminución directa de la concentración de Cd.

1.11 Investigaciones relacionadas

Los antecedentes disponibles muestran que la respuesta frente al Cd varía según el microorganismo, la planta y las condiciones experimentales. Arce *et al.* (2022) evaluaron consorcios microbianos nativos constituidos por *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* y observaron reducciones del Cd en el medio de cultivo de 40.38 % y 46.04 %, respectivamente. Estos resultados evidencian una capacidad de interacción con el metal bajo las condiciones evaluadas, pero no permiten asumir que el mismo porcentaje de reducción ocurra necesariamente en un suelo agrícola o en plantas de cacao.

De manera complementaria, Meter *et al.* (2019), en el artículo Cadmio en cacao de América Latina y el Caribe: investigación y posibles soluciones para la mitigación, señalaron que la biodisponibilidad de Cd en las plantas depende de las características del suelo como el pH, el contenido de materia orgánica, la textura, la conductividad eléctrica y los microorganismos. Esto permite considerar a la comunidad microbiana como un componente adicional de la interacción suelo-planta.

Los antecedentes sobre acumulación del Cd en cacao también muestran diferencias entre órganos y materiales genéticos. Barraza *et al.* (2017) observaron una acumulación diferencial del metal en hojas, cáscara y granos, mientras que estudios como los de Barrezueta *et al.* (2021) y Lewis *et al.* (2018) evidenciaron diferencias entre genotipos.

En conjunto, estos estudios permiten establecer que la respuesta al Cd no depende de un único factor. La disponibilidad del metal está relacionada con las características del suelo; la absorción y distribución depende de la planta; y la actividad microbiana puede modificar las condiciones de la rizosfera. Por tanto, la respuesta final observada en las plántulas debe interpretarse como resultados de la interacción entre estos componentes.

1.12 Integración conceptual de la interacción procedencia del sustrato – Cd – microorganismos – planta

A partir de la revisión bibliográfica, se plantea que la procedencia del sustrato constituye el punto inicial de una cadena de interacciones que puede influir sobre la respuesta de las plántulas de cacao.

En primer lugar, diferentes procedencias pueden presentar propiedades fisicoquímicas particulares, como pH, materia orgánica, textura y conductividad eléctrica.

Estas características condicionan el comportamiento y la disponibilidad del Cd en el suelo. A su vez, la fracción disponible del metal representa la forma potencialmente accesible para la interacción con las raíces.

En segundo lugar, la incorporación de microorganismos modifica el componente biológico de la rizosfera. Dependiendo del microorganismo utilizado, pueden producirse mecanismos como biosorción, bioacumulación, producción de exopolisacáridos, ácidos orgánicos, sideróforos y otros metabolitos. Este proceso puede modificar la interacción entre el Cd y la matriz del suelo o entre el Cd y la raíz.

En tercer lugar, las condiciones generadas en la rizosfera pueden relacionarse con la respuesta de las plántulas. Esta respuesta puede expresarse mediante variables de crecimiento y desarrollo, así como mediante indicadores fisiológicos. Sin embargo, una mejora en estas variables no demuestra por sí misma que se haya reducido la concentración de Cd en el suelo o en los tejidos vegetales. Para demostrar inmovilización, remoción o menor absorción del metal, sería necesario medir directamente dichas variables.

Por tanto, el modelo conceptual que sustenta el estudio puede expresarse de la siguiente manera:



Figura 1 La interacción procedencia del sustrato – Cd – microorganismos – planta

Así, la revisión bibliográfica sustenta la necesidad de evaluar experimentalmente si la aplicación de estos microorganismos modifica la respuesta de las plántulas de cacao bajo las condiciones específicas del sustrato utilizado, sin asumir previamente que dicha respuesta implica una reducción de la concentración total de Cd.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización del área de estudio

La presente investigación utilizó suelo proveniente de dos zonas productoras de cacao ubicadas en las provincias de Santa Elena y zona limítrofe con la provincia de Guayas: el Centro de Apoyo Río Verde (CARV) y el recinto Cerecita. Estas localidades fueron seleccionadas por su importancia agrícola y por representar condiciones contrastantes para la evaluación de las concentraciones de cadmio (Cd) en suelo y grano.

Las zonas de estudio constituyeron la fuente del suelo empleado para la preparación del sustrato utilizado durante el experimento en vivero.

2.2 Zona de muestreo

2.2.1 Centro de Apoyo – Río Verde (CARV)

El Centro de Apoyo Río Verde (CARV) se encuentra en la comuna Río Verde, cantón Santa Elena, provincia de Santa Elena, a 25 km de la cabecera cantonal y a una altitud de 54 m s. n. m. (Ortega, 2018; Yépez, 2018). Esta localidad es una de las zonas de producción de cacao en la provincia y fue escogida como una de las fuentes de suelo para la preparación del sustrato.

La zona tuvo temperaturas que fluctuaban entre 16 y 31 °C, una humedad relativa media del 75 %, lluvias de cerca de 110 mm/mes durante la época invernal y 0.2 mm/mes en verano, además de una luminosidad entre 12 y 13 horas luz/día. Según Balmaseda y Ponce de León (2019), el suelo más común en la región corresponde al orden taxonómico Aridisoles, que clasifica a nivel de subgrupo como Typic Haplocambids, con textura franco–arcillo–arenoso en gran parte de la superficie.

En esta zona predominan plantaciones de cacao establecidas bajo un sistema de manejo con aplicación de manejo convencional con aplicación de insumos químicos. El cultivo evaluado presentó una superficie de 750 m² una edad aproximada de 13 años (Tabla 2).

Tabla 2 Características agronómicas del cultivo de cacao evaluado en el centro de apoyo Río Verde

Material de cacao	Área (m ²)	Edad del cultivo (años)	Tipo de manejo
Nacional	750	13	Convencional (Químico)

Fuente: Elaboración propia

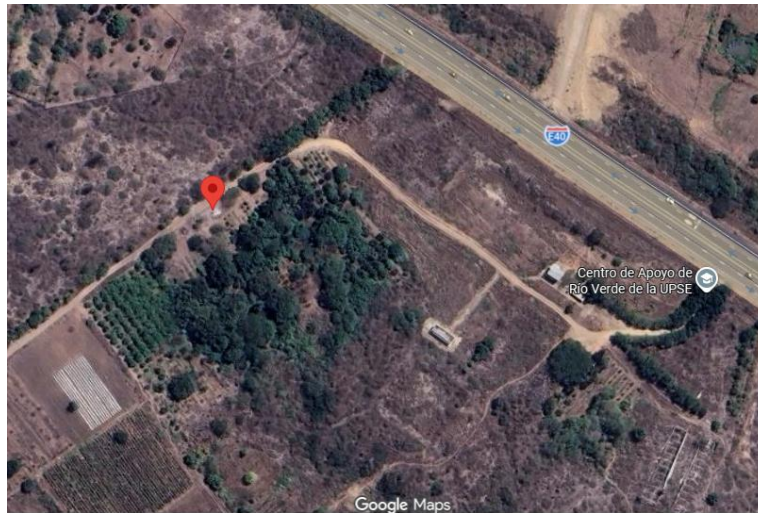


Figura 2 Vista satelital del Centro de Apoyo Río Verde

2.2.2 Cerecita

El recinto Cerecita, situado en la provincia de Guayas, es una zona de producción de cacao por las condiciones ambientales favorables. Esta localidad fue seleccionada como una de las fuentes de suelo para la preparación del sustrato empleado en el experimento de vivero y como sitio de referencia para la determinación de las concentraciones de cadmio en suelo y grano.

El clima se caracteriza por temperaturas promedio entre 19.9 y 32.9 °C, humedad relativa entre 67 y 83 %, precipitación de 10 mm en noviembre a 325 mm en febrero, y 12 horas de luz solar al día. El suelo está compuesto principalmente por Inceptisoles (Typic Haplustepts) en un área de relieve bajo con una pendiente entre 12 y 25 %. Tienen texturas franco arcillosas y un pH con alcalinidad moderada; esto afecta la disponibilidad de nutrientes y el comportamiento de elementos traza como el cadmio (INAMHI, 2026; MAG, 2018).

El clon CCN-51 es el principal cultivo que se cultiva en la finca bajo el sistema de manejo del productor local. El cultivo tiene 8 años y la superficie y tipo de manejo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Características generales del cultivo de cacao

Material de cacao	Área (m ²)	Edad del cultivo (años)	Tipo de manejo
CCN-51	10000	8	Convencional (Químico)

Fuente: Elaboración propia



Figura 3 Vista satelital de la finca “La primavera” – Recinto Cerecita

2.2.3 Justificación de la selección de las zonas de estudio

La selección del Centro de Apoyo Río Verde y del Recinto Cerecita respondió a criterios productivos, geográficos y ambientales. El CARV es una zona productora de cacao en la provincia de Santa Elena, mientras que Cerecita constituye una zona agrícola ubicada en el límite entre la provincia de Guayas y Santa Elena, donde investigaciones previas han reportado la presencia de cadmio en suelo y almendras de cacao (Huaraca *et al.*, 2024).

2.3 Área experimental

La fase experimental involucró la germinación y evaluación de microorganismos beneficiosos en plántulas de cacao en la parroquia Manglaralto en la provincia de Santa Elena, Ecuador, en condiciones de vivero semicontroladas.

La parroquia Manglaralto en el cantón de Santa Elena está ubicada a 01°50'32" de latitud sur y 80°44'22" de longitud oeste, a 12 m sobre el nivel del mar y con pendientes menores al 1 %. Según la clasificación de Köppen-Geiger, el clima en el área era Aw, con temperaturas cálidas durante todo el año y vegetación típica de bosque seco (principalmente pastizales y arbustos) con una temperatura media anual de 20 a 23.1 °C (Orellana, 2022).

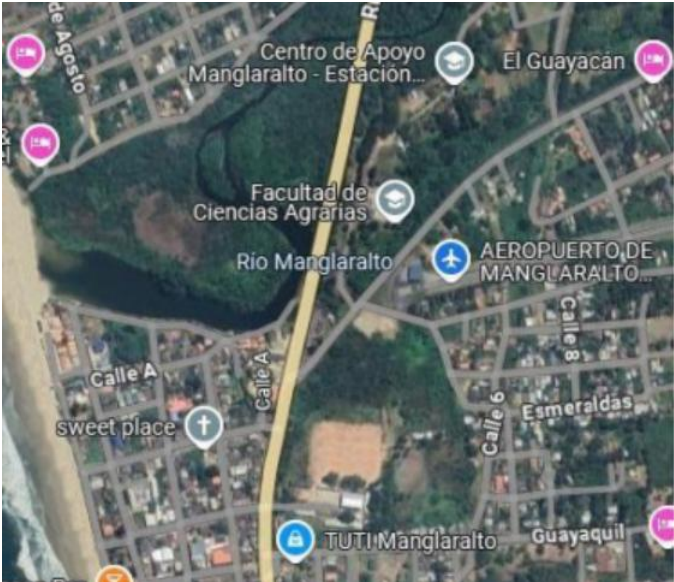


Figura 4 Vista satelital del área experimental

2.4 Materiales, equipos y reactivos

2.4.1 Material biológico

- Mazorcas de cacao recolectadas en las zonas de Río Verde y Cerecita para la determinación de cadmio en grano.
- 200 semillas de cacao variedad 800 para la germinación y establecimiento del experimento en vivero.
- Plántulas de cacao obtenidas durante la fase experimental.
- Microorganismos:

Tabla 4 Descripción de los microorganismo utilizados en el experimento.

Especie/cepa	Presentación	Concentración	Fabricante	Dosificación	Ficha técnica
<i>Trichoderma</i>					Ilustración 1
<i>spp.</i>	Líquido 1L	$\geq 1 \times 10^8$	MICROBIOLAB	1 L en 100-	
<i>Aspergillus</i>		UFC/mL	EC	200 L de agua	
<i>spp.</i>					

<i>Bacillus subtilis.</i>	Ilustración 2
<i>Pseudomonas spp.</i>	Ilustración 3

Elaboración: Propia con base a (Microbiolab, 2018)

2.4.2 *Material de campo para colecta de muestras*

- Pala cuadrada.
- balde plástico.
- GPS (Google Maps).
- Bolsa plástica con cierre hermético (bolsas Ziploc) para almacenamiento de muestras.
- Etiquetas para identificación de muestra.

2.4.3 *Material de laboratorio*

- Tamices de 2 mm, 1 mm.
- Vasos de precipitación de 250 mL.
- Papel filtro.
- Recipiente recolector y preparación de muestras.

2.4.4 *Material de vivero*

- Fundas de germinación de 6 x 10 cm.
- Sustrato compuesto por 50 % suelo, 35 % materia orgánica y 15 % arena.
- Etiquetas de identificación.
- Calibrador.
- Cinta métrica.

2.4.5 *Equipos de laboratorio*

- pH – metro digital portátil pH–2 plus.
- Medidor de clorofila GYJ-D.
- Conductímetro modelo YL-TDS2-A.
- Balanza analítica.
- Horno de esterilización y secado RS-70 marca REBELK.

2.4.6 Reactivos

- Agua destilada

2.5 Tipo de investigación

La presente investigación fue de tipo aplicada y experimental, con un alcance descriptivo y explicativo.

La fase de diagnóstico se enfocó en describir, ya que permitió determinar las concentraciones de cadmio presentes en muestras de suelo y grano de cacao procedentes de Río Verde y del recinto Cerecita, sin manipulación de las variables de estudio.

Posteriormente, la fase experimental se realizó después y consistió en la evaluación del efecto de diferentes microorganismos sobre la respuesta morfofisiológica y radicular de plántulas de cacao cultivadas en sustratos provenientes de las zonas de estudio, bajo condiciones semicontroladas de vivero.

2.6 Diseño de investigación

2.6.1 Diseño experimental

En la fase uno se realizó a nivel descriptivo para la determinación de las concentraciones de cadmio en el suelo y grano de cacao en las dos zonas de estudio, por lo cual no se implementó un diseño experimental.

En la fase dos se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2×5 , considerando:

- Factor A (Procedencia del sustrato):

A1: Cerecita

A2: Centro de Apoyo Río Verde

- Factor B (Microorganismos benéficos):

B1: *Trichoderma spp.*

B2: *Aspergillus spp.*

B3: *Bacillus subtilis*.

B4: *Pseudomonas spp.*

B5: Testigo (sin aplicación de microorganismos).

Ambos factores produjeron 10 tratamientos con 4 repeticiones, para 40 unidades experimentales. Cada unidad consistió en 5 plántulas de cacao, por lo que se utilizaron 200 semillas para el establecimiento.

Tabla 5 Esquema ANOVA

Fuentes de variación		Grados de libertad
Tratamientos	t-1	9
Factor a	Fa-1	1
Factor b	Fb-1	4
Factor (a)(b)	(Fa-1) (Fb-1)	4
Error experimental	Gltotal – GlFa – GlFb - (Fa-1) (Fb-1)	30
Total	N -1	39

*Gl = Grados de libertad

2.6.1.1 Tratamientos

La combinación de los niveles de los factores, origen del sustrato y microorganismos, dio lugar a los tratamientos descritos en la Tabla 6.

Tabla 6 Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Detalle	
	Factor A	Factor B
Tratamiento 1	Cerecita	<i>Trichoderma spp.</i>
Tratamiento 2	Cerecita	<i>Aspergillus spp.</i>
Tratamiento 3	Cerecita	<i>Bacillus subtilis.</i>
Tratamiento 4	Cerecita	<i>Pseudomonas spp.</i>
Tratamiento 5	Cerecita	Testigo
Tratamiento 6	Río Verde	<i>Trichoderma spp.</i>
Tratamiento 7	Río Verde	<i>Aspergillus spp.</i>
Tratamiento 8	Río Verde	<i>Bacillus subtilis.</i>
Tratamiento 9	Río Verde	<i>Pseudomonas spp.</i>
Tratamiento 10	Río Verde	Testigo

Fuente: Elaboración propia

2.6.1.2 Delineamiento del área experimental

El experimento consistió en 10 tratamientos (dos fuentes de sustrato y cinco microorganismos) con 4 repeticiones. Cada tratamiento estaba compuesto por cinco plántulas de cacao en bolsas individuales con aproximadamente 1 kg de sustrato.

Las unidades experimentales se distribuyeron aleatoriamente en el vivero para reducir la influencia de factores ambientales (incidencia de luz, temperatura y humedad), y las diferencias entre tratamientos se atribuyeron a los factores evaluados. Las distribuciones de las unidades experimentales se muestran en la Figura 5.

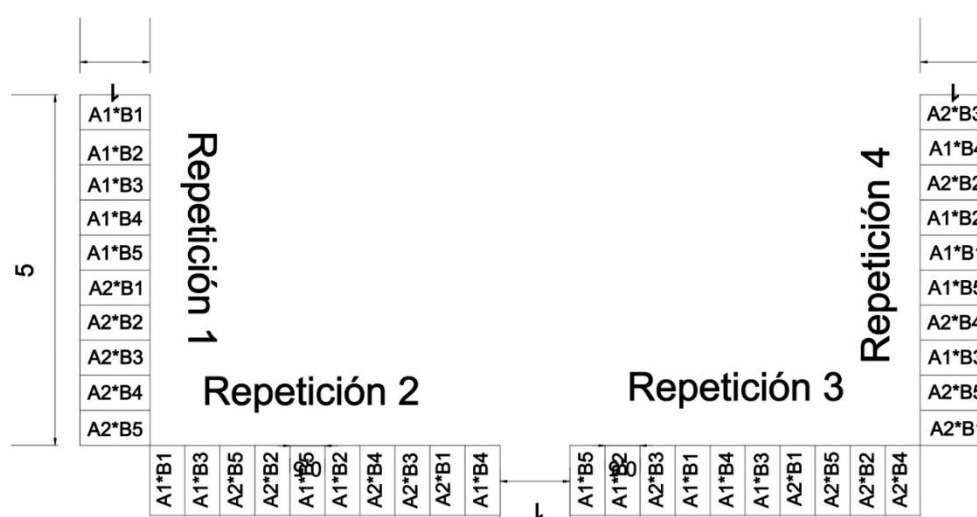


Figura 5 Croquis del área

2.7 Manejo del experimento

El estudio se llevó a cabo en dos fases: una fase de diagnóstico para determinar primero el cadmio en el suelo y los granos de cacao y una fase experimental que exploró la respuesta morfofisiológica y radicular de las plántulas de cacao cultivadas en el suelo del área de estudio e inoculadas con microorganismos.

