



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de las comunidades locales de hongos formadores de micorrizas arbusculares y patrones de injertación en la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc

Jhon Felipe Sandoval Pineda

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2019

Efecto de las comunidades locales de hongos formadores de micorrizas arbusculares y patrones de injertación en la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc

Jhon Felipe Sandoval Pineda

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Dra. Esperanza Torres Rojas

Codirectora:

Dra. Alia Rodriguez

Línea de Investigación:

Fisiología de cultivos

Grupo de Investigación:

Bioteología de Micorrizas Arbusculares

Agrobiodiversidad y biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2019

*A mis padres por su amor y apoyo
incondicional*

“The scientific man does not aim at an immediate result. He does not expect that his advanced ideas will be readily taken up. His work is like that of the planter - for the future. His duty is to lay the foundation for those who are to come and point the way”

Nikola Tesla

Agradecimientos

A Esperanza Torres, mi directora y a Alia Rodriguez, mi codirectora de tesis por su apoyo, direccionamiento y orientación constante. Por su paciencia y dedicación en este proceso.

A Edwin Gutiérrez, director de investigación y Annie Zamora, gestora de investigación de FEDECACAO por su apoyo y tutoría durante el diseño y ejecución del proyecto.

A la profesora Liz Patricia Moreno, por su tiempo y apoyo incondicional en la revisión del documento.

Al profesor Enrique Darghan, por el asesoramiento en el establecimiento de los diseños experimentales y el análisis estadístico.

A la doctora Margarita Rodríguez y a Adrián Urley Pérez, investigadores de AGROSAVIA por su apoyo y acompañamiento en la caracterización e identificación de morfoespecies de HFMA.

A los ingenieros agrónomos Rafael Córdoba y Jhon Freddy León de FEDECACAO por su apoyo logístico y asesoramiento en el establecimiento de los ensayos.

A Gonzalo Sandoval Castro, mi señor padre y Hortensia Pineda, mi señora madre por siempre brindarme su apoyo incondicional desde el comienzo hasta el final de este proyecto.

A el ingeniero agrónomo Pedro David Nizo y al estudiante de biología Emmanuel León, por su apoyo y excelente disposición durante todos los viajes realizados a la región de Yacopí.

A los viveristas Yair Carreño e Irma Carreño por su apoyo en la supervisión del estado sanitario de las plantas y disposición del espacio para el montaje del experimento.

A el señor Eduardo Ramírez y Nubia Gómez, productores de cacao de la región de Yacopí, Cundinamarca por su buena disposición y apoyo en la colección de muestras.

Al vivero Agrocacao de Santander por el adecuado manejo y seguimiento estricto de las instrucciones del manejo de plantas de propagación utilizadas en este trabajo.

Al profesor Guido Plaza por sus consejos y apoyo durante la realización de este proyecto.

Al ingeniero agrónomo Alexander Caballero por su contribución y apoyo en el procesamiento de muestras de campo.

A los integrantes de los grupos de investigación de Agrobiodiversidad y Biotecnología de Micorrizas Arbusculares por su constante retroalimentación que enriqueció la discusión de los resultados obtenidos en esta investigación.

Al programa “jóvenes investigadores por la paz 2017” de la convocatoria 775 de Colciencias, el Fondo Nacional de Cacao, el Corredor Tecnológico Agroindustrial de cacao y la dirección de investigación de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto.

A mis amigos y familiares que con sus palabras de apoyo hicieron posible la finalización de este proyecto.

A todas las demás personas que de una u otra manera hicieron parte de este proceso.

Gracias

Resumen

El cadmio (Cd) y el zinc (Zn) son metales pesados (MPs) presentes en suelos de algunas regiones de Colombia que pueden ser acumulados en los tejidos de plantas de cacao. La inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) es una estrategia que podría reducir la toma y acumulación de MPs en varias plantas; no obstante, resultados controversiales indican la necesidad de contar con un mejor entendimiento de esta simbiosis. Este estudio determinó el efecto de las comunidades locales de HFMA sobre la fisiología de dos patrones de injertación de cacao sometidas a estrés por Cd y Zn, como alternativa de manejo de suelos en la región de Yacopí, Cundinamarca. Para ello (i) se caracterizaron morfoespecies de HFMA presentes en suelos cacaoteros con baja (ML) y alta (MH) concentración de los MPs mediante claves taxonómicas, encontrando menor abundancia (21%), riqueza (20%) y diversidad (11%) de esporas en ML con respecto a MH, así como una baja similaridad y tasa de recambio entre las dos comunidades. Posteriormente (ii) se evaluó el comportamiento fisiológico de semillas de cacao (IMC67 y PA121) sembradas en un suelo sin (CS) y con enriquecimiento de Cd y Zn (ES), encontrando que estos metales se acumularon principalmente en tejidos aéreos y generaron disminuciones en la toma de Mg, verdor, eficiencia fotosintética y crecimiento de las plantas. Finalmente, (iii) se evaluó la inoculación con HFMA (Control, ML, MH o MC: producto comercial) en dos genotipos (IMC67 y CAU43, ambos injertados con FSV41) trasplantados a ES durante cinco meses. Se encontró que una alta relación Zn/Cd en el suelo (8,5) influyó en la toma de estos metales por las plantas, disminuyendo la acumulación de Cd (0,4 veces) e incrementando la de Zn (2,4 veces) con respecto al umbral de toxicidad reportado para cacao. Sin embargo, no se presentó clorosis o reducciones en el F_v/F_m . La inoculación con HFMA incrementó la colonización y afectó la fisiología de las plantas dependiendo del genotipo. MC incremento 24% la biomasa total de IMC67, mientras que MH, ML y MC generaron reducciones de hasta un 32% en la toma de Cd en hojas de CAU43. Este trabajo destaca la importancia de la interacción genotipo del hospedero-HFMA y la edad de la planta como factores que determinan el tipo de respuesta fisiológica del cacao en suelos enriquecidos con Cd y Zn.

Palabras Clave: estructura de la comunidad, metales pesados, genotipo, planta hiperacumuladora, relación Zn/Cd, mitigación, mecanismos de detoxificación

Abstract

Cadmium (Cd) and zinc (Zn) are heavy metals (HMs) present in soils of some Colombian regions and they can be accumulated in cocoa plant tissues. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) may reduce MPs uptake and accumulation in several plants; however, controversial results suggested the necessity of a better understanding of this symbiosis. This study determined the effect of local AMF communities on the physiology of two cacao grafted rootstocks under Cd and Zn stress as management alternative of HMs-enriched soils in a Colombian region. For this (i) AMF morphotypes presented in cocoa soils with low (ML) and high (MH) concentration of these HMs were characterized by taxonomic keys. Results indicated lower abundance (21%), richness (20%) and diversity (11%) of AMF spores in ML, as well as a low similarity and turnover rate between two communities. Consequently, (ii) the physiological behavior of cocoa seeds (IMC67 and PA121) sown in soils without (CS) and with Cd and Zn enrichment (ES) were assessed, data suggest that these HMs are accumulated mainly in shoot plant tissues and reduce Mg uptake, greenness, photosynthetic efficiency and growth. Finally, (iii) the inoculation with AMF (Control, ML, MH or MC: commercial product) was assessed in two genotypes (IMC67 and CAU43, both grafted with FSV41) transplanted to ES for five months. It was found that a high soil Zn/Cd ratio (8.5) influenced the uptake of these metals by the plants, Cd accumulation in shoot was decreased (0.4 times) and Zn was increased (up to 2.4 times) regarding cocoa critical toxicity concentration threshold. However, plants did not present chlorosis or reductions in photosynthesis efficiency. The inoculation with AMF increased root colonization and affected plant physiology depending on rootstock genotype. MC increased 24% the total biomass of IMC67, while MH, ML and MC reduced up to 32% Cd accumulation in CAU43 leaves. This research highlights the importance of the host genotype-AMF interaction and plant development stage as important factors that determine cocoa physiological response under Cd and Zn stress.