Fase 1: Diagnóstico

2.6.1 Sitios de muestreo

El experimento se basó en la recolección de muestras de suelo y de granos de cacao en dos zonas específicas de la provincia de Santa Elena:

- Centro de Apoyo Río Verde

- Cerecita

Las ubicaciones del suelo fueron elegidas como fuentes de suelo para la preparación del sustrato para el experimento de vivero y como sitio de referencia para las concentraciones de cadmio. En cada área, se tomaron cuatro submuestras de suelo a dos profundidades (0-25 y 25-50 cm), y las submuestras a cada profundidad se homogenizaron para obtener una muestra compuesta representativa. En cada lugar, se tomaron alrededor de 10 mazorcas de cacao para obtener una muestra compuesta de granos. Las áreas fueron seleccionadas debido al cultivo de cacao y al conocimiento previo sobre la presencia de cadmio en los sistemas de cacao y se compararon las concentraciones de metales entre ambos sitios (Huaraca *et al.*, 2024; López *et al.*, 2021).

2.7.1.1 Muestreo de suelos

En cada zona de estudio se realizó un muestreo compuesto mediante un recorrido en zigzag dentro del lote de cacao, con el propósito de obtener muestras representativas del área. En cada punto de muestreo se recolectaron cuatro submuestras de suelo utilizando una pala cuadrada, a las profundidades de 0-25 cm y 25-50 cm. Las submuestras correspondientes a cada profundidad fueron colocadas sobre una superficie plástica limpia, homogenizadas en un balde plástico y mezcladas para obtener una muestra compuesta representativa.

Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en bolsas herméticas tipo Ziploc, debidamente identificadas con la zona de estudio, la profundidad de muestreo y el tipo de muestra, para su posterior envío al Laboratorio de Suelo, Plantas y Aguas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias (INIAP), siguiendo la metodología descrita por Martínez *et al.* (2023).

2.7.1.2 Muestreo de grano de cacao

En cada zona de estudio se seleccionaron aleatoriamente aproximadamente diez mazorcas de cacao en estados de madurez fisiológica. Posteriormente, se realizó el desgrane de forma independiente para cada localidad con el fin de evitar la contaminación cruzada entre las muestras.

Los granos obtenidos fueron secados en un horno de esterilización y secado RS-70 (REBELK) a 105 °C durante 24 horas para eliminar la humedad y los restos de mucílago.

Una vez secos, fueron triturados y homogenizados para obtener una muestra representativa de cada zona y, finalmente se almacenaron en bolsas herméticas tipo Ziploc, debidamente identificadas, y fueron enviadas al Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) para la determinación de cadmio, de acuerdo con la metodología descrita por Martínez *et al.* (2023).

2.7.1.3 Análisis de Cd en suelo y del grano de las zonas de estudio

La determinación de cadmio en las muestras de suelo y granos recolectadas en las zonas de estudio fue realizada en el laboratorio del INIAP mediante la técnica de espectrometría de fluorescencia de rayos X de alta definición (HDXRF). Previo al análisis, las muestras fueron condicionadas mediante procesos de secado, molienda y homogenización, con la finalidad de obtener una muestra uniforme y representativa.

Las muestras identificadas por la zona de procedencia fueron sometidas a la lectura instrumental mediante el equipo HDXRF. La concentración de cadmio fue determinada y expresada en mg kg^{-1} de peso seco, considerando el límite de detección del equipo de 0.05 mg kg^{-1} . Los resultados obtenidos permitieron evaluar la presencia y concentración de este metal en el suelo y granos de cacao de las zonas evaluadas (Martínez *et al.*, 2023).

2.7.1.4 Cálculo de pH y conductividad eléctrica

2.7.1.4.1 pH

La determinación del pH se realizó siguiendo la metodología propuesta por Silva *et al.* (2021). Las muestras de suelo previamente identificadas según la zona fueron secadas en un horno de esterilización y secado RS-70 (REBELK) durante 24 horas a 105 °C.

Posteriormente, se preparó una suspensión suelo-destilada en una relación 1:1 (20 g de suelo por 20 mL de agua destilada), la cual fue homogenizada mediante agitación y dejada en reposo durante unos minutos para favorecer la sedimentación de las partículas sólidas.

Las mediciones se realizaron con un pH-metro digital portátil pH-2 Plus, previamente calibrado. Las lecturas se realizaron en el laboratorio, el cual se mantuvo acondicionado a una temperatura aproximada de 25 °C durante todo el proceso de medición.

2.7.1.4.2 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) del suelo se determinó siguiendo la metodología propuesta por Silva *et al.* (2021). Para ello, se utilizó la misma suspensión suelo destilada preparada en una relación 1:1, previamente homogenizada y dejada en reposo.

Las mediciones se realizaron con un conductímetro modelo YL-TDS2-A, previamente calibrado. Los valores de conductividad eléctrica se registraron en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Fase 2: Fase experimental

La fase experimental se realizó en condiciones semicontroladas en un vivero, utilizando suelo de Río Verde y del área de Cerecita como sustrato. Durante esta etapa, se examinó el efecto de la aplicación de microorganismos en la respuesta morfofisiológica y radicular de las plántulas de cacao.

2.7.2 Preparación del sustrato

Siguiendo la metodología de Agudelo *et al.* (2021), se preparó un sustrato compuesto por 50% de suelo del área de estudio, 35% de materia orgánica (M.O.) y 15% de arena. Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron 200 bolsas de germinación con un total de 1 kg de sustrato por unidad, lo que sumó 200 kg de sustrato a utilizar.

Con base en esta proporción, se calcularon las cantidades de cada componente, empleándose 100 kg de suelo, 70 kg de materia orgánica y 30 kg de arena. Posteriormente, los materiales fueron pesados y mezclados cuidadosamente hasta obtener una distribución homogénea de los componentes.

Debido a que el estudio consideró dos áreas de muestreo, la preparación del sustrato se realizó de forma independiente para cada zona. Para cada una se utilizaron 50 kg de suelo del área correspondiente, 35 kg de materia orgánica y 15 kg de arena, obteniéndose dos mezclas diferentes: una con suelo procedente de Río Verde y otra con suelo procedente de Cerecita. Finalmente, cada mezcla fue homogenizada manualmente y utilizada para el llenado de las bolsas destinadas al establecimiento de las plántulas de cacao.

La caracterización fisicoquímica (concentración de cadmio, pH y conductividad eléctrica) se realizó sobre los suelos de origen antes de la preparación de los sustratos experimentales. En consecuencia, la mezcla final (suelo, materia orgánica y arena) no fue

caracterizada previamente, por lo que las respuestas obtenidas corresponden a plántulas desarrolladas en sustratos preparados con suelo procedente de las dos zonas de estudio bajo una composición estandarizada y homogénea (Tabla 7).

Tabla 7 Proporción y cantidad de los componentes utilizados en la preparación del sustrato

Componente	Proporción (%)	Cantidad total (Kg)
Suelo del área de estudio	50	100
Materia Orgánica	35	70
Arena	15	30
Total	100	200

2.7.3 Preparación de semillas

Se utilizaron 200 semillas de cacao de la variedad 800, las cuales fueron distribuidas en 10 tratamientos experimentales, con un total de 5 semillas por unidad experimental.

Inicialmente, las semillas fueron extraídas de las mazorcas y posteriormente se sumergieron en agua limpia durante 24 horas para favorecer la imbibición y facilitar el desprendimiento del mucílago. Posteriormente, se realizó la desmucilagínación mediante fricción manual con tierra seca, removiendo el mucílago adherido a la testa hasta obtener una semilla limpia.

Estas semillas fueron luego seleccionadas en base a un tamaño uniforme y buena condición fitosanitaria. Finalmente, las semillas fueron tratadas con el producto comercial Semeprid (imidacloprid + thiodicarb) durante unos 15 minutos para prevenir el crecimiento de plagas y patógenos de acuerdo con Agudelo *et al.* (2021).

El tratamiento químico se realizó únicamente en la semilla antes de la siembra, mientras que la inoculación de los microorganismos se efectuó a los 3 días después de la siembra, evitando su mezcla directa durante la preparación de las semillas. Asimismo, el uso de cura semillas no afecta el poder germinativo cuando se emplea; confirma las recomendaciones, debido a que sus ingredientes activos, complementados con zinc, boro y molibdeno, están orientados a proteger el establecimiento inicial del cultivo (Casafe, 2016).

2.7.4 Siembra

La siembra se realizó colocando una semilla pregerminada en la bolsa con dimensiones de 6 x 10, luego se plantó aproximadamente tres cuartos de la semilla en el sustrato, orientando el punto de emergencia de la radícula. Luego se aplicó riego para mantener el sustrato a capacidad de campo y germinar las semillas. Las bolsas de semillas se distribuyeron en hileras en el vivero para asegurar un adecuado control agronómico, control fitosanitario y crecimiento de las plántulas (Agudelo *et al.*, 2021).

2.7.5 Aplicación de microorganismos

Los microorganismos beneficiosos *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* se obtuvieron a partir de formulaciones comerciales y se aplicaron una vez por semana durante el período experimental mediante dos vías: edáfica y foliar.

El experimento estuvo constituido por 10 tratamientos, correspondientes a la combinación de dos procedencias del sustrato y cinco tratamientos de microorganismos, incluidos *Trichoderma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* y un tratamiento testigo. Cada tratamiento contó con cuatro repeticiones, y cada repetición estuvo conformada por cinco plántulas como submuestras. En consecuencia, cada tratamiento estuvo representado por 20 plántulas y el experimento comprendió un total de 200 plántulas.

Para cada microorganismo se prepararon 1000 mL de suspensión por jornada de aplicación, distribuidos en dos fracciones de 500 mL. Para la vía edáfica se utilizaron 480 mL de agua y 20 mL del producto comercial, mientras que para la vía foliar se preparó una segunda suspensión con 480 mL de agua y 20 mL del mismo producto comercial. De esta manera, cada microorganismo requirió un total de 40 mL de producto comercial y 960 mL de agua por jornada de aplicación.

Las suspensiones fueron aplicadas a las 20 plántulas correspondientes a cada tratamiento. La primera suspensión se aplicó directamente sobre el sustrato, alrededor de la zona radicular, mediante la vía edáfica, mientras que la segunda se aplicó sobre el follaje mediante la vía foliar. Por tanto, cada planta recibió 25 mL de suspensión por vía, equivalente a 50 mL de suspensión por planta en cada jornada de aplicación. Considerando

la concentración de la suspensión, cada planta recibió 1 mL de producto comercial por vía, para un total de 2 mL de producto comercial por planta en cada jornada.

El tratamiento testigo recibió el mismo volumen de aplicación y siguió el mismo procedimiento, utilizando únicamente agua. La aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPB) se realizó con el propósito de evaluar su posible influencia sobre el crecimiento y desarrollo inicial de las plántulas bajo las condiciones de los sustratos evaluados, como lo observaron González (2014), Maslennikova *et al.* (2023), Reed and Glick, (2023).

Tabla 8 Preparación de la suspensión de microorganismo para cada aplicación

Tipo de aplicación	Agua (mL)	Microorganismo (mL)	Volumen preparado (mL)	Plántulas/tratamiento	Suspensión/planta (mL)	Producto comercial /planta (mL)
Edáfica	480	20	500	20	25	1
Foliar	480	20	500		25	1
Total, por microorganismo	960	40	1000	20	50	2

Fuente: Elaboración propia

2.7.6 Plan de fertilización

Con el propósito de mantener una adecuada disponibilidad de nutrientes durante el desarrollo de las plántulas en vivero, se realizó un plan de fertilización mediante la aplicación de un fertilizante granular completo (12+11+18+micronutrientes) como complemento nutricional del sustrato. La fertilización constituye una práctica de manejo recomendada para favorecer el crecimiento inicial y el desarrollo de las plantas de cacao, proporcionando los macronutrientes esenciales para su establecimiento (Merchán *et al.*, 2017).

Durante el periodo experimental se efectuaron dos aplicaciones de fertilizantes distribuidas a lo largo de los meses de evaluación, utilizando una dosis de 8 g por planta en cada fertilización, para una dosis acumulada de 16 g por planta. En total, se emplearon 3200 g de fertilizante para las plantas establecidas en el experimento.

Tabla 9 Dosificaciones de fertilizante por planta

Fuente	Dosis/aplicación (g/planta)	Número de aplicaciones	Dosis/planta (g)	Dosis total del experimento (g)
Abono completo (12+11+18 + micronutrientes)	8	2	16	3200

2.8 Parámetros evaluados

La evaluación de las variables morfológicas se realizó cada 7 días después de la germinación de las semillas, con el objetivo de determinar el crecimiento y desarrollo de las plántulas de cacao en vivero.

2.8.1 Variables de caracterización inicial

- **Suelo y grano:** Las concentraciones de cadmio en las muestras de suelo y grano de cacao fueron determinadas en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). El análisis se realizó mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X de alta definición (HDXRF), previa preparación de las muestras conforme al protocolo establecido por el laboratorio. Los resultados fueron expresados en mg Kg^{-1} de peso seco, con un límite de detección de 0.05 mg Kg^{-1} (Martínez *et al.*, 2023).
- **pH y Conductividad eléctrica:** Para esta variable se utilizó la metodología propuesta por Silva *et al.* (2021) tomando 20 g de suelo colocados en un vaso de precipitación, al cual se le añadieron 20 mL de agua destilada y se agitó durante 30 minutos. Posteriormente, la suspensión se dejó reposar durante 12 horas y luego se filtró mediante un papel filtro para obtener el extracto. El pH fue determinado utilizando un potenciómetro calibrado y la conductividad eléctrica mediante un conductímetro ajustado, registrando los resultados en unidades de pH y $\mu\text{S/cm}$ respectivamente.

2.8.2 Variables germinativas

Germinación (%): El número de semillas germinadas se consideró la emergencia de los cotiledones. El porcentaje de germinación se calculó de la siguiente manera (Gaibor, 2023):

Formula 3:

$$\% G = (Sg/Ss) \times 100$$

donde

Sg= n° de semillas que germinan

Ss = n° total de semillas sembradas

Tiempo de emergencia (%): Se registró el número de días transcurridos desde la siembra hasta la emergencia de la plántula, la información se expresó como porcentaje, calculándose en función del número de plántulas emergidas respecto al total de semillas establecidas.

2.8.3 Variables morfológicas

Altura de planta (cm): Se midió desde la superficie del sustrato hasta la parte apical de la planta, es decir, hasta el último brote del tallo (Ñahuirima, 2019).

Diámetro del tallo (mm): Se midió 2 cm por encima de la superficie del sustrato (Ñahuirima, 2019).

Número de hojas (U): Se registró semanalmente contando las hojas completamente desarrollada (Zambrano, 2013).

Índice de vigor (cm³): Se determinó utilizando los datos de circunferencia del tallo (transformado primero a cm), altura de planta y diámetro de corona, aplicando la siguiente formula (Loor *et al.*, 2016):

Formula 4:

$$IV = \frac{C^2}{4} \sqrt{H^2} \times \frac{L^2}{4}$$

Donde

IV = índice de vigor (cm)

C = Circunferencia de tallo (cm)

H = Altura de la planta (cm)

L = Diámetro de la corona foliar (cm)

2.8.3.1 Variable fisiológica

Estado fotosintético: Los valores obtenidos mediante medidor de SPAD fueron utilizados como un indicador indirecto del contenido de clorofila y del estado fotosintético de las plántulas. De acuerdo con los rangos reportados para cacao por Suárez *et al.* (2022) y Weinstein *et al.* (2025), valores inferiores a 40 unidades SPAD pueden asociarse con una reducción del contenido de clorofila y condiciones de estrés, mientras que valores superiores a 60 unidades SPAD reflejan una adecuada concentración de clorofila y un mejor desempeño fotosintético.

Tabla 10 Criterios de evaluación de estado fotosintético

Valor de SPAD	Interpretación	Estado fotosintético
< 30	Muy bajo	Estrés severo, deficiencia nutricional
30-40	Bajo	Estrés leve, baja concentración de clorofila
40 – 50	Medio	Desarrollo estable, pero con limitaciones
> 50	Bueno	Adecuada concentración de clorofila y estado nutricional óptimo.

Elaboración propia con base en (Suárez *et al.*, 2022; Weinstein *et al.*, 2025).

2.8.4 Variable radicular

Longitud de raíz (cm): Para esta variable se utilizó la metodología propuesta por Osorio *et al.* (2017), donde las plántulas serán extraídas cuidadosamente del sustrato para evitar daño en el sistema radicular. Posteriormente, se realizó el lavado de las raíces con agua destilada para retirar residuos de suelo y se midió la longitud de la raíz principal desde el cuello de la planta hasta el ápice radicular utilizando una cinta métrica.

2.9 Análisis estadístico de los resultados

Dado que la investigación se desarrolló en dos fases, el procesamiento y análisis de los datos se realizó de acuerdo con cada etapa. En la primera fase, correspondiente a la determinación de las concentraciones de Cd en suelo y grano de cacao, los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva. En la segunda fase, correspondiente a la evaluación de la respuesta germinativa, morfológica, fisiológica y radicular de las plántulas, se verificó previamente la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk.

Posteriormente, se aplicó un Diseño Completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2×5 , considerando como factores la procedencia del sustrato y los microorganismos aplicados. Las cinco plántulas correspondientes a cada repetición fueron consideradas como submuestras, por lo que para cada variable se calculó el promedio de las cinco plantas por repetición, utilizando este valor como unidad de observación para el análisis estadístico. De esta manera, se trabajó con 40 unidades de observación, correspondientes a 10 tratamientos y cuatro repeticiones. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de la procedencia del sustrato, los microorganismos y su interacción. Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Concentraciones de cadmio en suelo y grano de cacao

3.1.1 Suelo

Los valores de cadmio (Cd) determinados en las muestras de suelo oscilaron entre 0.21 y 0.28 mg Kg⁻¹ de materia seca (Tabla 11). El valor más alto se registró en la muestra correspondiente al sitio de Río Verde a una profundidad de 0-25 cm (0.28 mg Kg⁻¹ de materia seca), mientras que el menor se obtuvo en la muestra del sitio Cerecita a la misma profundidad (0.21 mg Kg⁻¹ de materia seca).

Las concentraciones de cadmio obtenidas en la presente investigación difieren de las reportadas por Argüello *et al.* (2019), Gramlich *et al.* (2017) y Mite *et al.* (2010) quienes encontraron que la mayor acumulación de este metal se presenta en la capa superficial del suelo (0-15 cm), con concentraciones medias de 1.53, 0.91 y 2.53 mg Kg⁻¹ de materia seca, respectivamente. Aunque dichos estudios también identificaron la mayor concentración que en el estrato superficial.

Estas diferencias pueden atribuirse a diversos factores, entre ellos el material parental del suelo, las propiedades fisicoquímicas, el contenido de materia orgánica, el pH, las prácticas de manejo agronómicas y el uso continuo de fertilizantes u otros agroquímicos fosfatados. En este sentido, Gramlich *et al.* (2017) señalaron que la materia orgánica mantiene una relación inversa con el contenido de cadmio, debido a que favorece la adsorción e inmovilización del metal, reduciendo su movilidad y disponibilidad.

De acuerdo con López *et al.* (2021), el cadmio está presente de forma natural en los suelos como resultado de procesos geológicos, entre ellos la meteorización de rocas, la pedogénesis de materiales volcánicos y sedimentarios, los fosfatos marinos, la actividad volcánica, la erosión y la deposición de sedimentos, siendo la roca madre el principal factor que determina su concentración natural. Estos autores indican que, en condiciones naturales, el cadmio generalmente se encuentra en concentraciones inferiores a 1.20 mg Kg⁻¹ de materia seca, mientras que en situaciones externas de contaminación natural puede alcanzar hasta 100 mg Kg⁻¹ de materia seca.

Asimismo, señalan que las fuentes naturales representan aproximadamente el 10% del aporte total de cadmio al ambiente, mientras que el porcentaje restante proviene de

actividades antropogénicas, como la minería, la fundición de metales, el uso continuo de fertilizantes fosfatados, algunos productos fitosanitarios, estiércoles, lodos residuales. Sin embargo, la acumulación y biodisponibilidad del metal dependen de las propiedades fisicoquímicas del suelo.

En este contexto, las concentraciones registradas en las muestras evaluadas (0.21 y 0.28 mg Kg⁻¹ de materia seca) se encuentran dentro del rango considerado natural para suelos no contaminados. No obstante, estos resultados constituyen un diagnóstico descriptivo de los puntos de muestreo analizados y no permiten realizar una inferencia sobre el comportamiento del cadmio en toda la zona. Aun así, los valores obtenidos son consistentes con la influencia conjunta de factores geogénicos y de las propiedades edáficas, como el pH, la materia orgánica y la textura, que regula la movilidad, retención y biodisponibilidad del cadmio en el suelo.

Tabla 11 Concentraciones de cadmio (mg Kg⁻¹ de materia seca) determinadas en las muestras de suelo según sitio y profundidad de muestreo.

Sitio de muestreo	Prof. (cm)	Cd (mg Kg ⁻¹ de materia seca)
Río Verde	0-25	0.28
Río Verde	50	0.27
Cerecita	0-25	0.21
Cerecita	50	0.24

3.1.2 Grano

Los resultados del análisis de cadmio (Cd) en el grano mostraron diferencias entre las muestras evaluadas. La muestra procedente de Río Verde, correspondiente al material genético Nacional, presentó una concentración de 0.48 mg Kg⁻¹ de materia seca, mientras que la muestra procedente de Cerecita, correspondiente al material genético CCN-51, registró 1.74 mg Kg⁻¹ de materia seca (Tabla 12).

En las muestras analizadas, el mayor contenido de Cd se registró en el grano procedente de Cerecita (CCN-51). Sin embargo, debido a que cada localidad estuvo representada por un único material genético, las diferencias observadas describen únicamente el comportamiento de las muestras estudiadas y no permiten atribuir el mayor

contenido de cadmio exclusivamente al genotipo o a condiciones de la localidad, ya que ambos factores variaron simultáneamente.

A pesar de que las concentraciones de Cd en el suelo fueron bajas en ambos sitios de muestreo, los resultados obtenidos en el grano evidencian que la concentración de este metal en las almendras no guarda necesariamente una relación directa con el contenido total de Cd determinado en el suelo. Este comportamiento sugiere que la acumulación de cadmio en el grano puede estar influenciada por múltiples factores asociados al sistema suelo-planta.

En este sentido, Vanderschueren *et al.* (2023), mediante un experimento de marcaje isotópico con ^{108}Cd , demostraron que el cadmio es absorbido principalmente en forma de Cd^{2+} . Debido a que este ion presenta propiedades fisicoquímicas similares a las de cationes esenciales como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} , puede utilizar los mismos transportadores de membrana responsables de la absorción de nutrientes, favoreciendo su ingreso a las raíces incluso cuando las concentraciones disponibles en el suelo son relativamente bajas.

Por ende, estos resultados, concuerdan con lo reportado por Lewis *et al.* (2018), quienes evaluaron 77 genotipos de cacao bajo condiciones edáficas similares y encontraron concentraciones de cadmio en el grano entre 0.17 y 2.31 mg Kg^{-1} de materia seca, evidenciando que la acumulación del metal no depende exclusivamente de la disponibilidad de cadmio en el suelo, sino también de la capacidad genética de cada material para bioacumular, transportar y distribuir hacia los órganos productivos. No obstante, dichos resultados corresponden a un diseño experimental que permitió evaluar específicamente el efecto del material genético, condiciones que difieren de la presente investigación.

Por otra parte, Barrezueta *et al.* (2021), al comparar los genotipos Nacional y CCN-51 en tres fincas cacaoteras de Ecuador, reportaron concentraciones de cadmio en el grano entre 1.15 y 1.93 mg Kg^{-1} de materia seca, así como variaciones en hojas y testa. Los autores señalaron que la acumulación del metal estuvo influenciada tanto por el material genético como por factores edáficos.

Por el contrario, Freire *et al.* (2025) evaluaron siete genotipos de cacao y observaron diferencias en la absorción, translocación y bioacumulación de cadmio. En particular, el clon CCN-51 presentó una mayor capacidad de absorción y acumulación del metal en los tejidos

aéreos, mientras que otros genotipos, como EET-95 y EET-399, mostraron una menor acumulación y una mejor eficiencia en la translocación desde la raíz hacia la parte aérea.

En conjunto, estos antecedentes muestran que tanto las características genéticas como las condiciones edáficas pueden influir en la acumulación de cadmio en el cacao. En la presente investigación, las diferencias observadas entre las muestras de Río Verde (Nacional) y Cerecita (CCN-51) son consistentes con la variabilidad genética reportada en la literatura; sin embargo, debido al diseño de muestreo empleado, no es posible establecer si dichas diferencias se deben al material genético, a la localidad de procedencia o a la interacción entre ambos factores.

Tabla 12 Concentraciones de cadmio (mg Kg^{-1} de materia seca) en grano de cacao según zona y material genético.

Sitio	Material genético	Cd (mg Kg^{-1} de materia seca)
Río Verde	Nacional	0.48
Cerecita	CCN-51	1.74

3.2 Respuesta germinativa de plántulas de cacao

3.2.1 Porcentaje de germinación (%)

El porcentaje de germinación (%G) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p = 0.7176$), lo que indica que la interacción entre la zona de estudio y los microorganismos no influyó en la respuesta germinativa de las semillas.

Los mayores porcentajes de germinación se registraron en los tratamientos T3 ($A1 \times B3$) y T4 ($A1 \times B4$), ambos con 75%, lo que indica que la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* favoreció el proceso de germinación de las semillas. En contraste, el tratamiento T9 ($A2 \times B4$) presentó la menor respuesta, con 30% de germinación.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Khaeruni *et al.* (2020), quienes evaluaron diez aislados de bacterias endófitas, provenientes de plantas sanas de cacao, y encontraron que tres de ellos incrementaron la capacidad germinativa de las semillas hasta 96.67%, además de mejorar la uniformidad de la emergencia, la altura de las plántulas, el peso seco de la raíz. Los autores atribuyeron este comportamiento a la capacidad de los microorganismos para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir ácido indolacético,

mecanismos que favorecen el establecimiento inicial y el desarrollo de las plántulas de cacao.

Por otra parte, Falcão *et al.* (2014), quienes inocularon semillas germinadas de cacao con *Bacillus subtilis* ALB629 y observaron incrementos de hasta 30% en el desarrollo radicular, 14% en el área foliar y 7.6% en la altura, además de un aumento del injerto. Los autores atribuyeron este comportamiento a la capacidad del *Bacillus subtilis* para colonizar los tejidos vegetales desde las etapas iniciales del desarrollo y promover el crecimiento de las plántulas mediante diferentes mecanismos fisiológicos.

Estos antecedentes respaldan que la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal puede favorecer la germinación y el establecimiento inicial de las plántulas de cacao. Este efecto se atribuye principalmente a la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fósforo, procesos que incrementan la disponibilidad de nutrientes y estimulan la actividad metabólica durante la germinación, favoreciendo una emergencia más rápida y uniforme de las semillas.

Tabla 13 Porcentaje de germinación (%) de plántulas de cacao cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismos benéficos.

		G	Porcentaje de Germinación	N	
			%G5		
Factor A	A1	1	67.00 a	40	
	A2		39. 00 b		
Factor B	B1	4	47.50 a		
	B2		57.50 a		
	B3		57.50 a		
	B4		52.50 a		
	B5		50.00 a		
Tratamientos					
T1 (A1 × B1)			60.00 a		
T2 (A1 × B2)			70.00 a		
T3 (A1 × B3)		4	75.00 a		
T4 (A1 × B4)			75.00 a		
T5 (A1 × B5)			55.00 a		

T6 (A2 × B1)	35.00 a
T7 (A2 × B2)	45.00 a
T8 (A2 × B3)	40.00 a
T9 (A2 × B4)	30.00 a
T10 (A2 × B5)	45.00 a
A × B	0
Error experimental	30
Total	39
CV (%)	47.98
Probabilidad (Tratamientos)	0.7176
Probabilidad (FA)	0.0015
Probabilidad (FB)	0.9090
Probabilidad (A × B)	0.0000

*%G= Porcentaje de germinación 5 días. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma* spp. *B2=*Aspergillus* spp, *B3=*Bacillus subtilis*. *B4=*Pseudomonas* spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no difieren estadísticamente.

3.2.2 Porcentaje de emergencia (%)

Los resultados del análisis de varianza para el tiempo de emergencia a los 15 días (%E15) no evidenciaron diferencias entre los tratamientos ($p = 0.9251$).

Los porcentajes de emergencia oscilaron entre el 91.75% y 100%, indicando que, independientemente de la zona de estudio o del microorganismo aplicado, la mayoría de las plántulas completaron su emergencia al finalizar el periodo de evaluación.

La elevada emergencia registrada al finalizar el proceso de germinación sugiere que las plántulas lograron establecerse adecuadamente en los sustratos evaluados. Este comportamiento puede relacionarse con el efecto fisiológico que ejercen los microorganismos sobre la semilla durante la germinación. de Sousa *et al.* (2021) reportan que la inoculación de semillas de cacao con *Trichoderma* spp. permitió obtener porcentajes de emergencia superiores al 95 %, además de incrementar el crecimiento radicular, favoreciendo el establecimiento inicial de las plántulas. De forma semejante, Ferrás *et al.* (2022) encontraron que la inoculación con *Pseudomonas* spp. incrementó la emergencia de semillas de cacao y promovió un mayor desarrollo vegetativo, atribuyendo estos efectos a la producción de fitohormonas y otros metabolitos. Estos resultados respaldan lo observado en

los resultados obtenidos en la presente investigación, donde los tratamientos inoculados alcanzaron una emergencia más rápida durante los primeros diez días.

Por otra parte, las concentraciones de cadmio determinadas en los sustratos de la presente investigación (0.21-0.28 mg Kg⁻¹ de materia seca) fueron inferiores a las evaluadas por Acosta (2013), quien no encontró efectos negativos sobre la emergencia de las semillas de cacao bajo concentraciones considerablemente mayores de cadmio. Asimismo, Yang *et al.* (2025) indicaron que microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* y *Trichoderma spp.* pueden incrementar la tolerancia de las semillas al estrés ocasionado por metales pesados mediante la producción de compuestos promotores del crecimiento, favoreciendo una emergencia más uniforme.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los porcentajes de emergencia registrados reflejan un adecuado establecimiento de las plántulas en todos los tratamientos. Considerando los antecedentes disponibles, es posible que la acción de los microorganismos promotores de crecimiento y las condiciones de los sustratos hayan contribuido a este comportamiento; sin embargo, los resultados obtenidos no pueden atribuir dicho efecto exclusivamente a la concentración de cadmio o a algunos factores de manera independiente.

Tabla 14 Porcentaje de emergencia (%) de plántulas de cacao a los 15 días, cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismos benéficos.

		G	Porcentaje de emergencia	N
			%E15	
Factor A	A1	1	97.33 a	
	A2		95.00 a	
Factor B	B1	4	100.00 a	
	B2		95.83 a	
	B3		91.67 a	
	B4		93.33 a	
	B5		100.00 a	
Tratamientos				
T1 (A1 × B1)		4	100.00 a	40

T2 (A1 × B2)	100.00 a
T3 (A1 × B3)	91.67 a
T4 (A1 × B4)	95.00 a
T5 (A1 × B5)	100.00 a
T6 (A2 × B1)	100.00 a
T7 (A2 × B2)	91.67 a
T8 (A2 × B3)	91.67 a
T9 (A2 × B4)	91.67 a
T10 (A2 × B5)	100.00 a
A × B	0
Error experimental	30
Total	39
CV(%)	11.44
Probabilidad (Tratamientos)	0.9251
Probabilidad (FA)	0.5077
Probabilidad (FB)	0.4468
Probabilidad (A × B)	0.0000

**%E= Porcentaje de emergencia 15 días. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= Trichoderma spp. *B2=Aspergillus spp, *B3=Bacillus subtilis. *B4=Pseudomonas spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.*

3.3 Respuesta morfológica de plántulas de cacao

3.3.1 Altura de planta (cm)

Los resultados del análisis de varianza para la altura de planta a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia mostraron que los efectos principales de la procedencia del suelo (FA) y de los microorganismos aplicados (FB) no fueron significativos ($p > 0.05$) en ninguna de las evaluaciones.

La altura de las plántulas incrementó progresivamente a lo largo del periodo de evaluación. En la evaluación inicial, realizada a los 7 días después de la emergencia, los valores registrados entre tratamientos oscilaron entre 13.57 y 16.78 cm. El mayor valor correspondió al tratamiento T4 (A1 × B4), con 16.78 cm, mientras que el menor se observó

en T2 (A1 × B2), con 13.57 cm. Finalmente, a los 28 días, la altura osciló entre 16.50 y 21.73 cm, correspondientes a T2 y T6, respectivamente.

Al analizar los factores principales, el suelo procedente de Río Verde (A2) presentó valores medios de altura ligeramente superiores a los obtenidos con el suelo de Cerecita (A1). A los 28 días, A2 alcanzó una media de 19.51 cm, mientras que A1 presentó 18.63 cm. No obstante, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.4712$). De manera similar, entre los microorganismos evaluados, el tratamiento testigo (B5) presentó la mayor media de altura a los 28 días, con 19.95 cm, seguido de *Trichoderma spp.* (B1), con 19.79 cm, mientras que *Aspergillus spp.* (B2) registró el menor valor, con 17.85 cm. Sin embargo, el efecto principal de los microorganismos tampoco fue significativo ($p = 0.8082$).

Este comportamiento coincide con lo reportado por de Sousa *et al.* (2021), quienes evaluaron el efecto de diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* sobre plántulas de cacao durante seis meses. Los resultados reportaron que al tercer mes la altura de las plantas osciló entre 24.5 y 30.0 cm, mientras que al sexto mes alcanzó valores entre 27.6 y 34.3 cm, sin tener diferencias respecto a los tratamientos. Los autores atribuyen este comportamiento al tiempo requerido para que el hongo colonice la rizósfera y produzca fitohormona, mejorando la absorción de nutrientes y el crecimiento vegetal.

De manera semejante, Vallejos *et al.* (2026) encontraron que la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares produjo alturas entre 31.47 y 42.89 cm después de 90 días, valores considerablemente superiores a los obtenidos en esta investigación. Esta diferencia puede explicarse por el mayor tiempo de crecimiento evaluado, ya que las simbiosis micorrízicas requieren varias semanas para establecerse completamente y mejoran la absorción de fósforo, nitrógeno y agua.

El comportamiento observado también puede relacionarse con la presencia de cadmio en los suelos utilizando como sustrato. En la investigación, las concentraciones variaron entre 0.21 y 0.28 $mg\ Kg^{-1}$, niveles considerados bajos. Mientras que Correa *et al.* (2021) evaluaron plántulas de cacao expuestas durante 120 días a concentraciones cercanas a 5 $\mu g/g$ de Cd, encontraron reducciones significativas en la altura y en la acumulación de biomasa. Estos resultados sugieren que las concentraciones de cadmio presentes en los suelos de las zonas evaluadas no se mostraron diferencias significativas en la altura bajo las condiciones y periodo evaluados.

Finalmente, Blommaert *et al.* (2022) demostraron que durante las primeras etapas del desarrollo de las plántulas de cacao, el crecimiento de la biomasa puede estar fuertemente influenciado por las reservas disponibles en la semilla, permitiendo un rápido desarrollo inicial de la planta. Este comportamiento guarda relación con la tendencia observada en la presente investigación, donde la altura aumentó de manera general entre los 7 y 28 días, independientemente de la procedencia del suelo y del microorganismo aplicado.