Keywords: AMF community structure, heavy metals, genotype, hyperaccumulator plant, Zn/Cd ratio, mitigation, detoxification mechanisms

Contenido

| | |
|---|-------------|
| Lista de figuras | XIV |
| Lista de Tablas | XV |
| Lista de figuras suplementarias..... | XVI |
| Lista de Tablas suplementarias | XVII |
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 5 |
| Marco teórico | 6 |
| El sistema productivo de cacao | 6 |
| Generalidades del cacao..... | 6 |
| Variedades del cacao..... | 6 |
| Métodos de propagación..... | 7 |
| Contexto económico internacional del cacao | 7 |
| Contexto económico nacional del cacao | 7 |
| Los metales pesados | 8 |
| Efectos nocivos del Cd en las plantas | 9 |
| Efectos nocivos del Zn en las plantas..... | 10 |
| Estrés oxidativo por MPs..... | 11 |
| Respuesta fisiológica de los metales pesados..... | 11 |
| Mecanismos de detoxificación de las plantas ante los metales pesados | 13 |
| Los hongos formadores de micorrizas arbusculares..... | 17 |
| Los HFMA como estrategia de mitigación de los MPs en las plantas | 17 |
| Mecanismos de los MPs en la homeostasis de los HFMA..... | 19 |
| 1. Capítulo I: Alta presencia de cadmio y zinc resulta en baja diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)..... | 23 |
| 1.1 Resumen | 23 |
| 1.2 Introducción..... | 24 |
| 1.3 Materiales y métodos | 26 |
| 1.3.1 Localización y muestreo de suelo | 26 |
| 1.3.2 Análisis físico-químicos y taxonomía del suelo | 26 |
| 1.3.3 Multiplicación de esporas de HFMA..... | 27 |
| 1.3.4 Extracción de esporas..... | 27 |
| 1.3.5 Identificación morfológica de esporas de HFMA | 27 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.3.6 | Determinación de estructura de la comunidad de HFMA..... | 28 |
| 1.3.7 | Análisis estadístico | 28 |
| 1.4 | Resultados..... | 29 |
| 1.4.1 | Composición físico-química y taxonomía del suelo..... | 29 |
| 1.4.2 | Estructura de la comunidad de HFMA | 29 |
| 1.4.3 | Índices de diversidad y ACP | 33 |
| 1.5 | Discusión | 35 |
| 1.6 | Conclusiones..... | 38 |
| 1.7 | Bibliografía..... | 38 |
| | | |
| 2. | Capítulo II: Nutrición, eficiencia fotosintética y crecimiento de dos genotipos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) en suelos con alta concentración de zinc y cadmio | 43 |
| 2.1 | Resumen | 43 |
| 2.2 | Introducción | 44 |
| 2.3 | Materiales y métodos | 46 |
| 2.3.1 | Establecimiento del experimento y material vegetal | 46 |
| 2.3.2 | Análisis físico-químico de suelo | 47 |
| 2.3.3 | Contenido de nutrientes y Cd en tejidos | 47 |
| 2.3.4 | Verdor de la hoja | 48 |
| 2.3.5 | Fluorescencia de la clorofila de <i>a</i> | 48 |
| 2.3.6 | Crecimiento..... | 48 |
| 2.3.7 | Diseño experimental y análisis estadístico | 48 |
| 2.4 | Resultados..... | 49 |
| 2.4.1 | Composición físicoquímica del suelo | 49 |
| 2.4.2 | Contenido de nutrientes en la hoja | 49 |
| 2.4.3 | Contenido de Zn y Cd en tejidos..... | 50 |
| 2.4.4 | Verdor de la hoja | 51 |
| 2.4.5 | Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> | 51 |
| 2.4.6 | Crecimiento..... | 53 |
| 2.5 | Discusión | 55 |
| 2.5.1 | Suelos enriquecidos naturalmente con Cd y Zn | 55 |
| 2.5.2 | Nutrición y acumulación de Cd y Zn en la planta | 56 |
| 2.5.3 | Distribución de Cd y Zn en tejidos | 57 |
| 2.5.4 | Verdor de la hoja | 58 |
| 2.5.5 | Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> | 58 |
| 2.5.6 | Crecimiento..... | 59 |
| 2.6 | Conclusiones..... | 60 |
| 2.7 | Bibliografía..... | 60 |
| | | |
| 3. | Capítulo III: Efecto de comunidades locales de HFMA sobre la fisiología de dos genotipos de cacao crecidos en suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn | 65 |
| 3.1 | Resumen | 65 |
| 3.2 | Introducción | 66 |
| 3.3 | Materiales y métodos | 68 |
| 3.3.1 | Material vegetal | 68 |
| 3.3.2 | Origen del suelo | 69 |
| 3.3.3 | Inóculos de HFMA | 69 |
| 3.3.4 | Establecimiento del experimento | 69 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.3.5 | Porcentaje de colonización | 69 |
| 3.3.6 | Contenido de Zn y Cd en tejidos vegetales | 70 |
| 3.3.7 | Parámetros de crecimiento | 70 |
| 3.3.8 | Fluorescencia de la clorofila a y verdor de las hojas | 71 |
| 3.3.9 | Análisis químicos de suelo | 71 |
| 3.3.10 | Factor traslocación y extracción de Cd y Zn..... | 71 |
| 3.3.11 | Análisis estadístico | 72 |
| 3.4 | Resultados..... | 72 |
| 3.4.1 | Colonización de la raíz | 72 |
| 3.4.2 | Concentración de Cd y Zn en tejidos..... | 72 |
| 3.4.3 | Crecimiento, fluorescencia de la chl a y verdor..... | 75 |
| 3.4.4 | Contenido de metales foliares con respecto a su biomasa..... | 76 |
| 3.4.5 | Concentración de Cd y Zn en el suelo..... | 76 |
| 3.4.6 | Factor de traslocación y extracción de Cd y Zn..... | 77 |
| 3.5 | Discusión | 78 |
| 3.5.1 | Presencia de suelos enriquecidos con Cd y Zn..... | 78 |
| 3.5.2 | Colonización de la raíz | 78 |
| 3.5.3 | Distribución y acumulación de metales en la planta..... | 79 |
| 3.5.4 | Crecimiento..... | 81 |
| 3.5.5 | Verdor y fluorescencia de la clorofila a | 82 |
| 3.5.6 | Extracción de Cd y Zn | 82 |
| 3.6 | Conclusiones..... | 83 |
| 3.7 | Bibliografía..... | 83 |
| 4. | Discusión general..... | 97 |
| 5. | Conclusiones y recomendaciones | 103 |
| 5.1 | Conclusiones..... | 103 |
| 5.2 | Recomendaciones | 104 |
| 6. | Tablas suplementarias..... | 106 |
| 7. | Figuras suplementarias | 111 |
| 8. | Bibliografía | 117 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Curvas dosis-respuesta de las plantas a elementos esenciales y no esenciales | 9 |
| Figura 2. Mecanismos de respuesta de las plantas bajo estrés por Zn y Cd). | 12 |
| Figura 3. Mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis en las células de las plantas..... | 14 |
| Figura 4. Mecanismos involucrados en la tolerancia a MPs por HFMA y su contribución para la biofortificación y fitoremediación | 22 |
| Figura 5. Morfoespecies de HFMA encontrados en muestras de suelo con alta (a-l) y baja (i-w) concentración de Cd y Zn..... | 30 |
| Figura 6. Riqueza, abundancia y diversidad de HFMA encontrados en suelos con baja y alta concentración de Cd y Zn..... | 31 |
| Figura 7. Abundancias relativas de morfoespecies de HFMA encontrados en suelos con baja y alta concentración de Cd y Zn..... | 33 |
| Figura 8. Análisis de componentes principales y clúster jerárquico basada en la disimilaridad de Bray-Curtis de los morfoespecies de HFMA encontradas en muestreos de dos suelos con baja y alta concentración de Cd y Zn | 34 |
| Figura 9. Acumulación de Cd y Zn en los órganos de genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con baja y alta concentración de Zn y Cd a los 133 DAS. | 51 |
| Figura 10. Verdor de hojas en unidades atLEAF según su posición en la planta de los genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con baja y alta concentración con Zn y Cd a los 133 DDS. | 52 |
| Figura 11. Máximo rendimiento cuántico del fotosistema II, tasa de transporte de electrones, quenching fotoquímico y quenching no fotoquímico de los genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con baja y alta concentración de Zn y Cd..... | 53 |
| Figura 12. Parámetros de crecimiento en plantas de cacao de los genotipos IMC67 y PA121 crecidos en suelo con baja y alta concentración de Zn y Cd..... | 54 |
| Figura 13. Colonización de la raíz en plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente Cd y Zn a los 154 DDT | 73 |
| Figura 14. Acumulación de Cd y Zn en los diferentes partes de las plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn | 74 |