En conjunto, los resultados indican que durante las primeras cuatro semanas de desarrollo la altura de las plántulas estuvo caracterizada por un incremento progresivo. La procedencia del suelo y los microorganismos, considerados de manera independiente, no modificaron significativamente esta variable.

Tabla 15 Altura de planta (cm) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia, cultivadas en sustratos preparados con suelos de las zonas de estudio e inoculados con microorganismos benéficos.

		G	Altura de la planta (cm)				N
			AP 7	AP 14	AP 21	AP 28	
Factor A	A1	1	15.50 a	18.11 a	18.48 a	18.63 a	
	A2		15.68 a	18.82 a	19.49 a	19.51 a	
Factor B	B1	4	15.65 a	18.81 a	19.75 a	19.79 a	
	B2		14.63 a	17.64 a	17.83 a	17.85 a	
	B3		15.85 a	18.24 a	19.14 a	19.01 a	
	B4		15.31 a	18.49 a	18.64 a	18.73 a	
	B5		16.53 a	19.16 a	19.57 a	19.95 a	
Tratamientos							
T1 (A1 × B1)			14.95 a	17.01 a	17.92 a	17.86 a	
T2 (A1 × B2)			13.57 a	16.44 a	16.36 a	16.50 a	
T3 (A1 × B3)			15.86 a	17.78 a	18.28 a	18.18 a	
T4 (A1 × B4)			16.78 a	20.30 a	20.49 a	20.58 a	
T5 (A1 × B5)			16.36 a	19.02 a	19.38 a	20.01 a	40
T6 (A2 × B1)			16.35 a	20.61 a	21.59 a	21.73 a	
T7 (A2 × B2)			15.70 a	18.83 a	19.30 a	19.20 a	
T8 (A2 × B3)			15.84 a	18.69 a	20.00 a	19.85 a	
T9 (A2 × B4)			13.83 a	16.68 a	16.79 a	16.88 a	

T10 (A2 × B5)	16.71 a	19.30 a	19.76 a	19.88 a
A × B	0			
Error experimental	30			
Total	39			
CV(%)	20.17	19.89	19.53	20.00
Probabilidad (Tratamientos)	0.5561	0.3668	0.3184	0.3314
Probabilidad (FA)	0.8560	0.5439	0.3996	0.4712
Probabilidad (FB)	0.8094	0.9372	0.8410	0.8082
Probabilidad (A × B)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

*AP= Altura de planta 7, 14, 21 y 28 días. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma* spp. *B2=*Aspergillus* spp, *B3=*Bacillus subtilis*. *B4=*Pseudomonas* spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.

3.3.2 Diámetro de tallo (mm)

Los resultados del análisis de varianza para el diámetro de tallo a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia mostraron que los efectos principales de la procedencia del suelo (FA) y de los microorganismos aplicados (FB) no presentaron diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones ($p > 0.05$). De igual manera, el efecto de los tratamientos considerados de forma global no fue significativo.

El diámetro del tallo mostró un incremento gradual conforme avanzó el desarrollo de las plántulas. En la evaluación inicial, realizada a los 7 días después de la emergencia, los valores registrados entre los tratamientos oscilaron entre 2.49 y 3.04 mm, correspondiendo el mayor valor al tratamiento T1 (A1 × B1), con 3.04 mm, mientras que el menor se presentó en T3 (A1 × B3), con 2.49 mm. Finalmente, a los 28 días, los valores estuvieron comprendidos entre 3.32 y 3.65 mm, correspondiendo el mayor diámetro a T1 (A1 × B1) y el menor a T2 (A1 × B2).

Al considerar los factores principales, las medias correspondientes a la procedencia del suelo fueron muy similares. A los 7 días, el suelo de Cerecita (A1) presentó un diámetro medio de 2.74 mm, mientras que Río Verde (A2) alcanzó 2.71 mm. A los 28 días, ambas procedencias registraron una media de 3.43 mm. De manera similar, los microorganismos evaluados no produjeron diferencias significativas en el diámetro de tallo. A los 28 días, *Trichoderma* spp. (B1) presentó la mayor media, con 3.54 mm, mientras que *Aspergillus*

spp. (B2) presentó la menor media, con 3.38 mm. No obstante, estas diferencias fueron únicamente numéricas, debido a que los valores de probabilidad para el factor B fueron superiores a 0.05 en todas las fechas de evaluación.

Este comportamiento difiere parcialmente con lo reportado por Burgos (2024), quien evaluó la aplicación de *Bacillus subtilis* (cepa = DMS18695) en plántulas de cacao sometidas a diferentes concentraciones de cadmio y obtuvo un diámetro máximo de 4.34 mm en plantas inoculadas sin exposición al metal, mientras que las sometidas a 10 ppm de Cd sin inoculación alcanzaron únicamente 2.35 mm. El autor atribuyó estos resultados a la capacidad de *B. subtilis* para promover el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, el incremento en la disponibilidad de nutrientes y la mitigación del estrés ocasionado por el cadmio. En contraste, en la presente investigación, *Bacillus subtilis* presentó valores numéricamente similares a los demás tratamientos y no produjo un efecto significativo como factor independiente. Esta diferencia puede estar relacionada con las condiciones experimentales, la concentración de Cd, el tiempo de evaluación y las características del sustrato utilizado.

Asimismo, Correa *et al.* (2021) señalaron que el crecimiento de las plántulas de cacao no depende únicamente de la concentración de cadmio, sino también de las propiedades físicas y químicas del suelo, las cuales pueden modificar la disponibilidad del metal para la planta. En su estudio, los suelos con mayor contenido de arcilla acumularon hasta 12.40 µg/g de Cd, mientras que aquellos con mayor contenido de materia orgánica presentaron una acumulación menor, de hasta 7.25 µg/g, reduciendo potencialmente los efectos negativos sobre el crecimiento. En la presente investigación, las concentraciones de Cd de los suelos utilizados como sustrato fueron considerablemente menores, entre 0.21 y 0.28 mg kg⁻¹, por lo que no se evidenció una limitación marcada del engrosamiento del tallo durante el periodo de evaluación.

En conjunto, los resultados muestran que el diámetro de tallo presentó un incremento continuo desde los 7 hasta los 28 días después de la emergencia. Las medias de los factores A y B no presentaron diferencias estadísticas significativas, evidenciándose valores

relativamente próximos entre las procedencias de suelo y entre los microorganismos evaluados.

Tabla 16 Diámetro de tallo (mm) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia, en función de la interacción entre los sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio y los microorganismos evaluados.

		G	Diámetro de tallo (mm)				N
			DT 7	DT 14	DT 21	DT 28	
Factor A	A1	1	2.74 a	3.10 a	3.21 a	3.43 a	40
	A2		2.71 a	3.15 a	3.30 a	3.43 a	
Factor B	B1	4	2.80 a	3.06 a	3.31 a	3.54 a	
	B2		2.69 a	3.15 a	3.19 a	3.38 a	
	B3		2.63 a	3.16 a	3.24 a	3.43 a	
	B4		2.79 a	3.13 a	3.23 a	3.41 a	
	B5		2.72 a	3.14 a	3.28 a	3.41 a	
Tratamientos							
T1 (A1 × B1)		4	3.04 a	3.05 a	3.40 a	3.65 a	
T2 (A1 × B2)			2.66 a	3.09 a	3.07 a	3.32 a	
T3 (A1 × B3)			2.49 a	3.13 a	3.13 a	3.40 a	
T4 (A1 × B4)			2.78 a	3.13 a	3.24 a	3.42 a	
T5 (A1 × B5)			2.74 a	3.11 a	3.20 a	3.38 a	
T6 (A2 × B1)			2.56 a	3.07 a	3.22 a	3.43 a	
T7 (A2 × B2)			2.72 a	3.21 a	3.32 a	3.45 a	
T8 (A2 × B3)			2.76 a	3.20 a	3.36 a	3.46 a	
T9 (A2 × B4)			2.80 a	3.13 a	3.23 a	3.39 a	
T10 (A2 × B5)			2.71 a	3.17 a	3.36 a	3.44 a	
A × B		0					
Error experimental		30					
Total		39					
CV(%)			16.88	5.31	6.11	6.26	
Probabilidad (Tratamientos)			0.5858	0.9450	0.1701	0.5245	
Probabilidad (FA)			0.8141	0.3258	0.1714	0.9999	
Probabilidad (FB)			0.9362	0.7583	0.8014	0.6415	

Probabilidad (A × B)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
----------------------	--------	--------	--------	--------

*DT= Diámetro de tallo 7, 14, 21 y 28 días. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma spp.* *B2=*Aspergillus spp.* *B3=*Bacillus subtilis.* *B4=*Pseudomonas spp.* *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.

3.3.3 Índice de vigor (cm³)

Los resultados del análisis de varianza para el índice de vigor (IV) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, con un valor de $p = 0.4904$. De igual manera, los efectos principales de la procedencia del suelo (FA) y de los microorganismos aplicados (FB) no presentaron diferencias significativas, con valores de $p = 0.1083$ y $p = 0.4520$, respectivamente. Por tanto, las variaciones observadas en el índice de vigor entre las combinaciones evaluadas fueron únicamente numéricas y no evidenciaron un efecto estadísticamente significativo de los tratamientos sobre esta variable.

Al finalizar la evaluación, el índice de vigor presentó valores comprendidos entre 42.98 y 75.83 cm³. El mayor valor correspondió al tratamiento T7 (A2 × B2), con 75.83 cm³, constituido por el suelo de Río Verde inoculado con *Aspergillus spp.* En contraste, el menor valor se registró en T1 (A1 × B1), con 42.98 cm³, correspondiente al suelo de Cerecita inoculado con *Trichoderma spp.* El tratamiento testigo T5 (A1 × B5) presentó un valor de 61.88 cm³, mientras que T10 (A2 × B5) alcanzó 58.72 cm³. No obstante, estas diferencias fueron únicamente numéricas, debido a que las medias no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

Al considerar la procedencia del suelo, el índice de vigor fue numéricamente superior en las plántulas cultivadas con el suelo de Río Verde (A2), con una media de 61.49 cm³, frente a 50.05 cm³ registrados en el suelo de Cerecita (A1). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.1083$). Esto indica que, bajo las condiciones y el periodo de evaluación del presente estudio, la procedencia del suelo por sí sola no produjo un efecto significativo sobre el índice de vigor de las plántulas. Respecto a los microorganismos, *Aspergillus spp.* (B2) presentó el mayor valor medio de índice de vigor, con 64.53 cm³. Por otro lado, *Trichoderma spp.* (B1) registró el menor valor medio, con 46.96 cm³. Sin embargo, estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas ($p = 0.4520$), por lo que no es posible atribuir al microorganismo aplicado un efecto diferencial sobre el índice de vigor durante el periodo evaluado.

Estos resultados pueden compararse con el estudio desarrollado por Fiodor *et al.* (2023), quienes aislaron 156 cepas bacterianas provenientes de suelos rizosféricos, arenas desérticas y sedimentos marinos. Después de seleccionar las cepas con capacidad para solubilizar fósforo y potasio, producir ácido indolacético y expresar otras características promotoras del crecimiento vegetal, los autores observaron que únicamente algunas cepas incrementaron significativamente el vigor de las plántulas, mientras que otras no produjeron respuestas favorables. Los autores señalaron que la respuesta depende de la eficiencia de cada cepa y de su interacción con la especie vegetal y las condiciones ambientales. Este comportamiento permite explicar parcialmente los resultados obtenidos en la presente investigación, donde los microorganismos evaluados presentaron diferencias numéricas en el índice de vigor, pero sin alcanzar significancia estadística.

De igual manera, Falcão *et al.* (2014) evaluaron el efecto del endófito *Bacillus subtilis* (cepa ALB629) sobre plántulas de cacao inoculadas mediante inmersión de semillas germinadas en una suspensión bacteriana. Los autores observaron incrementos en el desarrollo radicular, área foliar y altura de las plantas, atribuyendo estos efectos a la capacidad de la bacteria para estimular el crecimiento vegetal. En la presente investigación, *Bacillus subtilis* presentó un índice de vigor medio de 58.05 cm³, superior al registrado con *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.*; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esto evidencia que la respuesta de un microorganismo promotor del crecimiento puede variar según las condiciones experimentales, la cepa utilizada, el sustrato y el tiempo de evaluación.

Por otra parte, García *et al.* (2025) señalaron que la respuesta de bacterias y hongos promotores del crecimiento en cacao puede estar condicionada por factores como el genotipo de la planta, las propiedades fisicoquímicas del suelo, la microbiota nativa y las condiciones ambientales. Además, los autores destacan que la eficacia de un microorganismo puede variar entre localidades, aun cuando se utilice la misma especie microbiana. Esta consideración resulta relevante para interpretar los valores obtenidos en el presente estudio, debido a que el mayor índice de vigor se registró con *Aspergillus spp.* en el suelo de Río Verde (T7), mientras que el menor se presentó con *Trichoderma spp.* en el suelo de Cerecita (T1), evidenciando una respuesta numéricamente diferenciada entre las combinaciones de suelo y microorganismo.

En conjunto, los resultados indican que el índice de vigor presentó una variación numérica entre los tratamientos evaluados, con valores de 42.98 a 75.83 cm³. El mayor índice correspondió a T7 (A2 × B2), mientras que el menor se registró en T1 (A1 × B1). Asimismo, el suelo de Río Verde presentó una media de IV superior a la del suelo de Cerecita y *Aspergillus spp.* alcanzó la mayor media entre los microorganismos evaluados. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa. Por tanto, bajo las condiciones del presente estudio, no se evidenció un efecto significativo de la procedencia del suelo, de los microorganismos ni de los tratamientos sobre el índice de vigor de las plántulas de cacao.

Tabla 17 Índice de vigor (cm³) de plántulas de cacao en función de la interacción entre los sustratos con suelos de las zonas de estudio y los microorganismos

		G	Índice de Vigor (cm³)				N	
			DT (cm)	AP (cm)	DC (cm)	IV (cm³)		
Factor A	A1	1	0.31 a	20.76 a	19.44 a	50.05 a	40	
	A2		0.32 a	20.65 a	21.25 a	61.49 a		
Factor B	B1	4	0.31 a	19.44 a	19.52 a	46.96 a		
	B2		0.30 a	21.08 a	21.73 a	64.53 a		
	B3		0.32 a	21.02 a	20.41 a	58.05 a		
	B4		0.31 a	21.04 a	19.69 a	49.01 a		
	B5		0.33 a	20.59 a	20.37 a	60.30 a		
Tratamientos								
T1 (A1 × B1)		4	0.31 a	19.15 a	18.60 a	42.98 a		
T2 (A1 × B2)			0.29 a	20.78 a	20.20 a	53.23 a		
T3 (A1 × B3)			0.31 a	21.21 a	18.46 a	42.99 a		
T4 (A1 × B4)			0.31 a	21.35 a	19.55 a	49.16 a		
T5 (A1 × B5)			0.33 a	21.33 a	20.40 a	61.88 a		
T6 (A2 × B1)			0.32 a	19.74 a	20.44 a	50.95 a		
T7 (A2 × B2)			0.32 a	21.38 a	23.26 a	75.83 a		
T8 (A2 × B3)			0.34 a	20.83 a	22.36 a	73.11 a		
T9 (A2 × B4)			0.31 a	20.74 a	19.83 a	48.86 a		
T10 (A2 × B5)			0.33 a	20.58 a	20.34 a	58.72 a		

A × B	0			
Error experimental	30			
Total	39			
CV (%)	9.11	10.68	13.76	39.20
Probabilidad (Tratamientos)	0.8156	0.9486	0.5643	0.4904
Probabilidad (FA)	0.1973	0.8733	0.0507	0.1083
Probabilidad (FB)	0.3301	0.5239	0.5496	0.4520
Probabilidad (A × B)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

*DT= Diámetro de tallo. *AP= Altura de planta. *DC= Diámetro de la copa. *IV= Índice de vigor *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma* spp. *B2=*Aspergillus* spp, *B3=*Bacillus subtilis*. *B4=*Pseudomonas* spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.

3.4 Respuesta fisiológica de plántulas de cacao

3.4.1 Estado fotosintético (SPAD)

Los resultados del análisis de varianza para el estado fotosintético, determinado mediante el índice SPAD como indicador indirecto del contenido de clorofila, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a los 21, 28, 35 y 42 días después de la emergencia, con valores de $p = 0.3955, 0.9386, 0.9967$ y 0.9585 , respectivamente. De igual manera, los efectos principales de la procedencia del suelo (FA) y de los microorganismos aplicados (FB) no presentaron diferencias significativas en ninguna de las fechas de evaluación ($p > 0.05$). Por tanto, las variaciones observadas en los valores SPAD correspondieron a diferencias numéricas y no evidenciaron un efecto estadísticamente significativo de los factores evaluados sobre el estado fotosintético de las plántulas.

A los 21 días, los valores de SPAD oscilaron entre 16.93 y 18.75 unidades. El mayor valor correspondió al tratamiento T1 (A1 × B1), con 18.75 unidades, mientras que el menor se registró en T2 (A1 × B2), con 16.93 unidades. Finalmente, a los 42 días, el mayor valor se registró en T3 (A1 × B3), con 33.75 unidades, mientras que T9 (A2 × B4) presentó el menor, con 31.72 unidades SPAD.

Al considerar la procedencia del suelo, los valores medios fueron similares durante las evaluaciones. A los 21 días, Cerecita (A1) presentó 17.94 unidades SPAD y Río Verde (A2) 17.91 unidades. A los 28 días, las medias fueron de 33.74 y 34.29 unidades, respectivamente, mientras que a los 42 días se registraron 33.00 y 32.78 unidades, respectivamente. Estas diferencias no fueron significativas, con valores de p superiores a

0.05 en todas las fechas, lo que indica que la procedencia del suelo no produjo un efecto diferencial sobre el estado fotosintético durante el periodo evaluado. De manera similar, los microorganismos presentaron valores próximos entre sí. A los 42 días, *Bacillus subtilis* (B3) presentó el mayor valor medio, con 33.59 unidades SPAD, mientras que *Pseudomonas spp.* (B4) registró el menor valor, con 32.34 unidades. Sin embargo, estas diferencias fueron únicamente numéricas, ya que el efecto del factor B no fue significativo ($p = 0.8963$) en esta evaluación.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vera *et al.* (2025), quienes evaluaron la respuesta fotosintética de dos poblaciones híbridas de cacao expuestas a diferentes concentraciones de CdCl_2 . Los autores observaron que la exposición al cadmio disminuyó el contenido de clorofila determinado mediante SPAD, con una respuesta más marcada en los genotipos susceptibles, mientras que los genotipos tolerantes conservaron valores cercanos a 33 unidades SPAD. Los autores relacionaron esta respuesta con la interferencia del cadmio en la biosíntesis de clorofila y con el incremento del estrés oxidativo. En la presente investigación, los valores registrados hacia el final del periodo de evaluación se mantuvieron alrededor de 33 unidades SPAD, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos, lo que indica que bajo las condiciones evaluadas no se presentó una alteración diferencial del estado fotosintético asociada a los tratamientos.

Asimismo, Vásquez *et al.* (2026) demostraron que el contenido de clorofila puede disminuir conforme aumenta la concentración de cadmio en el suelo. Los autores reportaron valores de 34.69 unidades SPAD en plantas cultivadas sin cadmio, mientras que el tratamiento con 1.86 ppm de Cd e inoculado con un consorcio microbiano presentó 21.83 unidades SPAD. Esta diferencia evidencia que, cuando la concentración del metal es elevada, el estrés generado puede superar la capacidad de protección asociada a los microorganismos. En contraste, los valores obtenidos en la presente investigación se mantuvieron próximos a 33 unidades SPAD durante las evaluaciones finales, lo que podría indicar que las concentraciones de cadmio presentes en los suelos utilizados como sustrato no generaron una alteración evidente del estado fotosintético durante el periodo de evaluación.

Aunque diversos estudios han señalado que algunas especies de *Bacillus* pueden contribuir a la inmovilización del cadmio mediante procesos de bioadsorción y disminuir

potencialmente su disponibilidad para las plantas, en la presente investigación no se realizaron mediciones del contenido de cadmio en el sustrato ni en los tejidos vegetales después de la inoculación. Por esta razón, los resultados obtenidos únicamente permiten describir el comportamiento del índice SPAD y no permiten atribuir los valores observados a procesos de inmovilización, reducción de la disponibilidad o disminución de la absorción del cadmio por acción de los microorganismos.

En conjunto, los resultados muestran que el estado fotosintético de las plántulas presentó un incremento importante entre los 21 y 28 días después de la emergencia, pasando de aproximadamente 18 a 34 unidades SPAD, seguido de una relativa estabilidad durante las evaluaciones posteriores. Aunque se observaron diferencias numéricas entre tratamientos, especialmente en las evaluaciones de 28, 35 y 42 días, estas no fueron estadísticamente significativas. Por tanto, bajo las condiciones del presente estudio, la procedencia del suelo y los microorganismos evaluados no generaron una respuesta diferencial estadísticamente comprobable sobre el estado fotosintético de las plántulas de cacao.

Tabla 18 Estado fotosintético (unidades SPAD) a los 21, 28, 35 y 42 días después de la emergencia, cultivadas en sustratos preparados con suelo de las zonas de estudio e inoculadas con microorganismo benéficos.

		G	Estado fotosintético (unidades SPAD)				N
			EF 21	EF 28	EF 35	EF 42	
Factor A	A1	1	17.94 a	33.74 a	34.84 a	33.00 a	
	A2		17.91 a	34.29 a	34.42 a	32.78 a	
Factor B	B1	4	17.85 a	34.98 a	33.80 a	32.84 a	
	B2		17.43 a	33.21 a	34.79 a	33.13 a	
	B3		18.28 a	33.86 a	35.33 a	33.59 a	
	B4		18.26 a	33.46 a	34.42 a	32.34 a	
	B5		17.79 a	34.55 a	34.80 a	32.54 a	
Tratamientos							
T1 (A1 × B1)			18.75 a	33.96 a	34.05 a	32.65 a	40
T2 (A1 × B2)			16.93 a	33.11 a	34.77 a	33.40 a	
T3 (A1 × B3)			18.65 a	33.51 a	35.57 a	33.75 a	
T4 (A1 × B4)			17.99 a	33.79 a	34.79 a	32.97 a	

T5 (A1 × B5)	17.37 a	34.32 a	35.00 a	32.22 a
T6 (A2 × B1)	16.96 a	36.01 a	33.56 a	33.03 a
T7 (A2 × B2)	17.94 a	33.30 a	34.82 a	32.87 a
T8 (A2 × B3)	17.91 a	34.21 a	35.08 a	33.42 a
T9 (A2 × B4)	18.53 a	33.14 a	34.04 a	31.72 a
T10 (A2 × B5)	18.21 a	34.77 a	34.59 a	32.85 a

A × B	0
Error experimental	30
Total	39

CV(%)	9.23	9.23	5.90	8.18
Probabilidad (Tratamientos)	0.3955	0.9386	0.9967	0.9585
Probabilidad (FA)	0.9532	0.5852	0.5225	0.7972
Probabilidad (FB)	0.8286	0.7740	0.6587	0.8963
Probabilidad (A × B)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

*EF= Estado fotosintético 21, 28, 35 y 42 días. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma* spp. *B2=*Aspergillus* spp, *B3=*Bacillus subtilis*. *B4=*Pseudomonas* spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.

3.5 Desarrollo radicular de plántulas de cacao

3.5.1 Longitud de raíz (cm)

Los resultados del análisis de varianza para la longitud de la raíz principal no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, con un valor de $p = 0.9370$. De igual manera, la procedencia del suelo (FA) y los microorganismos aplicados (FB) no presentaron diferencias significativas, con valores de $p = 0.1962$ y $p = 0.6469$, respectivamente. Por tanto, las diferencias observadas entre las medias de longitud de raíz correspondieron únicamente a variaciones numéricas y no evidenciaron un efecto estadísticamente significativo de los factores evaluados sobre el desarrollo radicular.

La longitud de la raíz principal presentó valores entre 14.05 y 17.70 cm entre los tratamientos evaluados. El menor valor correspondió al tratamiento T6 (A2 × B1), con 14.05 cm, constituido por el suelo de Río Verde inoculado con *Trichoderma* spp. En contraste, el mayor valor se registró en T8 (A2 × B3), con 17.70 cm, correspondiente al suelo de Río Verde inoculado con *Bacillus subtilis*. No obstante, todas las medias presentaron la misma

agrupación estadística, por lo que estas diferencias no pueden considerarse respuestas diferenciadas de los tratamientos.

Al considerar la procedencia del suelo, las plántulas cultivadas en el suelo de Río Verde (A2) presentaron una longitud media de raíz de 16.15 cm, mientras que aquellas cultivadas en el suelo de Cerecita (A1) alcanzaron 14.78 cm. Aunque el valor obtenido con A2 fue numéricamente superior, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.1962$). Esto indica que, bajo las condiciones del presente estudio, la procedencia del suelo no produjo un efecto comprobable sobre el crecimiento de la raíz principal. Respecto al factor microorganismo, *Bacillus subtilis* (B3) presentó la mayor longitud media de raíz, con 16.47 cm, y *Trichoderma spp.* (B1) presentó el menor valor medio, con 14.12 cm. Sin embargo, estas diferencias fueron únicamente numéricas y no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.6469$). Por tanto, no se puede atribuir a ninguno de los microorganismos evaluados un efecto diferencial sobre la elongación de la raíz principal.

Estos resultados difieren de lo reportado por Falcão *et al.* (2014), quienes observaron que la inoculación de plántulas de cacao con *Bacillus subtilis* (cepa ALB629) incrementó el desarrollo del sistema radicular, registrando un aumento de hasta 30 % respecto al tratamiento control. En la presente investigación, *Bacillus subtilis* presentó el mayor valor medio de longitud de raíz, con 16.47 cm, y el tratamiento T8 alcanzó el mayor valor individual, con 17.70 cm; sin embargo, este comportamiento no fue estadísticamente significativo. Esta diferencia puede estar relacionada con la cepa empleada, las condiciones del sustrato, la metodología de inoculación y el periodo de evaluación.

De manera similar, Arce *et al.* (2022) evaluaron cepas nativas de *Bacillus subtilis* en plantas de cacao y reportaron respuestas variables en los parámetros de crecimiento, señalando que la eficacia de estos microorganismos depende de la interacción entre la cepa, el suelo y el hospedero. Los autores observaron que algunas cepas promovieron un mayor desarrollo de las plantas, mientras que otras no produjeron diferencias significativas. Esta variabilidad coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde *Bacillus subtilis* mostró una tendencia numérica favorable sobre la longitud de raíz, pero sin alcanzar significancia estadística.

Asimismo, Fiodor *et al.* (2023) señalaron que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, entre ellas *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.*, no siempre generan

incrementos en la longitud de las raíces, debido a que su eficacia depende de factores como la cepa bacteriana, la especie vegetal, las propiedades fisicoquímicas del suelo y las condiciones ambientales. En este sentido, los valores obtenidos en la presente investigación muestran que *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* presentaron las mayores medias numéricas de longitud de raíz; sin embargo, la ausencia de diferencias estadísticas indica que estas tendencias no fueron suficientes para confirmar un efecto promotor sobre esta variable.

En conjunto, los resultados indican que la longitud de la raíz principal presentó variaciones numéricas entre los tratamientos, con valores comprendidos entre 14.05 y 17.70 cm. El mayor valor correspondió a T8 (A2 × B3), con 17.70 cm, mientras que el menor se registró en T6 (A2 × B1), con 14.05 cm. Asimismo, el suelo de Río Verde presentó una media numéricamente superior a la de Cerecita, y *Bacillus subtilis* alcanzó la mayor media entre los microorganismos evaluados. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por tanto, bajo las condiciones del presente estudio, no se evidenció un efecto diferencial comprobable de la procedencia del suelo, los microorganismos o los tratamientos sobre la longitud de la raíz principal de las plántulas de cacao.

Tabla 19 Longitud de raíz (cm) de plántulas de cacao inoculadas con microorganismos y cultivadas en sustratos con suelo de dos zonas de estudio.

		G	Longitud de raíz principal	N
			LR (cm)	
Factor A	A1	1	14.78 a	
	A2		16.15 a	
Factor B	B1	4	14.12 a	
	B2		15.39 a	
	B3		16.47 a	
	B4		16.16 a	
	B5		15.18 a	
Tratamientos				
T1 (A1 × B1)		4	14.19 a	40
T2 (A1 × B2)			14.86 a	

T3 (A1 × B3)	15.24 a
T4 (A1 × B4)	15.05 a
T5 (A1 × B5)	14.55 a
T6 (A2 × B1)	14.05 a
T7 (A2 × B2)	15.93 a
T8 (A2 × B3)	17.70 a
T9 (A2 × B4)	17.28 a
T10 (A2 × B5)	15.81 a

A × B	0
Error experimental	30
Total	39

CV(%)	21.27
Probabilidad (Tratamientos)	0.9370
Probabilidad (FA)	0.1962
Probabilidad (FB)	0.6469
Probabilidad (A × B)	0.0000

*LR= Longitud de raíz principal. *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= *Trichoderma* spp. *B2=*Aspergillus* spp, *B3=*Bacillus subtilis*. *B4=*Pseudomonas* spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.

3.6 Comportamiento del pH y Conductividad eléctrica del sustrato

Los resultados del análisis de varianza para el pH y la conductividad eléctrica (CE) del sustrato se presentan en la Tabla 20. El pH registró valores comprendidos entre 6.63 y 6.92, mientras que la conductividad eléctrica presentó valores entre 195.25 y 341.75 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El análisis estadístico mostró que el pH no presentó diferencias significativas para los tratamientos, el factor A, el factor B ni la interacción A × B. En cambio, la CE presentó diferencias significativas tanto para los tratamientos como para el factor B ($p < 0.05$), mientras que el factor A no mostró diferencias significativas.

Los valores de pH obtenidos en el presente estudio se mantuvieron entre 6.63 y 6.92, correspondientes a condiciones cercanas a la neutralidad. El menor valor se registró en el tratamiento T7 (A2 × B2), con 6.63, mientras que el mayor correspondió a T4 (A1 × B4), con 6.92. No obstante, estas variaciones no fueron estadísticamente significativas, lo que

indica que la procedencia del suelo y los microorganismos evaluados no modificaron de manera detectable el pH del sustrato durante el periodo experimental. Argüello *et al.* (2019) reportaron valores de pH comprendidos entre 4.1 y 7.9 en suelos cacaoteros de Ecuador, intervalo dentro del cual se encuentran los valores registrados en la presente investigación. La relativa estabilidad del pH puede estar relacionada con las características del sustrato y su capacidad de amortiguar cambios derivados de la actividad microbiana.

Los microorganismos del suelo poseen la capacidad de modificar las propiedades fisicoquímicas del suelo como consecuencia de su actividad metabólica y enzimática. De acuerdo con Naz *et al.* (2022), la actividad microbiana puede intervenir en procesos relacionados con la transformación de compuestos orgánicos y nutrientes, generando modificaciones en propiedades como el pH y la materia orgánica. Sin embargo, en la presente investigación, la ausencia de diferencias significativas para el pH en el factor A ($p = 0.2790$), factor B ($p = 0.9889$) y la interacción $A \times B$ indica que dichos procesos no produjeron cambios estadísticamente detectables durante el periodo evaluado. Por tanto, los resultados evidencian un comportamiento relativamente estable del pH frente a la aplicación de los microorganismos y al origen del suelo empleado como sustrato.

En cuanto a la conductividad eléctrica, los valores registrados oscilaron entre 195.25 y 341.75 $\mu\text{S/cm}$. El menor valor correspondió al tratamiento T10 ($A_2 \times B_5$), con 195.25 $\mu\text{S/cm}$, mientras que el mayor se registró en T8 ($A_2 \times B_3$), con 341.75 $\mu\text{S/cm}$. El análisis de varianza mostró diferencias significativas para los tratamientos ($p = 0.0268$) y para el factor B ($p = 0.0021$), mientras que el factor A no presentó diferencias significativas ($p = 0.0852$). Esto indica que la variación observada en la CE estuvo principalmente asociada al tipo de microorganismo aplicado y no exclusivamente a la procedencia del suelo. De manera similar, Argüello *et al.* (2019) reportaron valores de conductividad eléctrica entre 37 y 733 $\mu\text{S/cm}$, con un promedio de 179 $\mu\text{S/cm}$, reflejando una amplia variabilidad en suelos destinados al cultivo de cacao.

Al comparar las medias del factor B, B3 (*Bacillus subtilis*) presentó el mayor valor de CE, con 299.81 $\mu\text{S/cm}$. El tratamiento testigo (B5) presentó el menor promedio, con 217.44 $\mu\text{S/cm}$. *Bacillus subtilis* presentó diferencias respecto al testigo, mientras que los demás microorganismos mostraron respuestas intermedias, compartiendo grupos estadísticos con uno u otro tratamiento.

A diferencia del pH, la conductividad eléctrica presentó una respuesta más variable frente a los tratamientos microbianos. El factor B presentó diferencias significativas ($p = 0.0021$), destacándose *Bacillus subtilis* con el mayor valor promedio de CE ($311.56 \mu\text{S/cm}$), mientras que el tratamiento testigo presentó el menor valor ($217.44 \mu\text{S/cm}$).

Este comportamiento coincide con lo reportado por Hu *et al.* (2026), quienes encontraron que la inoculación con *Bacillus subtilis* puede generar modificaciones en la conductividad eléctrica del suelo. Este comportamiento puede estar relacionado con cambios en la composición de la solución del suelo derivados de la actividad microbiana, así como con procesos asociados a la formación de biopelículas y transformación de compuestos presentes en el sustrato. En este sentido, el mayor valor de CE registrado bajo *B. subtilis* en la presente investigación podría estar relacionado con una mayor modificación de la concentración de iones solubles en el sustrato.

Los resultados obtenidos para los tratamientos muestran además que la respuesta de la CE no fue uniforme entre las dos procedencias de suelo. En el suelo de Cerecita (A1), los valores oscilaron entre 239.63 y $257.88 \mu\text{S/cm}$, mientras que en el suelo de Río Verde (A2) se observó una mayor amplitud, desde 195.25 hasta $341.75 \mu\text{S/cm}$. El mayor valor correspondió a T8 ($A2 \times B3$), asociado a *Bacillus subtilis*, mientras que el menor se presentó en T10 ($A2 \times B5$), correspondiente al testigo. Esta diferencia numérica evidencia que el comportamiento de la CE estuvo condicionado por la combinación entre la procedencia del suelo y el microorganismo aplicado.

En conjunto, los resultados indican que el pH presentó un comportamiento estable, sin diferencias estadísticas atribuibles a la procedencia del suelo, los microorganismos o su combinación. Por el contrario, la conductividad eléctrica presentó una respuesta diferenciada, con efectos significativos asociados principalmente al tipo de microorganismo aplicado. *Bacillus subtilis* presentó el mayor promedio de CE, mientras que el tratamiento testigo registró el menor valor. Por tanto, bajo las condiciones del presente estudio, los microorganismos evaluados tuvieron una influencia más evidente sobre la conductividad eléctrica que sobre el pH del sustrato, particularmente en el caso de *B. subtilis*.

Tabla 20 Comportamiento del pH y la conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del sustrato elaborado con suelos de las zonas de estudio en plántulas de cacao inoculadas con microorganismos en dos zonas de estudio.