Figura 15. Acumulación de Zn y Cd en el patrón, tallo de copa y las hojas de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn a los 154 DDT 74

Figura 16. Biomasa total y área foliar de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn ... 75

Figura 17. Relación entre el peso seco de las hojas con su concentración de Cd y Zn de plantas de cacao crecidas en suelo enriquecido con Cd y Zn a los 154 DDT 76

Figura 18. Disponibilidad de Cd y Zn en el suelo con plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn..... 77

Lista de Tablas

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Umbrales de deficiencia, toxicidad e hiperacumulación de MPs en plantas terrestres. | 13 |
| Tabla 2. Efecto de la inoculación de diferentes especies de HFMA sobre la acumulación del Cd en plantas hospederas sometidas a estrés por este metal con respecto a plantas no inoculadas. Se resalta en color gris los estudios encontrados en cacao. | 18 |
| Tabla 3. Análisis físico-químico de las muestras de suelo con baja y alta concentración de Cd..... | 29 |
| Tabla 4. Índices de diversidad alfa y beta de HFMA encontrados en muestras originales de suelos con baja y alta concentración de Cd..... | 34 |
| Tabla 5. Caracterización físico-química de suelos usados para crecer los dos genotipos de cacao. Suelo con baja y alta concentración de Zn y Cd a los 90 DAS. | 49 |
| Tabla 6. Contenido de nutrientes bivalentes en hojas de dos genotipos de cacao crecidos en suelo con baja y alta concentración de Zn y Cd a los 133 días después de siembra. | 50 |

Lista de figuras suplementarias

| | Pág. |
|--|------|
| Figura suplementaria 1. Distribución de masa seca de dos genotipos de cacao crecidos en suelo con concentraciones bajas y altas de Zn y Cd a los 133 días después de siembra. | 111 |
| Figura suplementaria 2. Pérdida de electrolitos en hojas de dos genotipos de cacao crecidos en suelos con bajas y altas concentraciones de Zn y Cd | 111 |
| Figura suplementaria 3. Concentración de los inóculos de HFMA utilizados..... | 112 |
| Figura suplementaria 4. Concentración de Cd y Zn en los tejidos de copa y patrón de plantas de cacao a los 164 días después de siembra) antes de trasplantar a los diferentes tratamientos con HFMA y Cd-Zn..... | 112 |
| Figura suplementaria 6. Número de hojas y longitud aérea de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg ⁻¹ Cd y 218 mg kg ⁻¹ Zn a los 154 DDT..... | 113 |
| Figura suplementaria 7. Verdor y máximo rendimiento cuántico del fotosistema II en la segunda hoja totalmente expandida de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg ⁻¹ Cd y 218 mg kg ⁻¹ Zn a los 154 DDT | 113 |
| Figura suplementaria 8. Colonización de la raíz por HFMA en plantas de cacao de cinco años en condiciones naturales establecidas en un suelo sin y con enriquecimiento de Cd y Zn | 114 |
| Figura suplementaria 9. Contenido total de Cd y pH del suelo en el que fueron crecidas plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA. | 114 |
| Figura suplementaria 10. Peso seco por órgano y distribución de materia seca total de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg ⁻¹ Cd y 218 mg kg ⁻¹ Zn a los 154 DDT. | 115 |
| Figura suplementaria 11. Contenido de Mg en hojas de plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg ⁻¹ Cd y 218 mg kg ⁻¹ Zn a los 154 DDT..... | 115 |