		G	Comportamiento pH Y		N
			Conductividad eléctrica		
			pH	CE (μS/cm)	
Factor A	A1	1	6.85 a	252.55 a	
	A2		6.73 a	273.93 a	
Factor B	B1	4	6.81 a	250.13 ab	
	B2		6.74 a	279.19 a	
	B3		6.78 a	299.81 a	
	B4		6.83 a	269.63 ab	
	B5		6.79 a	217.44 b	
Tratamientos					
T1 (A1 × B1)			6.86 a	250.63 abc	40
T2 (A1 × B2)			6.86 a	257.75 abc	
T3 (A1 × B3)			6.82 a	257.88 abc	
T4 (A1 × B4)			6.92 a	256.88 abc	
T5 (A1 × B5)			6.78 a	239.63 bc	
T6 (A2 × B1)			6.75 a	249.63 bc	
T7 (A2 × B2)			6.63 a	300.63 ab	
T8 (A2 × B3)			6.74 a	341.75 a	
T9 (A2 × B4)			6.74 a	282.38 abc	
T10 (A2 × B5)			6.80 a	195.25 c	
A × B		0			
Error experimental		30			
Total		39			
CV(%)			4.80	14.43	
Probabilidad (Tratamientos)			0.9511	0.0268	
Probabilidad (FA)			0.2790	0.0852	
Probabilidad (FB)			0.9889	0.0021	

Probabilidad (A × B)	0.0000	0.0000
*pH= Potencial de hidrógeno. *CE= Conductividad eléctrica *A1=Suelo Cerecita. *A2=Suelo Río Verde. *B1= <i>Trichoderma</i> spp. *B2=<i>Aspergillus</i> spp, *B3=<i>Bacillus subtilis</i>. *B4=<i>Pseudomonas</i> spp. *B5=Testigo. *Gl= Grados de libertad. *CV%=Coeficiente de variación. *Medias estadísticas de Tukey con el 0.05 de probabilidad de error. *abc=Letras iguales no defieren estadísticamente.		

3.7 Síntesis del comportamiento de los microorganismos

En términos generales, la respuesta de las plántulas de cacao varió según la variable evaluada y la combinación entre la procedencia del sustrato y el microorganismo. En la germinación, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* spp. presentaron las mayores respuestas, alcanzando 75 % en los tratamientos T3 y T4. Este comportamiento coincide con Khaeruni *et al.* (2020) quienes reportaron que determinadas bacterias endófitas pueden favorecer la germinación y el establecimiento inicial del cacao mediante mecanismos asociados a la producción de fitohormonas y la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, esta respuesta favorable no se mantuvo durante la emergencia, donde no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

En las variables de crecimiento, *B. subtilis* presentó valores numéricamente favorables en algunas evaluaciones, aunque sin diferencias estadísticas en variables como el índice de vigor y la longitud de raíz. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Falcão *et al.* (2014), quienes observaron efectos positivos de *B. subtilis* sobre el desarrollo radicular, el área foliar y la altura de plántulas de cacao. No obstante, Fiodor *et al.* (2023) señalan que la respuesta de los microorganismos promotores del crecimiento depende de la eficiencia de la cepa, la especie vegetal y las condiciones del suelo y ambiente.

Señalan que la respuesta de los microorganismos promotores del crecimiento depende de la eficiencia de la cepa, la especie vegetal y las condiciones del suelo y ambiente (Hu *et al.*, 2026; Naz *et al.*, 2022)

En conjunto, *Bacillus subtilis* mostró las respuestas numéricamente más favorables en algunas variables, particularmente durante la germinación y ciertas evaluaciones de crecimiento; sin embargo, su efecto no fue uniforme ni estadísticamente significativo en todas las variables. La variabilidad observada coincide con lo señalado por Asghar *et al.* (2024), quienes indican que la eficacia de microorganismos como *Trichoderma* depende de la cepa, las características del suelo, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales. Por tanto, los resultados indican que la respuesta de los microorganismos

estuvo condicionada por la variable evaluada y su interacción con las características del sustrato, por lo que deben interpretarse bajo las condiciones específicas del presente experimento.

Tabla 21 Comportamiento general de los microorganismos evaluados en plántulas de cacao.

Microorganismo	Comportamiento observado
<i>Trichoderma spp.</i>	Presentó un comportamiento variable entre las variables evaluadas, sin mostrar una tendencia consistente de respuesta.
<i>Aspergillus spp.</i>	Mostró respuestas variables; presentó valores favorables en algunas evaluaciones, pero sin diferencias significativas consistentes en las variables de crecimiento.
<i>Bacillus subtilis</i>	Presentó las respuestas numéricamente más favorables en algunas variables, destacándose en la germinación (75 %) y en determinadas evaluaciones de crecimiento y conductividad eléctrica; sin embargo, estos efectos no fueron consistentes en todas las variables.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Mostró una respuesta favorable en la germinación (75 %), mientras que en las variables de crecimiento presentó un comportamiento variable y sin diferencias significativas consistentes.
Testigo	Presentó respuestas comparables con varios tratamientos inoculados, particularmente en emergencia y algunas variables de crecimiento, evidenciando que no todos los microorganismos generaron efectos diferenciados bajo las condiciones del estudio.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Las concentraciones de cadmio determinadas en las muestras de suelo provenientes de Río Verde y Cerecita fueron inferiores a 0.30 mg Kg^{-1} de materia seca, presentando poca variación entre profundidades evaluadas. En el grano de cacao, la muestra procedente de Río Verde, correspondiente al material Nacional, presentó 0.48 mg Kg^{-1} de materia seca, mientras que la muestra de Cerecita, correspondiente a CCN-51, presentó 1.74 mg Kg^{-1} de materia seca, debido a que cada localidad estuvo representada por un único material genético, estas diferencias deben interpretarse como un diagnóstico descriptivo de las muestras estudiadas.
2. La respuesta germinativa no presentó diferencias significativas entre las combinaciones de sustrato y microorganismo a los cinco días ($p = 0.7176$). Los mayores valores numéricos correspondieron a T3 ($A1 \times B3$, *Bacillus subtilis*) y T4 ($A1 \times B4$, *Pseudomonas spp.*), ambos con 75% de germinación, mientras que T9 ($A2 \times B4$) presentó 30%. Sin embargo, a los 15 días la emergencia no presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.9251$), con valores entre 91.67 y 100%. Por tanto, el efecto de los tratamientos se manifestó principalmente durante la germinación inicial y no se mantuvo durante la emergencia.
3. Las variables morfológicas evaluadas durante el establecimiento de las plántulas no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. La altura, el diámetro del tallo y el índice de vigor mostraron variaciones numéricas, pero estas no fueron suficientes para demostrar un efecto estadísticamente significativo de los microorganismos. En particular, el índice de vigor presentó valores entre 42.98 y 75.83 cm^3 , mientras que las diferencias observadas entre tratamientos fueron únicamente numéricas.
4. La respuesta fisiológica, evaluada mediante el índice SPAD como indicador indirecto del contenido de clorofila, estuvo condicionada por la interacción entre la procedencia del sustrato y el microorganismo aplicado. En contraste, los efectos principales de la procedencia del suelo y del microorganismo no fueron significativos de manera independiente. Por tanto, las variaciones observadas en SPAD deben interpretarse como una respuesta específica de las combinaciones sustrato–

microorganismo y no como un efecto general atribuible a un microorganismo determinado.

5. La longitud de la raíz no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.9051$), ni por efecto de la procedencia del sustrato ni del microorganismo aplicado. El mayor promedio numérico correspondió a T8 ($A2 \times B3$), con 17.70 cm, mientras que el menor se registró en T6 ($A2 \times B1$), con 14.05 cm. Estas diferencias fueron únicamente numéricas, por lo que, bajo las condiciones y periodo de evaluación establecidos, no se evidenció un efecto estadísticamente significativo de los microorganismos sobre la longitud radicular.

Recomendaciones

1. Validar el uso de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas spp.* durante la producción de plántulas de cacao en vivero, debido a su efecto favorable sobre la germinación y el crecimiento inicial.
2. Desarrollar investigaciones de mayor duración que permitan evaluar el comportamiento de las plántulas inoculadas después del trasplante al campo, así como su efecto sobre la productividad y acumulación de cadmio en órganos reproductivos.
3. Incorporar en futuras investigaciones la determinación del contenido de cadmio en raíces, tallos y hojas, con el propósito de comprender los mecanismos de absorción, inmovilización y translocación del metal dentro de la planta.
4. Evaluar diferentes dosis y combinaciones de microorganismos benéficos, así como su interacción con enmiendas orgánicas o minerales, para incrementar la eficiencia de la biorremediación de suelos con presencia de cadmio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A., 2018. Efecto del sulfato de cadmio en la germinación y el crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), Tingo María, Perú.
- Agudelo, G., Cañar, D., Pabón, M., Bello, M., Hernández, J., 2021. Manual técnico para la producción de semilla de cacao en vivero para los Santanderes y Boyacá, Editorial AGROSAVIA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7404586>
- Alengebaw, A., Abdelkhalek, S., Qureshi, S., Wang, M.-Q., 2021. Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics* 9, 42. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Alvarez, J., 2021. Presencia de cadmio (Cd) en el cacao (*Theobroma cacao* L.) de exportación. Universidad Técnica De Babahoyo, Babahoyo - Los Ríos - Ecuador.
- ANECACAO, 2024. (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao) - Historia del Cacao. URL <https://anecacao.com/cacao-en-el-ecuador/historia-del-cacao/> (accessed 9.22.25).
- Angon, B., Islam, S., Kc, S., Das, A., Anjum, N., Poudel, A., Suchi, S., 2024. Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: Soil, plants and human food chain. *Heliyon* 10.
- Aquino, R., 2024. Relación entre metales traza en cultivos agrícolas y suelos contaminados por agroquímicos en el caserío Villa Rica – Leoncio Prado, 2023.
- Arce, M., González, A., Hernandez, E., Chuquibala, B., Chavez, A., Llanos, K., Leiva, S., Oliva, S., Cumpa, L., 2022. Bioremediation Potential of Native *Bacillus* sp. Strains as a Sustainable Strategy for Cadmium Accumulation of *Theobroma cacao* in Amazonas Region. *Microorganisms* 10, 2108. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112108>
- Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., Montalvo, D., 2019. Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Sci. Total Environ.* 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Asghar, W., Craven, K., Kataoka, R., Mahmood, A., Asghar, N., Raza, T., Iftikhar, F., 2024. The application of *Trichoderma* spp., an old but new useful fungus, in sustainable soil health intensification: A comprehensive strategy for addressing challenges. *Plant Stress* 12, 100455. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100455>
- Ayangbenroy, A., Babalola, O., 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents.
- Balmaseda, C., Ponce de León, D., 2019. Características De Los Suelos Del Centro De Producción Y Prácticas Río Verde, Santa Elena, Ecuador. *J. Sci. Res.* 4, 18–26.
- Barcia, A., 2024. Aplicación de enmiendas minerales y microorganismo para la mitigación de cadmio en el cultivo de cacao en Santa Elena. Universidad Agraria Del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., Maurice, L., 2017. Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in

- cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environ. Pollut.* 229, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- Barrezueta, S., Armijos, I., Vega, E., 2021. Comparación de niveles de cadmio en hojas, testa y almendra en cultivares de *Theobroma cacao*. *Cienc. UNEMI* 14, 73–80. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss37.2021pp73-80p>
- Barros, O., 2018. Morfología y clasificación botánica del cacao.
- Bhandari, G., 2017. Mycoremediation: An Eco-friendly Approach for Degradation of Pesticides, in: Prasad, R. (Ed.), *Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 1*. Springer International Publishing, Cham, pp. 119–131. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_7
- Bhattacharjee, R., 2018. Taxonomía y clasificación del cacao [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/326914767_Taxonomy_and_classification_of_cacao (accessed 9.28.25).
- Blommaert, H., Aucour, A., Wiggenhauser, M., Moens, C., Telouk, P., Campillo, S., Beauchêne, J., Landrot, G., Testemale, D., Pin, S., Lewis, C., Umaharan, P., Smolders, E., Sarret, G., 2022. From soil to cacao bean: Unravelling the pathways of cadmium translocation in a high Cd accumulating cultivar of *Theobroma cacao* L. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1055912>
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., Scheckel, K., 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* 266, 141–166. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
- Bravo, D., Braissant, O., 2021. Cadmium-tolerant bacteria: current trends and applications in agriculture. *Lett. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/lam.13594>
- Burgos, A., 2024. Disminución del efecto del cadmio (Cd) en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) con la aplicación de *Bacillus subtilis* DMS18595.
- Cabrera, S., 2024. Concentración de cadmio y plomo en *Scomber Japonicus* desembarcados en el puerto pesquero artesanal de Anconcito.
- Candel, A., Castro, T., La Paz, O., 2021. Los sistemas de producción agrícola de las parroquias del norte de la provincia Santa Elena, Ecuador 42.
- Casafe, 2016. La importancia del curado de semillas con fungicidas. *Camara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes*. URL <https://www.casafe.org/la-importancia-del-curado-de-semillas-con-fungicidas/> (accessed 8.5.26).
- Cayotopa, J., Arévalo, L., Pichis, R., Olivera, D., Rimachi-Valle, M., Márquez-Dávila, K., Cayotopa-Torres, J., Arévalo-López, L., Pichis-García, R., Olivera-Cayotopa, D., Rimachi-Valle, M., Márquez-Dávila, K., 2021. Nuevos agentes de biorremediación de cadmio: Especies de *Trichoderma* nativas de la rizósfera de árboles de cacao. *Sci. Agropecu.* 12, 155–160. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.017>
- CFN, 2020. (Corporación financiera nacional) - cultivo de cacao elaboración de cacao, chocolate. Corporación financiera nacional.
- Chancay, L., Delgado, M., Salas, C., 2022. Cadmio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus efectos ambientales. *Téc. Rev. Las Agrocienc.* ISSN 2477-8982 91–110. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i0.4324

- Chaustre, A., Castillo, P., 2018. La importancia de la exportación del cacao en Colombia y los países en América Latina. *Rev. Investig. Gest.* 1, 20–29. <https://doi.org/10.22463/26651408.1514>
- Chavez, E., He, Z., Stoffella, P., Mylavarapu, R., Li, Y., Moyano, B., Baligar, V., 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci. Total Environ.* 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Chávez, G., Estrada, N., Gómez, J., Choque, R., Crespo, C., Alvarez, M.T., 2013. Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Primera parte: Uso de hongos en biorremediación. *Rev. CON-Cienc.* 1, 85–91.
- Correa, J., Ramírez, R., Ruíz, O., Leiva, E.I., 2021. Effect of soil characteristics on cadmium absorption and plant growth of *Theobroma cacao* L. seedlings. *J. Sci. Food Agric.* 101, 5437–5445. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11192>
- Cortés, F., Alvarado, G., Sanchez, G., 2023. *Trichoderma spp.*, una alternativa para la agricultura sostenible: una revisión. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 25, 62–76. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v25n2.111384>
- de Sousa, W., Brito, N., Felseburgh, C., Vieira, T., Lustosa, D., 2021. Evaluation of *Trichoderma spp.* Isolates in Cocoa Seed Treatment and Seedling Production. *Plants* 10, 1964. <https://doi.org/10.3390/plants10091964>
- de Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Maurhofer, M., 2009. Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4162–4174. <https://doi.org/10.1128/AEM.00295-09>
- Elodie, J., Jiang, W., Bereau, D., Robinson, J., 2022. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, Composition and Pharmacological Activities of Pods and Seeds. *Foods* 11, 3966. <https://doi.org/10.3390/foods11243966>
- Falcão, L.L., Silva-Werneck, J.O., Vilarinho, B.R., Da Silva, J.P., Pomella, A.W.V., Marcellino, L.H., 2014. Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1584–1592. <https://doi.org/10.1111/jam.12485>
- Fernández, J., Sosa, L., Cabala, L., Quispe, N., 2020. Enmiendas orgánicas en la inmovilización de cadmio en suelos agrícolas contaminados: una revisión. *Inf. Tecnológica* 31, 139–152. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000400139>
- Ferrás, Y., Bustamante, C., Ortíz, N., 2022. *Pseudomonas* sp en la emergencia de semillas y el desarrollo de posturas de cacao. *Agron. Costarric.* 46, 129–134. <https://doi.org/10.15517/rac.v46i1.49873>
- Fiodor, A., Ajijah, N., Dziewit, L., Pranaw, K., 2023. Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Front. Microbiol.* 14, 1142966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966>
- Freire, F., Carrillo, M., Pincay, R., Rendón, J., Luna, R., Vecilla-Nicola, A., Reynel, V., Tezara, W., 2025. Physiological traits, cadmium bioaccumulation and biomass distribution in seven cocoa genotypes. *Front. Agron.* 7. <https://doi.org/10.3389/fagro.2025.1655430>

- Gaibor, T., 2023. Efecto de la aplicación de yodo en la germinación de semilla de cacao (*Theobroma cacao*). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos - Ecuador.
- García, E., 2019. Manejo de labores culturales del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la finca Dos hermanos en la ciudad de Montalvo.
- García, G., Dos, J., Carvalho, M., Pinzón, E., Silva, A., Guimarães, L., 2025. Addressing Cadmium in Cacao Farmland: A Path to Safer, Sustainable Chocolate. *Agriculture* 15, 433. <https://doi.org/10.3390/agriculture15040433>
- González, C., 2014. Aplicación de micorrizas y un mycobacter en viveros de cacao *Theobroma cacao* L.
- Goutam, J., Sharma, J., Singh, R., Sharma, D., 2021. Fungal-Mediated Bioremediation of Heavy Metal–Polluted Environment, in: ResearchGate. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_3
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., Schulin, R., 2017. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Sci. Total Environ.* 580, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>
- Guartatanga, E., Sigüencia, K., 2019. Recuperación de suelo contaminado con cobre y plomo mediante métodos biológicos al interior del campamento Guarumales - Corporación Hidroeléctrica del Ecuador, CELEC EP - Unidad de Negocio Hidropaute (bachelorThesis).
- Guevara, M., 2021. Incidencia del suelo para la bioacumulación de Cadmio en la almendra de cacao (*Theobroma cacao* L.) de dos variedades Fino de Aroma y CCN-51 cultivadas en el cantón Santa Clara provincia de Pastaza.
- Hu, H., Lu, Y., Horton, R., Ren, T., 2026. Microbial enhancement of soil electrical conductivity: the dual roles of pore water chemistry and biofilm-mediated water retention. *Geoderma* 470, 117850. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2026.117850>
- Huaraca, H., Narvaéz, G., Carrillo, M., 2024. Herramientas de aprendizaje para la prevención y mitigación de la presencia de cadmio en cacao. Guía de Aprendizaje Nro.17 Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- INAMHI, 2026. Pronostico – Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología del Ecuador. URL <https://servicios.inamhi.gob.ec/pronostico/> (accessed 7.29.26).
- Joya, V., Huguet, C., Pearse, J., 2023. Natural and Anthropogenic Sources of Cadmium in Cacao Crop Soils of Santander, Colombia. *Soil Syst.* 7, 12. <https://doi.org/10.3390/soilsystems7010012>
- Khaeruni, A., Nirmala, T., Hisein, W., Gusnawaty, G., Wijayanto, T., Sutariati, G., 2020. Potensi dan Karakterisasi Fisiologis Bakteri Endofit Asal Tanaman Kakao Sehat sebagai Pemacu Pertumbuhan Benih Kakao. *J. Ilmu Pertan. Indones.* 25, 388–395. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.3.388>
- Khan, Z., Elahi, A., Bukhari, D.A., Rehman, A., 2022. Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. *J. Saudi Chem. Soc.* 26, 101569. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101569>
- Larios, C., Solís, G., 2024. El cacao tabasqueño: de los olmecas a nuestro tiempo.