Lista de Tablas suplementarias

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla suplementaria 1. Caracterización de perfiles de los suelos con alto y bajo contenido de Cd..... | 106 |
| Tabla suplementaria 2. Correlación de Pearson de los morfoespecies encontrados con las dimensiones del ACP..... | 107 |
| Tabla suplementaria 3. Caracterización fisicoquímica de suelos usados para crecer los dos genotipos de cacao. Suelo con concentraciones bajas y altas de Cd y Zn, antes de realizar el manejo agronómico y a los 90 días después de siembra..... | 107 |
| Tabla suplementaria 4. Correlación de Pearson en el contenido de nutrientes bivalentes de hojas en plantas de cacao de los genotipos IMC67 y PA121 crecidas en suelo con concentración baja y alta concentración de Zn y Ca a los 133 DAS..... | 108 |
| Tabla suplementaria 5. Análisis de varianza del verdor de hojas en unidades según su posición en la planta a los 133 DDS | 108 |
| Tabla suplementaria 6. Análisis de varianza de variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila a y parámetros de crecimiento en cada tiempo de muestreo | 109 |
| Tabla suplementaria 7. Caracterización fisicoquímica del suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn antes de realizar el manejo agronómico mediante fertilización química..... | 109 |
| Tabla suplementaria 8. Factor de transferencia y extracción total de metales por plantas de cacao inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg ⁻¹ Cd y 218 mg kg ⁻¹ Zn a los 154 DDT. | 110 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|-------------|---|
| APX | ascorbato peroxidasa |
| CAT | Catalasa |
| Cd | Cadmio |
| CTC | Concentración crítica tóxica |
| DDS | Días después de siembra |
| DDT | Días después de tratamiento |
| ETR | Tasa de transporte de electrones |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FEDECACAO | Federación Nacional de Cacaoteros |
| FHIA | Fundación Hondureña de Investigación Agrícola |
| FINAGRO | Fondo para el Financiamiento del Sector Agropecuario |
| Fv/Fm | Máximo rendimiento cuántico del fotosistema |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutation |
| HFMA | Hongos formadores de micorizas arbusculares |
| HMA4 | Heavy Metal ATPasa 4 |
| HSP | Heat Shock Protein |
| ICCO | International Cocoa Organization |
| MPs | Metales pesados |
| MTs | Metalotioneinas |
| NA | Nicotinamina |
| NPQ | <i>Quenching</i> no fotoquímico |
| OMS | Organización mundial de la Salud |
| PCR1 | Plant Cadmium Resistance 1 |
| PCs | Fitoquelatinas |
| PSII | Fotosistema II |
| qP | <i>Quenching</i> fotoquímico |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TF | Factor de translocación de MPs |
| ZIF1 | Zinc-induced facilitator 1 |
| ZIP | Zinc-Iron regulated Protein |
| Zn | Zinc |

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo que ha ganado auge en Colombia por su potencial para la producción de granos de sabor fino y de aroma (Chaux & Pérez, 2017). Este nicho de mercado para chocolates premium es definido por la producción de variedades de cacao principalmente criollas que representan el 5% del mercado mundial (200.000 ton año⁻¹) (ICCO, 2016). Por esta razón, en los últimos diez años el área sembrada y la producción nacional de cacao se han incrementado 45% y 51%, respectivamente (FEDECACAO, 2018). En Colombia, el cacao es un cultivo del cual dependen alrededor de 35 mil familias productoras, incluyendo algunas que han encontrado en éste una alternativa a los cultivos ilícitos en diferentes regiones del país (FINAGRO, 2018), la cual ha sido promovida mediante proyectos gubernamentales como “Colombia Siembra” y “Cacao por la paz” (Sierra, 2016; Egas & De Salvo, 2018).

El cadmio (Cd) es un metal pesado (MP) que genera preocupación en el sector cacaotero (Zug *et al.*, 2019), ya que se ha demostrado que las plantas de cacao tienen una alta afinidad por tomar este metal y acumularlo en sus órganos (Chavez *et al.*, 2015; Gramlich *et al.*, 2018; Argüello *et al.*, 2019), más aun dado que el Cd ha sido reportado presente en algunas regiones productoras de Arauca, Boyacá, Santander y Cundinamarca (Bravo *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2019). Este MP puede ingresar a la cadena trófica humana y representar un riesgo potencial para la salud de los consumidores de productos derivados del cacao (Ezedom & Asagba, 2016; FAO & OMS, 2014). Por esta razón, países importadores de grano pertenecientes a la Unión Europea han determinado límites de trazabilidad cada vez más estrictos y que actualmente restringen el acceso a sus mercados (Jiménez, 2015; Zug *et al.* 2019).

El Cd se encuentra presente en diferentes suelos alrededor del mundo (Mahar *et al.*, 2016), como resultado de actividades antropogénicas (Lora & Bonilla, 2010) o debido a fuentes

naturales (Nazar *et al.*, 2012). En este último caso, el Cd puede encontrarse simultáneamente en asociación con otro tipo de metales como el zinc (Zn) (Kabata-Pendias & Barbara, 2015), por la meteorización de materiales sedimentarios enriquecidos (Olade, 1987). Dependiendo de su concentración en el suelo, estos MPs pueden reducir el crecimiento de las plantas por deficiencias nutricionales (Luo *et al.*, 2016) y diferentes alteraciones en la homeostasis celular de las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). En el cacao, la respuesta a estos MPs difiere entre grupos genéticos de cacao (Arévalo-gardini *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2018; Engbersen *et al.*, 2019) por lo tanto, identificar genotipos con menor eficiencia en la toma y acumulación de metales es importante para el desarrollo de programas de mejoramiento a mediano y largo plazo (Meter *et al.*, 2019).

Dentro de las estrategias para el manejo de suelos con MPs se encuentran: la remoción física del suelo (Tang *et al.*, 2016), la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas (Khan *et al.*, 2017) y lavados químicos (Liu *et al.*, 2018). No obstante, estas metodologías son costosas y/o altamente laboriosas, por lo que otra alternativa más eficiente de implementar es el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) (Mishra *et al.*, 2017; Ojuederie & Babalola, 2017). Estos hongos son biótrosos obligados asociados con ~71% de las plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018) y su simbiosis es conocida por remover, secuestrar o disminuir la disponibilidad de algunos MPs en el suelo mediante diferentes mecanismos (Cabral *et al.*, 2015; Girma, 2015). No obstante, respuestas controversiales como incrementos y/o reducciones en la toma de MPs por las plantas después de inocularlas con HFMA, sugieren que esta interacción es altamente compleja y dependiente de varios factores como la concentración y tipo de MPs (Audet & Charest, 2007), la especie y genotipo de la planta (Meier *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2018), la especie (He *et al.*, 2014) y capacidad de aclimatación del HFMA (Bui & Franken, 2018).

La presencia y alta concentración de Cd y Zn en el suelo genera condiciones de estrés nocivas no solo para las plantas sino también para otros organismos como los HFMA (Krishnamoorthy *et al.*, 2015). Estos MPs pueden generar modificaciones en la estructura de la comunidad de HFMA presente dependiendo de la intensidad y duración del estrés (Millar & Bennett, 2016), donde, en teoría las especies más sensibles serán removidas y otras especies con mayor capacidad de adaptación serán favorecidas (Schneider *et al.*, 2016). Sin embargo, esto aún debe ser comprobado experimentalmente. La determinación de la composición de estas comunidades locales de HFMA en suelos con MPs es la base para desarrollar estrategias de mitigación (Schneider *et al.*, 2016); ya que se ha demostrado

que los HFMA tienen una alta capacidad de aclimatarse a condiciones con altas concentraciones de MPs (Bui & Franken, 2018) y estos podrían jugar un papel importante en la fitoremediación de estos ambientes (Khan *et al.*, 2000), reduciendo la acumulación de Cd y la fitotoxicidad en sus plantas hospedero (Hildebrandt *et al.*, 2007; Millar y Bennett, 2016).

Los efectos nocivos del Cd y Zn sobre la fisiología de plantas de cacao han sido previamente estudiados (Cruz *et al.*, 2015; Pereira de Araújo *et al.*, 2017). No obstante, estos estudios se han realizado mediante aplicaciones exógenas e independientes de los MPs sobre un sustrato, donde su disponibilidad es mayor a lo que ocurre en condiciones naturales (Chavez *et al.*, 2016). Por esta razón, experimentos que evalúen los efectos del Zn y el Cd sobre la fisiología de las plantas en condiciones de suelos naturales, son necesarios para proveer información más precisa de la dinámica de estos elementos en el sistema suelo-planta (Khan *et al.*, 2017). Adicionalmente, se requiere de un mejor entendimiento de la simbiosis con HFMA para integrar este componente biológico a los sistemas de producción agrícola (Aguirre *et al.*, 2011), ya que a pesar de que el cacao es una especie micotrófica (Laycock, 1945), a la fecha no hay estudios que evalúen el efecto de la genética de cacao en la respuesta a su asociación con HFMA locales presentes en suelos con Cd y Zn.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de dos patrones de injertación en asocio con comunidades locales de HFMA sobre la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por Cd y Zn como alternativa de manejo de suelos en la región de Yacopí, Cundinamarca. En particular esta investigación plantea tres hipótesis que serán desarrolladas a lo largo del documento: (1) Existen diferencias en la estructura de la comunidad de HFMA presentes en suelos cacaoteros con concentraciones naturalmente altas y bajas de Cd y Zn; (2) Un suelo enriquecido naturalmente con altos niveles de Cd y Zn afectara la acumulación de elementos bivalentes en el tejido foliar y la fisiología de dos genotipos de cacao; y (3) Una comunidad de HFMA proveniente de suelos enriquecidos con Cd-Zn afectaran la acumulación de estos MPs y la fisiología de dos genotipos de cacao sometidos a estrés por Cd y Zn.

Objetivos

Determinar el efecto de las comunidades locales de HFMA sobre la fisiología de dos patrones de injertación de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc, como alternativa de manejo de suelos en la región de Yacopí, Cundinamarca

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la diversidad de HFMA presentes en suelos cacaoteros con alta y baja concentración de cadmio y zinc en Yacopí, Cundinamarca.
2. Determinar la concentración de elementos bivalentes y parámetros fisiológicos de dos patrones de injertación de cacao en suelos con concentraciones naturalmente altas de cadmio y zinc en la región de Yacopí, Cundinamarca.
3. Determinar el efecto de dos patrones de cacao en asocio con comunidades de HFMA locales sobre parámetros fisiológicos y acumulación de cadmio y zinc en suelos con concentraciones naturalmente altas de estos metales en la región de Yacopí, Cundinamarca.

Marco teórico

El sistema productivo de cacao

Generalidades del cacao

El cacao es una especie endémica de América del sur cuyo centro de origen está localizado en la región comprendida entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo, tributarios del río Amazonas (Motamayor *et al.*, 2008). No obstante, el cacao se cultiva en diferentes países del trópico del mundo ubicados entre los 20° latitud norte y 20° latitud sur (Clough *et al.*, 2009). El cacao es un cultivo perenne-tardío que requiere sombrero y condiciones climáticas óptimas entre los 22-33°C con precipitaciones anuales de 1.500-2.500 mm. En Colombia la producción es continua con rendimientos promedio de 300-450 kg ha⁻¹ y los mayores volúmenes se obtienen en los periodos de noviembre-diciembre y mayo-junio (Fedecacao, 2015).

Variedades del cacao

El cacao se categoriza desde el punto de vista botánico en variedades forasteras, criollas y trinitarias que también están asociados con su calidad de grano (ICCO, 2016). Los forasteros o amazónicos son cacaos estándar caracterizados por su alto contenido de grasa y utilizados para la producción de chocolates con sabor amargo. Los criollos son cacaos finos de agradable sabor y exquisito aroma, cuyo fruto es de manejo delicado por su alta susceptibilidad a plagas y enfermedades, y se caracteriza por su lenta producción y baja productividad por árbol. Finalmente, los trinitarios o híbridos son los resultantes del cruzamiento sexual entre clones con el fin de mejorar calidad, productividad, precocidad y respuesta a plagas y enfermedades. En ocasiones se considera una cuarta categoría como el cacao “nacional” originado en la franja de bosque tropical del occidente de los Andes entre Colombia y Ecuador, que corresponde a un grano de cacao bastante grande y de cotiledón castaño claro (Fedecacao, 2015).

Métodos de propagación

La propagación del cacao se hace principalmente mediante injertación en viveros (Fedecacao, 2015), ya que es una técnica de reproducción asexual ampliamente usada en plantas anuales y perennes que permite aumentar la tolerancia a enfermedades de suelo y estreses abióticos (Martínez-Ballesta *et al.*, 2010). Mediante esta práctica se hace uso de un “patrón” o “porta injerto” que es proveniente de semillas de un genotipo vigoroso, precoz y con tolerancia a enfermedades radiculares; y sobre este se injerta la “copa” o “clon” con el fin de reproducir fielmente las características de interés de un parental, como cualidades específicas del fruto y rendimiento de los grupos forastero, criollo o trinitario (FHIA, 2005). Esta técnica permite la fructificación precoz de las plantas y la reproducción de características específicas, representando una gran ventaja para los productores (FEDECACAO, 2015).

Contexto económico internacional del cacao

Para el período 2019 se estima que la producción mundial de cacao alcance los 4,8 millones de toneladas, donde los principales productores serán Costa de Marfil (45%), Ghana (19%), Nigeria (5%), Camerun (5%), Indonesia (5%) y Colombia en el décimo lugar con el (1%) (ICCO, 2019). Se espera que la producción se mantenga con crecimientos leves en África y que este continente se mantendrá como el mayor productor siendo la referencia principal para el precio mundial. Mientras que la producción en Asia decrece por problemas de producción en Indonesia asociados a la presencia de enfermedades y condiciones climáticas desfavorables (FINAGRO, 2018). Los precios internacionales de referencia del cacao se forman en la Bolsa de Nueva York y su tendencia ha sido a la baja de forma sostenida desde el año 2016, dando como resultado una disminución del precio nacional que se ha mantenido entre un 7 y un 10% por debajo de estos precios de referencia (FEDECACAO, 2018). En el primer trimestre del año 2018 se presentó una leve tendencia al alza del precio en el mercado nacional alcanzando los \$6.926 por kilo en el mes de mayo, pero en 2018 el promedio cerro con \$6.155 por kilo (FEDECACAO, 2018).

Contexto económico nacional del cacao

El cultivo de cacao es de importancia económica generando para el año 2017 aproximadamente 155 mil empleos en el país (62 mil directos y 93 mil indirectos)

(FINAGRO, 2018). Adicionalmente, la balanza comercial del grano de cacao para Colombia ha presentado un comportamiento positivo en los últimos años. Las exportaciones del año 2017 superaron las 11 mil toneladas valoradas en USD 27 millones, siendo los principales destinos México, Países Bajos, Italia y España, mientras que las importaciones alcanzaron 428 toneladas por valor de USD 877 mil, provenientes de Venezuela y Ecuador (FINAGRO, 2018). El área sembrada promedio en los últimos diez años fue de 152 mil hectáreas y en el año 2018 está alcanzó las 176.050 hectáreas, distribuidas en los departamentos de Santander (32%), Nariño (8%), Antioquia (8%), Norte de Santander (7%), Arauca (7%), Tolima (7%), Huila (7%) y otros departamentos en menor proporción como Cundinamarca (1%) (FEDECACAO, 2018).