- Lewis, C., Lennon, A., Eudoxie, G., Umaharan, P., 2018. Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. Sci. Total Environ. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Loor, R., Casanova, T., Plaza, L., 2016. Mejoramiento y homologación de los procesos y protocolos de investigación, validación y producción de servicios en cacao y café. Quevedo, EC: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa Nacional Cacao y Café, 2016.
- López, M., Jaimez, R., Orozco, L., 2021. Guía 1 cadmio en el cultivo de cacao. Caja de herramientas para la prevención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de cacao-Ecuador.
- Luo, J.-S., Zhang, Z., 2021. Mechanisms of cadmium phytoremediation and detoxification in plants. Crop J., Rice as a model crop: genetics, genomics and breeding 9, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.02.001>
- MAG, 2018. Geoportal del Agro Ecuatoriano (Ministerio de Agricultura y Ganadería) [WWW Document]. URL <http://geoportal.agricultura.gob.ec/> (accessed 5.20.26).
- Martínez, M., Bravo, D., Rodríguez, Y., Ramírez, L., García, E., Hidalgo, M., Chávez, E., 2023. Producto 4. Metodología estandarizada para la determinación de cadmio (Cd) en suelos y material decacao (*Theobroma cacao* L.).
- Maslennikova, D., Koryakov, I., Yuldashev, R., Avtushenko, I., Yakupova, A., Lastochkina, O., 2023. Endophytic Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus subtilis* Reduces the Toxic Effect of Cadmium on Wheat Plants. Microorganisms 11, 1653. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071653>
- Merchán, M., Flores, E., Quiroz, J., 2017. Guía para facilitar el aprendizaje en el manejo integrado del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- Meter, A., Atkinson, R., Laliberte, B., 2019. Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe: Análisis de la investigación y soluciones potenciales para la mitigación. Bioversity International.
- Microbiolab, 2018. Fichas Técnicas Microbiolab.
- Miranda, K., Castro, O., Valarezo, M., 2022. Cuantificación de cadmio en suelos de cultivo de cacao en el cantón Arenillas, provincia de el Oro, Ecuador. Rev. Científica Cienc. Nat. Ambient. 16. <https://doi.org/10.53591/cna.v16i1.1596>
- Mite, F., Carrillo, M., Durango, W., 2010. Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador.
- Mu, Y., Zhang, C., Li, Yiyun, Zhou, W., Li, Yanxin, Zhao, G., Su, P., 2024. Research Progress on Physical and Chemical Remediation Methods for the Removal of Cadmium from Soil. Separations 11, 299. <https://doi.org/10.3390/separations11100299>
- Ñahuirima, J., 2019. Efecto de la materia orgánica en la reducción del cadmio en el suelo y en plantones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero.
- Naz, M., Dai, Z., Hussain, S., Tariq, M., Danish, S., Khan, I.U., Qi, S., Du, D., 2022. The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community. J. Environ. Manage. 321, 115770. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115770>

- Orellana, E., 2022. Reserva de carbono de los suelos en la cuenca manglaralto, Península de Santa Elena. Univerdas Estatal Península de Santa Elena, Manglaralto.
- Orozco, M., Flores, A., Rojas, B., Urtis, C., Morales, L., Valencia, M., Chávez, S., Rojas, D., Santoyo, G., 2021. Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement. *Agronomy* 11, 1167. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>
- Ortega, K., 2018. Análisis económico de la producción agropecuaria del centro de apoyo Río Verde, períodos 2010-2012. [WWW Document]. URL <https://repositorio.upse.edu.ec/items/771cf606-b209-4a10-a18c-69040a0b7817> (accessed 5.20.26).
- Ortiz, W., Cáceres, Y., Castiblanco, G., 2022. Contaminantes presentes en granos y productos de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel mundial, una revisión. *Rev. Cienc. Tecnol. El Higo* 12, 45–58. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v12i2.15209>
- Osorio, M., Leiva, E., Ramírez, R., 2017. Crecimiento de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes tamaños de contenedor. *Rev. Cienc. Agríc.* 34, 73–82. <https://doi.org/10.22267/rcia.173402.73>
- Reed, L., Glick, B., 2023. The Recent Use of Plant-Growth-Promoting Bacteria to Promote the Growth of Agricultural Food Crops. *Agriculture* 13, 1089. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051089>
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F., Kučerik, J., Mumtaz, M., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., Mustafa, A., 2021. Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10529. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
- Shagñay, Á., 2021. Contaminación por agroquímicos y acumulación de cadmio y plomo en suelos dedicados a la producción de cacao del sector la isla recinto la resistencia en el cantón coronel Marcelino Maridueña.
- Silva, E., Agudelo, E., Ramos, C., 2021. Manual de Prácticas de Laboratorio de Tratamiento y Gestión del Suelo I.
- Suárez, K., Castañeda, C., Forero, F., Almanza, P., Serrano, P., 2022. Liming applications and the SPAD chlorophyll index and stomatal conductance in cocoa exposed to cadmium in the soil. *Rev. Colomb. Cienc. Hortícolas* 16, 1. <https://doi.org/10.17584/rcch.2022v16i2.14530>
- Vallejos, G., Vallejos, N., Jiménez, N., Lozano, A., Lozano, C., Arévalo, A., Pico, H., Saavedra, J., Tuesta, J., Tuesta, O., Valdez, M., Ordoñez, K., Baselly, J., 2026. Influencia del cadmio y las micorrizas arbusculares en el crecimiento y el contenido de clorofila en plantas de *Theobroma cacao* y *Theobroma grandiflorum*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/aia/6852295>
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., Smolders, E., 2021. Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Sci. Total Environ.* 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>

- Vanderschueren, R., Wantiez, L., Blommaert, H., Flores, J., Chavez, E., Smolders, E., 2023. Revealing the pathways of cadmium uptake and translocation in cacao trees (*Theobroma cacao* L.): A 108Cd pulse-chase experiment. *Sci. Total Environ.* 869, 161816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161816>
- Vargas, E., Molina, X., Cevallos, E., 2022. Recorrido histórico de la importancia del cacao para la economía de Ecuador. *Sinerg. Educ.* <https://doi.org/10.37954/se.vi.193>
- Vásquez, J., García, L., Calderón, M., Bustamante, D., 2026. Bioremediation Potential of Native *Bacillus* sp. Strains as a Sustainable Strategy for Cadmium Accumulation of *Theobroma cacao* in Amazonas Region. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Chachapoyas - Perú.
- Velázquez, N., Ramírez, B., De la Cruz, I., Murrieta, M., De los Santos, P.E., 2022. El cultivo del cacao, sus características y su asociación con microorganism [WWW Document]. URL <https://www.aytbuap.mx/aytbuap-725/el-cultivo-del-cacao-sus-caracteristicas-y-su-asociacion-con-microorganism> (accessed 9.21.25).
- Vera, L., Maddela, N., Jaimez, R., Corozo, L., 2025. Unraveling cadmium stress in cacao (*Theobroma cacao* L.): Photosynthetic performance and differential accumulation in two new hybrid populations under controlled conditions. *South Afr. J. Bot.* 185, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.08.009>
- Vergara, V., 2021. Una breve historia sobre el cacao en Ecuador. Mundo DINERS.
- Villarruel, E., 2022. Revisión del origen de la contaminación de suelos con cadmio, sus estrategias de remoción y el caso de cultivos de cacao en el Ecuador. (bachelorThesis). Quito, 2022.
- Weinstein, M., Baram, S., Yermiyahu, U., Tsehansky, L., Sperling, O., Graber, E.R., 2025. Evaluation of Optical Chlorophyll Meters as Proxy for Nitrogen in *Theobroma cacao* L. *J Amer Soc Hort Sci* 150, 177–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS05483-25>
- Yang, P., Ling, L., Condrich, A., Muni, G., Scranton, S., Xu, S., Xia, Y., Huang, S., 2025. Innovative Approaches for Engineering the Seed Microbiome to Enhance Crop Performance.
- Yépez, V., 2018. Comportamiento agronómico de la piña *Ananas comusus* L. variedad perolera, en cuatro distancias de siembra, en el centro de producción y prácticas Río Verde, de la UPSE, en el cantón Santa Elena.
- Yuan, C., Li, Q., Sun, Z., Sun, H., 2021. Effects of natural organic matter on cadmium mobility in paddy soil: A review. *J. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.11.016>
- Zambrano, J., 2013. Comportamiento agronómico de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.), en vivero, sembradas en diferentes volúmenes de sustrato. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo - Ecuador.
- Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M.F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F.U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., Mustafa, A., 2022. Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils; A Comprehensive Review. *Front. Plant Sci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>

ANEXOS

Anexo A Fase1: Muestreo de suelo y mazorca



Anexo A 1 Recolección de muestra de suelo



Anexo A 2 Recolección de mazorca



Anexo A 3 Secado del grano



Anexo A 4 filtrado del suelo



Anexo A 5 Medición de pH



Anexo A 6 Medición de conductividad eléctrica



Anexo A 7 Etiquetado de las muestras de suelo y grano de cacao



Anexo A 8 Equipo de trabajo



ESTACION EXPERIMENTAL TROPICAL "PICHILINGUE"
LABORATORIO DE SUELOS, TEJIDOS VEGETALES Y AGUAS
Km 5 Carretera Quevedo - El Empalme; Apartado 24
Quevedo - Ecuador Teléfonos: 783044 783128 Ext. 201

Nombre del Propietario :	LIMONES MUÑOZ JOHN ROLANDO	Telef :	0968688158	Reporte N° :	14365
Nombre de la Propiedad :	S/N	Cultivo :	Cacao	Fecha de muestreo :	25/04/2026
Localización :	Cerecita	Santa Elena	Santa Elena	Fecha de ingreso :	34/05/2026
	Parroquia	Cantón	Provincia	Fecha salida resultados:	14/05/2026

RESULTADO DE ANÁLISIS DE CADMIO EN SUELO Y COTILEDÓN DE CACAO

Número de Laboratorio	Identificación de las Muestras	Cd mg kg ⁻¹
1832	M1 Santa Elena 0-25 cm	0.28
1833	M2 Santa Elena 50 cm	0.27
1834	M1 Cerecita 0-25 cm	0.21
1835	M2 Cerecita 50 cm	0.24
1836	M1 Santa Elena (Cacao Nacional)	0.48
1837	M2 Santa Elena (Cacao CCN-51)	1.74

Instrumento de análisis: HDXRF (Espectrometría de Fluorescencia de rayos X de alta definición)
Límite de detección (LD): 0.05 mg kg ⁻¹ Cd
Nivel crítico en suelos agrícola: (Cd) 2 mg kg ⁻¹ (TULA; acuerdo Nro. 061, Año II, N. 316, mayo de 2015)

La muestra será guardada en el laboratorio por tres meses, tiempo en el que se aceptarán reclamos en los resultados

 RESPONSABLE DPTO.

 LABORATORISTA

Anexo A 9 Resultados del análisis de cadmio en suelo y grano de cacao

Anexo B Fase 2: Experimental



Anexo B 1 Adecuación del vivero



Anexo B 2 Preparación del sustrato



Anexo B 3 Llenado de fundas de germinación



Anexo B 4 Imbibición y desinfección de semillas de cacao



Anexo B 5 Siembra y distribución de las unidades experimentales



Anexo B 6 Germinación de la semilla



Anexo B 7 Preparación de la solución



Anexo B 8 Aplicación de los microorganismos



Anexo B 9 Variable diámetro de tallo



Anexo B 10 Variable altura de la planta



Anexo B 11 Variable estado fotosintético



Anexo B 12 Variable longitud de raíz



Anexo B 13 Variable volumen radicular



Anexo B 14 Observación de coloración de raíz y número de raíces secundarias



Anexo B 15 Deformación de raíz



Anexo B 16 Deformación de raíz

Anexo C Análisis de varianza de las variables

%G5

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%G5	40	0,34	0,14	47,85

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9984,23	9	1109,36	1,71	0,1302
FA	8094,03	1	8094,03	12,48	0,0014
FB	549,10	4	137,28	0,21	0,9299
Tratamiento	1341,10	4	335,28	0,52	0,7239
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	19460,75	30	648,69		
Total	29444,98	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=16,44875

%E15

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%E15	40	0,15	0,00	11,44

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	623,21	9	69,25	0,57	0,8091
FA	54,43	1	54,43	0,45	0,5077
FB	462,14	4	115,54	0,95	0,4468
Tratamiento	106,64	4	26,66	0,22	0,9251
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	3632,67	30	121,09		
Total	4255,88	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,10666

Anexo C 1 Análisis de varianza porcentaje de germinación y emergencia

AP7

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AP7	40	0,13	0,00	20,17

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	46,32	9	5,15	0,52	0,8482
FA	0,33	1	0,33	0,03	0,8560
FB	15,70	4	3,92	0,40	0,8094
Tratamiento	30,29	4	7,57	0,77	0,5561
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	296,81	30	9,89		
Total	343,13	39			

AP14

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AP14	40	0,16	0,00	19,89

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76,07	9	8,45	0,63	0,7651
FA	5,08	1	5,08	0,38	0,5439
FB	10,71	4	2,68	0,20	0,9372
Tratamiento	60,28	4	15,07	1,12	0,3668
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	404,64	30	13,49		
Total	480,71	39			

AP21

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AP21	40	0,19	0,00	19,53

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	97,12	9	10,79	0,78	0,6320
FA	10,04	1	10,04	0,73	0,3996
FB	19,33	4	4,83	0,35	0,8410
Tratamiento	67,76	4	16,94	1,23	0,3184
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	412,56	30	13,75		
Total	509,69	39			

AP28

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AP28	40	0,19	0,00	20,00

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	100,70	9	11,19	0,77	0,6450
FA	7,74	1	7,74	0,53	0,4712
FB	23,17	4	5,79	0,40	0,8082
Tratamiento	69,78	4	17,44	1,20	0,3314
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	436,29	30	14,54		
Total	536,99	39			

Anexo C 2 Análisis de varianza altura de planta

DT7

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DT7	40	0,11	0,00	16,88

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,79	9	0,09	0,41	0,9170
FA	0,01	1	0,01	0,06	0,8141
FB	0,17	4	0,04	0,20	0,9362
Tratamiento	0,61	4	0,15	0,72	0,5858
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	6,35	30	0,21		
Total	7,14	39			

DT14

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DT14	40	0,11	0,00	5,31

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,10	9	0,01	0,40	0,9247
FA	0,03	1	0,03	1,00	0,3257
FB	0,05	4	0,01	0,47	0,7583
Tratamiento	0,02	4	0,01	0,18	0,9450
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	0,83	30	0,03		
Total	0,93	39			

DT21

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DT21	40	0,26	0,04	6,11

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	9	0,05	1,17	0,3504
FA	0,08	1	0,08	1,96	0,1714
FB	0,06	4	0,02	0,41	0,8014
Tratamiento	0,27	4	0,07	1,73	0,1701
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	1,18	30	0,04		
Total	1,60	39			

DT28

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DT28	40	0,16	0,00	6,26

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,27	9	0,03	0,65	0,7497
FA	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
FB	0,12	4	0,03	0,63	0,6415
Tratamiento	0,15	4	0,04	0,82	0,5245
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	1,39	30	0,05		
Total	1,65	39			

Anexo C 3 Análisis de varianza diámetro de tallo

Diametro (cm)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro (cm)	40	0,21	0,00	9,11

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	9	7,5E-04	0,90	0,5374
FA	1,4E-03	1	1,4E-03	1,74	0,1973
FB	4,0E-03	4	1,0E-03	1,20	0,3301
Tratamiento	1,3E-03	4	3,2E-04	0,39	0,8156
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	0,02	30	8,3E-04		
Total	0,03	39			

AP (cm)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AP (cm)	40	0,12	0,00	10,68

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19,59	9	2,18	0,44	0,8991
FA	0,13	1	0,13	0,03	0,8733
FB	16,01	4	4,00	0,82	0,5239
Tratamiento	3,46	4	0,86	0,18	0,9486
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	146,78	30	4,89		
Total	166,37	39			

CC (cm)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CC (cm)	40	0,25	0,03	13,76

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	80,42	9	8,94	1,14	0,3671
FA	32,49	1	32,49	4,14	0,0507
FB	24,33	4	6,08	0,78	0,5496
Tratamiento	23,60	4	5,90	0,75	0,5643
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	235,24	30	7,84		
Total	315,66	39			

IV (m3)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
IV (m3)	40	0,25	0,03	39,20