La producción promedio nacional en los últimos 10 años es de 46 mil toneladas y esta se ha acelerado como consecuencia del buen manejo de plagas y enfermedades, así como por los programas de fertilización, renovación y manejo poscosecha (FINAGRO, 2018). Para el año 2018 la producción total fue de 56.867 toneladas y se concentró en el departamento de Santander con 23.547 toneladas (41%), seguido de Antioquia con 4.905 toneladas (9%) y Arauca con 4.478 toneladas (8%) y en menor proporción otros departamentos como Cundinamarca con 1.504 toneladas (2.6%) (FEDECACAO, 2018). Al cierre del primer trimestre del 2018 la producción nacional disminuyó 12% con relación al mismo periodo de 2017, mientras que en los tres primeros meses del año 2017 se produjeron 14.692 toneladas, en el mismo lapso de 2018 esa cifra alcanzó 12.604 toneladas. Entre las razones que explican esta reducción se destaca el clima que en los primeros meses del año se caracterizó por intensas lluvias que afectaron la producción (FEDECACAO, 2018).

Los metales pesados

Los MPs son elementos con densidad específica mayor a 5 g/cm³ (Järup, 2003) y la mayoría son tóxicos para diferentes organismos incluso en concentraciones bajas (Kabata-Pendias & Barbara, 2015). Estos se encuentran presentes en los suelos de diferentes partes del mundo (Khalid *et al.*, 2017), bien sea derivados de su material parental o como resultado de actividades antropogénicas como la aplicación masiva de fertilizantes, riego

con aguas contaminadas y minería, entre otras (He *et al.*, 2005). Los MPs se pueden clasificar en dos categorías dependiendo su esencialidad para la fisiología de las plantas en: los MPs esenciales (Mg, Zn, Cu, Fe) que por encima de ciertas concentraciones son considerados tóxicos; y los MPs no esenciales (Cd, Pb, Cr, As) que no cumplen una función fisiológica y su presencia en la planta puede generar alteraciones en el metabolismo y el crecimiento (Lin & Aarts, 2012; Edelstein & Ben-Hur, 2018) (Fig. 1).

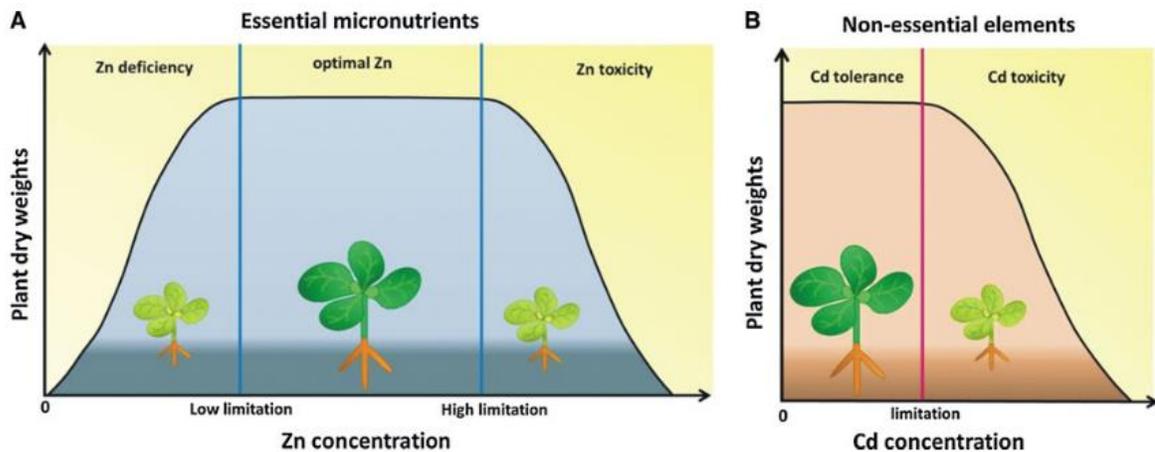


Figura 1. Curvas dosis-respuesta de las plantas a elementos esenciales (a) y no esenciales (b) (Y. F. Lin & Aarts, 2012).

Efectos nocivos del Cd en las plantas

El Cd es un MP que en su forma inorgánica Cd^{2+} presenta bajo coeficiente de absorción y un alto factor de transferencia suelo-planta en comparación a otros metales (Khan *et al.*, 2013). En suelo agrícolas puede encontrarse en concentraciones de hasta 0.8 mg kg^{-1} (Edelstein & Ben-Hur, 2018) y en general se consideran tóxicas para las plantas concentraciones superiores 3 mg kg^{-1} (Khan *et al.*, 2015). Sin embargo, la movilidad del Cd en el suelo dependerá de diferentes parámetros como pH, contenido de materia orgánica, carbonatos, minerales de la arcilla, entre otros (Galán & Romero, 2008). El Cd puede ser absorbido a través de la células epidérmicas de la raíz mediante proteínas transportadoras y canales iónicos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} (Lux *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017), ya que no se han identificado transportadores específicos para Cd (Huang *et al.*, 2017; Dubey *et al.*, 2018). El Cd es transportado a través de vías simplásticas o apoplásticas por el xilema y el floema hasta alcanzar los tejidos de la parte aérea (Seregin & Kozhevnikova, 2008; Page & Feller, 2015).

El Cd es un elemento no esencial, móvil y altamente tóxico que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Benavides *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2018), cuando este se encuentra presente en el suelo puede ser absorbido y translocado a los tejidos aéreos donde puede producir disturbios en la homeóstasis mineral de la planta, daños en la estructura de proteínas membranales (Viehweger, 2014) y estrés oxidativo como producto indirecto de las alteraciones en procesos fisiológicos y metabólicos (Viehweger, 2014; Mahar *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017). Adicionalmente, el Cd al ser un catión divalente al igual que otros elementos, puede competir por los transportadores simplásticos causando deficiencias nutricionales de elementos como el Mg y el Ca (Huamaní *et al.*, 2012) y reducir el contenido de pigmentos fotosintéticos (Teige *et al.*, 1990), el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m) (Pereira de Araújo *et al.*, 2017), la permeabilidad de las membranas (Kumar *et al.*, 2015) y parámetros de crecimiento como la acumulación de biomasa (Dias *et al.*, 2014) y el área foliar de las plantas (Emamverdian *et al.*, 2015).

Efectos nocivos del Zn en las plantas

El Zn es un microelemento esencial para las plantas involucrado en el funcionamiento de varias enzimas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, la transferencia de energía, la síntesis de proteínas y carbohidratos (Hafeez *et al.*, 2013; Emamverdian *et al.*, 2015). Este metal ingresa a las células de la raíz a través de proteínas transportadoras de la familia ZIP (*Zinc-Iron regulated Protein*) ubicadas en la membrana celular y luego es transportado a las diferentes partes de la planta vía xilema (Kramer, 2010; Luo *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando el Zn se encuentra en el suelo en altas concentraciones (150-300 mg kg⁻¹), frecuentemente se excede la concentración crítica tóxica (CTC) de las plantas y se pueden inhibir varias funciones fisiológicas que resultan en crecimiento retardado y la senescencia (Figura 1; Lin & Aarts, 2012).

La toxicidad por Zn genera clorosis en hojas jóvenes y puede extenderse a las hojas más maduras después de un largo periodo de exposición al estrés (Nagajyoti *et al.*, 2010). Esta clorosis puede atribuirse principalmente a la deficiencia inducida de hierro (Fe) por la similitud en radios iónicos o por deficiencias de manganeso (Mn) y cobre (Cu) mediante la interferencia en su transporte raíz-parte aérea (Nagajyoti *et al.*, 2010; Emamverdian *et al.*, 2015). No obstante, otras alteraciones metabólicas como inhibición de la síntesis de

ATP (Teige *et al.*, 1990), desaturación de complejos pigmento-proteínas de los fotosistemas (Nagajyoti *et al.*, 2010; Küpper & Andresen, 2016) y desórdenes en la homeostasis mineral (Kramer, 2010), también pueden estar asociadas a la fitotoxicidad que conllevan a disminuciones en parámetros de crecimiento como la producción de biomasa, la longitud aérea y el área foliar de las plantas (Vijayarangan & Mahalakshmi, 2013).

Estrés oxidativo por MPs

En general la principal respuesta de las plantas ante la presencia de MPs es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jalmi *et al.*, 2018), esto sucede como producto indirecto de disturbios en procesos fisiológicos como: desbalance iónico e hídrico (Hossain *et al.*, 2012; Yadav, 2010), inhibición y sustitución en la estructura de proteínas membranales (Viehweger, 2014), disminución de la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin (Mobin & Khan, 2007), disrupción de la cadena de transporte de electrones (Qadir *et al.*, 2004), competencia por sitios activos de enzimas (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007; Nazar *et al.*, 2012), reducción en la síntesis de clorofilas (Abd-Allah *et al.*, 2016), disturbios osmóticos (Rucińska-Sobkowiak, 2016) y disminuciones en la actividad antioxidante de las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). Los efectos nocivos por la presencia de Cd o concentraciones excesivas de Zn anteriormente mencionados finalmente conllevan generalmente a la disminución del crecimiento de las plantas (Lin & Aarts, 2012).

Respuesta fisiológica de los metales pesados

Los MPs conllevan a diferentes efectos nocivos sobre la fisiología de las plantas como se mencionó anteriormente, sin embargo la existencia de variaciones en la sensibilidad a la presencia de MPs entre especies de plantas (Obata & Umebayashi, 1997), indica el uso de diferentes estrategias para tolerar esta condición de estrés (Lin & Aarts, 2012). Algunas especies MPs-sensitivas ingresan los MPs dentro de sus células afectando la homeostasis celular (Fig. 2a), mientras que otras especies han desarrollado estrategias para tolerar la exposición a altas concentraciones de MPs en el suelo como la restricción del ingreso de iones metal a la célula (Fig. 2b) y/o la tolerancia al estrés mediante detoxificación (Fig. 2c) o la redistribución y compartimentalización de los MPs en las células (Fig. 2d). Estas estrategias serán descritas en detalle a continuación.

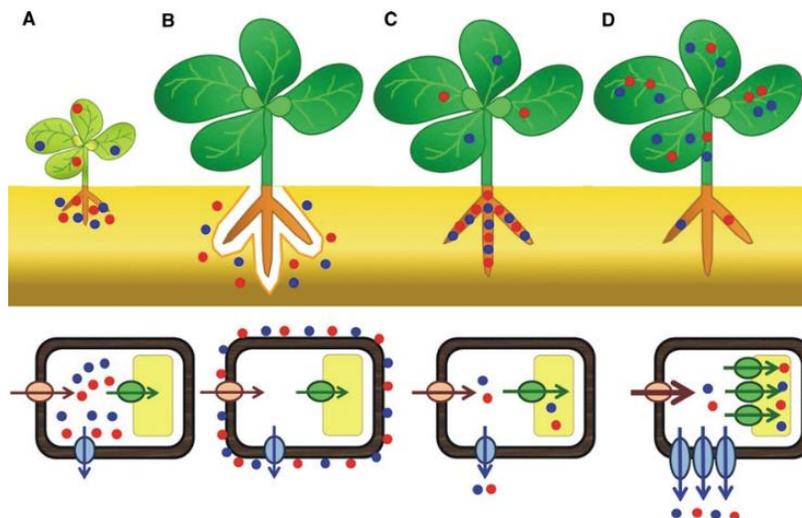


Figura 2. Mecanismos de respuesta de las plantas bajo estrés por Zn (puntos azules) y Cd (puntos rojos): plantas MPs-sensitivas (A), plantas MPs-resistente excluyentes (B), plantas MPs-tolerantes no hiperacumuladoras (C) y plantas MP-tolerantes hiperacumuladoras (D), (Y. F. Lin & Aarts, 2012).

La *estrategia de exclusión o evasión* es aquella utilizada por las plantas para evitar la entrada de los MPs mediante la raíz, por ejemplo reduciendo la biodisponibilidad del metal en el suelo mediante excreción de diferentes compuestos, retención en las paredes celulares o asociación con microorganismos del suelo (Fig. 2b). No obstante, otros factores pueden influenciar esta respuesta ya que la solubilidad de los MPs en la rizosfera es afectada por su concentración en el suelo, la presencia de pH ácidos (Emamverdian *et al.*, 2015), la capacidad de intercambio catiónico (Meter *et al.*, 2019), el contenido de materia orgánica y arcillas, la presencia de compuestos quelantes (Galán & Romero, 2008), la interacción con otros MPs (Topperwien, *et al.*, 2007), la actividad de los microorganismos (Viashaly *et al.*, 2015), entre otros (Meter *et al.*, 2019).

La *estrategia de tolerancia* es aquella utilizada por las plantas para detoxificar y confinar los MPs en una manera controlada mediante diferentes mecanismos (Fig. 2c y 2d). Esta estrategia no solo permite que estas plantas persistan en un ambiente con una alta concentración de los MPs, sino que también estas acumulen en ocasiones concentraciones extremadamente altas de los metales. Dependiendo de la distribución de los MPs en los diferentes tejidos se pueden crear otras dos categorías de plantas con estrategia tolerante: a) las no hiperacumuladoras, que poseen mecanismos de detoxificación y restringen la acumulación de MPs principalmente en los tejidos de la raíz (TF: factor de translocación

menor o cercano a 1) (Lin & Aarts, 2012); y b) las hiperacumuladoras que corresponden a únicamente al ~0.2% de todas las plantas angiospermas y se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación más efectivos que les permite acumular altas concentraciones de MPs (Tabla 1), principalmente en sus tejidos aéreos (TF>1) (Kramer, 2010; Kaur & Garg, 2018).

Tabla 1. Umbrales de deficiencia, toxicidad e hiperacumulación de MPs en plantas terrestres (Kramer, 2010).

| Element | Critical deficiency level ¹ ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Critical toxicity level ¹ ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Hyperaccumulation concentration criterion ($\mu\text{g g}^{-1}$) | | Taxa (No.) | Families (No.) |
|-----------|---|---|--|------------------------------|-------------------|----------------|
| | | | To date | Newly suggested ² | | |
| Antimony | n. r. | <2 | >1000 | | 2 | 2 |
| Arsenic | n. r. | <2–80 | >1000 | | 15 | 2 |
| Cadmium | n. r. | 6–10 | >100 | | 5 | 2 |
| Cobalt | n. r. | 0.4–several | >1000 | >300 | (26) ³ | (11) |
| Copper | 1–5 | 20–30 | >1000 | >300 | (35) | (15) |
| Lead | n. r. | 0.6–28 | >1000 | | (14) | (7) |
| Manganese | 10–20 | 200–3500 | >10,000 | | 10 | 6 |
| Nickel | 0.002–0.004 | 10–50 | >1000 | | 390 | 42 |
| Selenium | n. r. | 3–100 | >1000 | | 20 | 7 |
| Thallium | n. r. | 20 | >1000 | | 1 | 1 |
| Zinc | 15–20 | 100–300 | >10,000 | >3000 | 15 | 6 |

¹From (10, 40, 44, 72).