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4787,83	9	531,98	1,11	0,3838
FA	1309,77	1	1309,77	2,74	0,1083
FB	1805,19	4	451,30	0,94	0,4520
Tratamiento	1672,87	4	418,22	0,88	0,4904
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	14337,54	30	477,92		
Total	19125,37	39			

Anexo C 4 Análisis de varianza de índice de vigor

EF 21

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EF 21	40	0,16	0,00	9,23

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15,62	9	1,74	0,63	0,7593
FA	0,01	1	0,01	3,5E-03	0,9532
FB	4,04	4	1,01	0,37	0,8286
Tratamiento	11,56	4	2,89	1,06	0,3955
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	82,16	30	2,74		
Total	97,77	39			

EF 28

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EF 28	40	0,09	0,00	9,23

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	28,35	9	3,15	0,32	0,9621
FA	3,00	1	3,00	0,30	0,5852
FB	17,62	4	4,40	0,45	0,7740
Tratamiento	7,73	4	1,93	0,20	0,9386
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	295,93	30	9,86		
Total	324,28	39			

EF 35

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EF 35	40	0,09	0,00	5,90

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12,61	9	1,40	0,34	0,9557
FA	1,75	1	1,75	0,42	0,5225
FB	10,18	4	2,55	0,61	0,6587
Tratamiento	0,68	4	0,17	0,04	0,9967
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	125,21	30	4,17		
Total	137,82	39			

EF 42

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EF 42	40	0,06	0,00	8,18

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12,76	9	1,42	0,20	0,9928
FA	0,49	1	0,49	0,07	0,7972
FB	7,75	4	1,94	0,27	0,8963
Tratamiento	4,53	4	1,13	0,16	0,9585
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	216,99	30	7,23		
Total	229,76	39			

Anexo C 5 Análisis de varianza de estado fotosintético

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LR (cm)	40	0,14	0,00	21,27

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54,65	9	6,07	0,56	0,8174
FA	18,91	1	18,91	1,75	0,1962
FB	27,14	4	6,78	0,63	0,6469
Tratamiento	8,61	4	2,15	0,20	0,9370
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	324,58	30	10,82		
Total	379,23	39			

Anexo C 6 Análisis de varianza longitud radicular

pH

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH	40	0,07	0,00	4,80

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,23	9	0,03	0,25	0,9841
FA	0,13	1	0,13	1,22	0,2790
FB	0,03	4	0,01	0,08	0,9889
Tratamiento	0,07	4	0,02	0,17	0,9511
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	3,18	30	0,11		
Total	3,41	39			

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Conductividad	40	0,56	0,42	14,43

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54207,43	9	6023,05	4,18	0,0014
FA	4568,91	1	4568,91	3,17	0,0852
FB	31220,09	4	7805,02	5,41	0,0021
Tratamiento	18418,44	4	4604,61	3,19	0,0268
FA*FB	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
FA*FB*Tratamiento	0,00	0	0,00	sd	sd
Error	43264,56	30	1442,15		
Total	97471,99	39			

Anexo C 7 Análisis de varianza de pH y conductividad eléctrica

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
%G5	40	53,23	27,48	0,85	<0,0001
%E15	40	96,17	10,45	0,39	<0,0001

Anexo C 8 Análisis de Shapiro - Wilks variables germinativas

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Altura (cm) 1	120	17,26	3,13	0,94	<0,0001
Altura (cm) 2	120	20,85	2,38	0,97	0,2229
Altura (cm) 3	120	21,52	2,29	0,98	0,3217
Altura (cm) 4	120	21,71	2,41	0,99	0,9691

Anexo C 9 Análisis de Shapiro - Wilks altura de planta

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Diametro (mm)	120	2,72	0,50	0,93	<0,0001
Diametro (mm) 1	120	3,17	0,25	0,96	0,0242
Diametro (mm) 2	120	3,20	0,33	0,96	0,0053
Diametro (mm) 3	120	3,41	0,27	0,97	0,0589

Anexo C 10 Análisis de Shapiro - Wilks diámetro de tallo

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Diametro (cm)	80	0,31	0,04	0,97	0,2702
AP (cm)	80	20,63	3,42	0,83	<0,0001
CC (cm)	80	20,27	4,63	0,95	0,0242
IV (m3)	80	58,87	31,50	0,95	0,0420

Anexo C 11 Análisis Shapiro-Wilks índice de vigor

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
4/6/2026	160	17,92	2,26	0,95	<0,0001
13/6/2026	160	34,01	4,65	0,97	0,0088
20/6/2026	160	34,62	3,19	0,97	0,0225
27/6/2026	160	32,89	3,83	0,98	0,4410

Anexo C 12 Análisis Shapiro-Wilks Estado fotosintético

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
LR (cm)	80	15,47	4,04	0,96	0,1270

Anexo C 13 Análisis Shapiro-Wilks longitud raíz principal

TRICHODERMA SPP.

Trichoderma spp. es un género de hongos benéficos ampliamente utilizados en la agricultura como biofungicida y promotor del crecimiento vegetal. Se encuentra naturalmente en el suelo y actúa como un antagonista de hongos fitopatógenos, protegiendo a los cultivos contra enfermedades causadas por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., entre otros. Además, *Trichoderma* desempeña un papel fundamental en la solubilización de nutrientes, la estimulación del desarrollo radicular y la mejora de la estructura del suelo.

El mecanismo de acción de *Trichoderma* se basa en varios procesos biológicos. Primero, compite por espacio y nutrientes, desplazando a los patógenos del suelo. También produce enzimas hidrolíticas y metabolitos antifúngicos, los cuales degradan la pared celular de los hongos patógenos, inhibiendo su crecimiento y propagación. Además, *Trichoderma* puede inducir resistencia sistémica en las plantas, activando sus defensas naturales contra enfermedades y estrés ambiental. Su aplicación regular no solo protege los cultivos, sino que también mejora la biodisponibilidad de fósforo y otros minerales esenciales, promoviendo un crecimiento vegetal más vigoroso y sostenible.

10

PRESENTACIÓN LÍQUIDO

1. Información General

Nombre Comercial: Trichoderma
Nombre Científico: *Trichoderma* spp.
Tipo de Producto: Ematrich

2. Descripción del Producto

Trichoderma es un hongo benéfico ampliamente utilizado en la agricultura sostenible por su capacidad de controlar hongos fitopatógenos, mejorar el desarrollo de las plantas y promover un ecosistema radicular saludable. Se recomienda para el manejo integrado de enfermedades y como bioestimulante natural.

3. Propiedades Físicoquímicas

- Estado: Líquido
- Color: Verde
- pH: 3-4
- Olor: Característico (sui géneris)
- Densidad: Aproximadamente 1.02 g/cm³
- Solubilidad: Miscible en agua

4. Control de Calidad Biológico

- Concentración: $\geq 1 \times 10^8$ UFC/mL
- Pureza: $\geq 95\%$
- Viabilidad: $\geq 95\%$
- Contaminación Microbiana: Ausente

5. Mecanismos de Acción

Trichoderma ejerce su efecto biocontrolador y bioestimulante mediante múltiples mecanismos:

- Competencia por espacio y nutrientes: Coloniza rápidamente la rizosfera, desplazando a patógenos.
- Micoparasitismo y antibiosis: Libera enzimas y metabolitos antifúngicos que degradan la pared celular de los hongos patógenos.
- Inducción de resistencia en plantas: Activa los sistemas de defensa natural de los cultivos.
- Solubilización de nutrientes: Facilita la absorción de fósforo y otros elementos esenciales.
- Mejora del ambiente radicular: Estimula el crecimiento radicular y aumenta la capacidad de absorción de agua y nutrientes.

6. Objetivos Biológicos

Control eficaz de diversos hongos fitopatógenos, tales como:

- *Fusarium* spp.

- *Rhizoctonia* spp.
- *Sclerotinia* spp.
- *Pythium* spp.
- *Botrytis* spp.
- *Phytophthora* spp.

7. Dosis y Aplicación

- Aplicación Foliar o al Suelo: 1 L en 100-200 L de agua.
- Tratamiento de Semillas: 1 L para 15-20 kg de semillas.
- Inmersión de Plántulas: 250 ml en 2.5 L de agua antes del trasplante.
- Frecuencia Recomendada: Cada 8-15 días según condiciones del cultivo y nivel de incidencia del patógeno.

8. Formas de Aplicación

- Pulverización foliar
- Aplicación al suelo mediante riego o drench
- Inoculación en compost o sustratos
- Tratamiento de semillas

9. Compatibilidad

- Compatibilidad: Apto para el uso conjunto con biofertilizantes y abonos orgánicos.
- Incompatibilidad: No se recomienda mezclar con fungicidas químicos o productos con pH extremo.
- pH óptimo:
 - Para hongos: 5-7
 - Para bacterias: 6-7

10. Almacenamiento y Estabilidad

- Condiciones de almacenamiento: Mantener en refrigeración entre 4-10°C.
- Vida útil: 90 días en refrigeración, 30 días a temperatura ambiente en lugar fresco y seco.
- Evitar: Exposición directa a la luz solar y temperaturas superiores a 25°C.

11. Seguridad y Consideraciones Toxicológicas

- Categoría Toxicológica: IV (Franja Verde) – Producto de bajo riesgo para el usuario y el medio ambiente.
- Precauciones: Uso de guantes y gafas de protección en su manipulación.
- Tiempo de reingreso: No requiere periodo de carencia.

Ilustración 1 Detalle de ficha técnica de *Trichoderma* spp.

FICHA TÉCNICA

BACILLUS SUBTILIS

Bacillus subtilis es una bacteria benéfica ampliamente utilizada en la agricultura como biofungicida, biofertilizante y bioestimulante. Su capacidad para controlar enfermedades fúngicas y bacterianas, promover el crecimiento vegetal y mejorar la disponibilidad de nutrientes la convierte en una herramienta clave en el manejo integrado de cultivos. Se encuentra de manera natural en el suelo y en la rizósfera, donde actúa protegiendo las raíces de los cultivos y favoreciendo su desarrollo.

El mecanismo de acción de *Bacillus subtilis* se basa en:

- 1 Producción de metabolitos antifúngicos y antibacterianos, inhibiendo patógenos del suelo como *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp.
- 2 Competencia por espacio y nutrientes, desplazando microorganismos fitopatógenos e impidiendo su proliferación.
- 3 Inducción de resistencia sistémica en las plantas, activando sus defensas naturales contra enfermedades.
- 4 Solubilización de fósforo y producción de fitohormonas, mejorando la absorción de nutrientes y estimulando el crecimiento radicular.

El uso de *Bacillus subtilis* en la agricultura contribuye a fortalecer el sistema inmunológico de las plantas, mejorar la salud del suelo y reducir la necesidad de fungicidas químicos. Su aplicación en riego, suelo y foliar permite un control efectivo de enfermedades y un mejor desarrollo de los cultivos. Además, su capacidad para persistir en la rizósfera y colonizar las raíces lo convierte en un bioinsumo fundamental para una agricultura más sostenible y ecológica.

48

PRESENTACIÓN LÍQUIDO

1. Información General

Nombre Comercial: *Bacillus subtilis* (Líquido)

Nombre Científico: *Bacillus subtilis*

Tipo de Producto: Biofungicida y bioestimulante microbiológico

2. Descripción del Producto

Bacillus subtilis es una bacteria benéfica ampliamente utilizada en la agricultura para el control biológico de hongos patógenos, estimulación del crecimiento vegetal y mejora de la salud del suelo. Su formulación líquida permite una fácil aplicación en cultivos, suelos y sistemas de riego.

3. Propiedades Fisicoquímicas

- Estado: Líquido
- Color: Amarillo claro a marrón
- pH: 6 - 7
- Olor: Característico fermentado
- Densidad: Aproximadamente 1.02 g/cm³
- Solubilidad: Miscible en agua

4. Control de Calidad Biológico

- Concentración: $\geq 1 \times 10^8$ UFC/mL
- Pureza: $\geq 95\%$
- Viabilidad: $\geq 95\%$
- Contaminación Microbiana: Ausente

5. Mecanismos de Acción

Bacillus subtilis beneficia los cultivos mediante:

- Producción de compuestos antifúngicos (lipopéptidos, antibióticos naturales).
- Competencia con hongos patógenos por espacio y nutrientes.
- Inducción de resistencia sistémica en las plantas contra enfermedades.
- Solubilización de fósforo y otros nutrientes esenciales.
- Estimulación del crecimiento radicular y vigor de la planta.

6. Beneficios

- Control biológico contra hongos fitopatógenos.
- Mejora la absorción de nutrientes esenciales.
- Estimula el desarrollo radicular y foliar.
- Incrementa la resistencia de las plantas a enfermedades.

7. Dosis y Aplicación

- Aplicación foliar: 1-2 L en 100-200 L de agua/ha.
- Aplicación al suelo: 2-3 L en 200 L de agua/ha.
- Frecuencia Recomendada: Aplicaciones cada 10-15 días según presión de enfermedades.

8. Compatibilidad

- Compatible: Con biofertilizantes y microorganismos benéficos.
- Incompatible: Con fungicidas químicos y productos con pH extremo.
- pH óptimo: 6 - 7 para máxima efectividad.

9. Almacenamiento y Estabilidad

- Condiciones de almacenamiento: Refrigeración entre 4-10°C.
- Vida útil: 90 días en refrigeración, 30 días a temperatura ambiente en lugar fresco y seco.

10. Seguridad y Consideraciones Toxicológicas

- Categoría Toxicológica: IV (Franja Verde) – Producto seguro para humanos y el medio ambiente.
- Precauciones: Uso de guantes y gafas de protección en la manipulación.
- Tiempo de reingreso: No requiere periodo de carencia.

49

Ilustración 2 Detalle de ficha técnica de *Bacillus subtilis*.

FICHA TÉCNICA

PSEUDOMONA SPP.

To get started, just tap or click this placeholder text and begin typing. You can view and edit this book on your Mac, iPad, or iPhone.

It's easy to edit text, customize fonts, personalize text styles, and add beautiful graphics.

To add photos, image galleries, audio clips, videos, charts, or any of more than 700 customizable shapes, tap or click one of the insert buttons in the toolbar or drag and drop the objects onto the page. You can layer objects, resize them, and place them anywhere on the page. To change how an object moves with text, select the object and then tap or click the Arrange tab in the Format controls.

You can use Pages for both word processing and page layout. This book template is set up for page layout so you can manually rearrange pages and freely position text boxes, images, and other objects on the page. When exported to EPUB, the layout of each page in your book will be maintained. This is best for image-heavy or multi-column books.

In word processing documents, your text flows from one page to the next as you type, with new pages created automatically when you reach the end of a page. When exported to EPUB, content can reflow to accommodate different devices and orientations. This is best for books containing primarily text. To create a word processing document, choose a portrait book template in the template chooser.

PRESENTACIÓN GEL

1. Información General

Nombre Comercial: Pseudomonas spp. (Líquido)
Nombre Científico: Pseudomonas spp.
Tipo de Producto: Biofungicida y bioestimulante microbiológico

2. Descripción del Producto

Pseudomonas spp. es un microorganismo benéfico del suelo ampliamente utilizado en la agricultura por su capacidad de controlar enfermedades fúngicas y bacterianas, solubilizar fósforo, inducir resistencia en las plantas y estimular el crecimiento vegetal. Su formulación líquida facilita su aplicación en cultivos, suelos y sistemas de riego.

3. Propiedades Físicoquímicas

- Estado: Líquido
- Color: Amarillo claro a marrón
- pH: 6 - 7
- Olor: Característico fermentado
- Densidad: Aproximadamente 1.02 g/cm³
- Solubilidad: Miscible en agua

4. Control de Calidad Biológico

- Concentración: ≥ 1x10⁸ UFC/mL
- Pureza: ≥ 95%
- Viabilidad: ≥ 95%
- Contaminación Microbiana: Ausente

5. Mecanismos de Acción

- Pseudomonas spp. favorece la sanidad vegetal mediante:
- Producción de metabolitos antifúngicos y antibacterianos, reduciendo enfermedades.
 - Solubilización de fósforo y otros minerales esenciales, mejorando la nutrición de las plantas.
 - Producción de sideróforos, compuestos que capturan hierro y limitan su disponibilidad para patógenos del suelo.
 - Inducción de resistencia sistémica en las plantas, fortaleciendo sus defensas naturales.
 - Competencia con patógenos por espacio y nutrientes en la rizósfera.

6. Espectro de Acción (Patógenos Controlados)

Pseudomonas spp. es eficaz contra diversas enfermedades del suelo y foliares, incluyendo:

- Fusarium spp.
- Pythium spp.
- Rhizoctonia spp.
- Phytophthora spp.
- Xanthomonas spp.
- Erwinia spp.
- Botrytis spp.

7. Beneficios

- Previene y controla enfermedades radiculares y foliares.
- Mejora la disponibilidad de fósforo y micronutrientes en el suelo.
- Aumenta la resistencia de las plantas al estrés abiótico y biótico.
- Promueve el crecimiento vegetal y el desarrollo radicular.

8. Dosis y Aplicación

- Aplicación foliar: 1-2 L en 100-200 L de agua/ha.
- Aplicación al suelo: 2-3 L en 200 L de agua/ha mediante riego o drench.
- Frecuencia Recomendada: Aplicaciones cada 10-15 días según la incidencia de enfermedades o requerimientos del cultivo.

9. Compatibilidad

- Compatible: Con biofertilizantes y microorganismos benéficos.
- Incompatible: Con fungicidas químicos y productos con pH extremo.
- pH óptimo: 6 - 7 para máxima efectividad.

10. Almacenamiento y Estabilidad

- Condiciones de almacenamiento: Refrigeración entre 4-10°C.
- Vida útil: 90 días en refrigeración, 30 días a temperatura ambiente en lugar fresco y seco.

11. Seguridad y Consideraciones Toxicológicas

- Categoría Toxicológica: IV (Franja Verde) – Producto seguro para humanos y el medio ambiente.
- Precauciones: Uso de guantes y gafas de protección en la manipulación.
- Tiempo de reingreso: No requiere periodo de carencia.

Ilustración 3 Detalle de ficha técnica de *Pseudomonas spp.*