²This refers to metal concentrations detected in two or more specimens collected at their natural sites of growth. The adoption of this definition would require a reassessment of a number of species, including those designated metal hyperaccumulators based on single specimens.

³Parentheses indicate that contamination with soil particles or minerals is likely to have resulted in overreporting.

Abbreviation: n. r., no known requirement.

Mecanismos de detoxificación de las plantas ante los metales pesados

Las plantas requieren regular la respuesta a los MPs para reducir el daño oxidativo y asegurar la homeostasis celular (Hasan *et al.*, 2017). Por esta razón, estas poseen diferentes mecanismos que contrarrestan la presencia de MPs como: restringir su biodisponibilidad, controlar su ingreso, quelación, promoción de su salida, secuestro, así como detoxificación de las ROS (Lin & Aarts, 2012). Estos mecanismos han sido ampliamente estudiados (Reichman, 2002; Nagajyoti *et al.*, 2010; Lin & Aarts, 2012; Kumar *et al.*, 2015; Hasanuzzaman *et al.*, 2018; Kaur & Garg, 2018) y se describen en detalle a continuación (Fig. 3).

A) Reducción de la biodisponibilidad

Las plantas pueden prevenir la entrada de MPs mediante: (1) la secreción de exudados de la raíz que pueden quelatar o disminuir la disponibilidad de los MPs acidificando la rizosfera mediante compuestos de bajo (flavonoides, compuestos fenólicos, protones, prolina, histidina y hormonas como ácido salicílico, ácido

jasmónico y etileno) o alto peso molecular (polisacáridos, Heat shock proteins (HSP), metalochaperonas y otras proteínas) (Emamverdian *et al.*, 2015); (2) mediante alteraciones en la composición de la pared celular mediante deposiciones de lignina que mejoren la retención en las paredes celulares de los MPs tomados por las plantas (Lin & Aarts, 2012); y (3) la asociación con microorganismos que pueden alterar la disponibilidad de los MPs como HFMA (Ferrol *et al.*, 2016), bacterias (Bravo *et al.*, 2018) u otros hongos (Viashaly *et al.*, 2015).

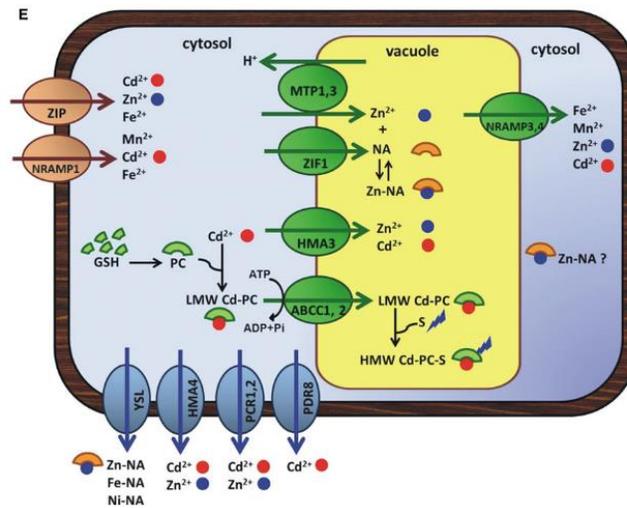


Figura 3. Mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis en las células de las plantas. Los transportadores ZIP y proteínas NRAMP1 (Café) son los responsables de la toma e ingreso de los MPs al citosol. Los transportadores del tonoplasto (verde) como MTP1,3, ZIF1, HMA3 y ABCC1,2 son los responsables del secuestro de los MPs quelados (NA) o MPs acomplejados por fitoquelatinas (Cd-PC) dentro de la vacuola, o de la movilización desde la vacuola (NRAMP3,4). Los transportadores de salida (Azul) como HMA4 expulsan los MPs en exceso del citosol y están involucrados en la translocación hacia los tejidos aéreos. ZIP: Zinc Iron Proteins, NRAMP: natural resistance-associated macrophage protein, ZIF1: zinc-induced facilitator 1, HMA: heavy metal ATPase, YSL: yellow stripe 1-like, PCR: plant cadmium resistance, PDR8: pleiotropic drug resistance 8, NA: nicotianamine, GSH: glutathione, PC: fitoquelatina, S: sulfide, LMW: low molecular weight, HMW high molecular weight (Y. F. Lin & Aarts, 2012).

B) Control de ingreso (influx)

Los metales pueden entrar al simplasto por difusión simple, transporte pasivo por canales proteicos o transporte activo por proteínas transportadoras. Mediante este último se ofrece el mayor control. Estos transportadores tienen frecuentemente diferentes afinidades por los MPs, los cuales pueden conferir cierto nivel de discriminación en la membrana celular entre los elementos deseados y los nocivos.

El Cd y el Zn atraviesan la membrana celular principalmente por la familia de transportadores ZIP (ZRT-IRT like protein; Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter Protein), aunque el Zn también puede entrar a las células de la raíz mediante otros transportadores de metales o por medios pasivos cuando este se encuentra en exceso en el suelo (Lin & Aarts, 2012). En plantas hiperacumuladoras se ha encontrado que existe mayor expresión de genes que codifican para proteínas de la familia ZIP y pueden estar involucrados en su alta capacidad de acumulación (Lin & Aarts, 2012). Excesos de Zn frecuentemente inducen la producción de transportadores de Fe como respuesta a la deficiencia de este elemento, sin embargo este transportador también tiene afinidad por Zn, por lo que la toma planta puede seguir tomando Zn en exceso (Lin & Aarts, 2012).

C) Metal quelación

Los MPs que logran atravesar la membrana celular requieren ser quelados por varios ligandos como oligopéptidos, ácidos orgánicos, aminoácidos o proteínas con el fin de reducir interacciones indeseadas con otros compuestos celulares importantes para la homeostasis celular (Lin & Aarts, 2012). Entre ellos se encuentra: (1) Nicotinamina (NA) un aminoácido no proteínogénico que tiene alta afinidad por un amplio espectro de metales, NA puede estar presente en el citosol formando complejos de MPs-NA que son transportados hacia afuera de las células mediante proteínas Yellow Stripe 1-Like (YSL) o NA puede ser transportado hacia la vacuola por la proteína zinc-induced facilitator 1 (ZIF1); (2) Glutathion (GSH) que es un tripéptido γ -Glu-Cys-Gly importante por su rol tripartita detoxificando como quelante, antioxidante celular y molécula señalizadora de ROS; (3) Fitoquelatinas (PCs) que son oligómeros de GSH que pueden ser de bajo peso molecular (LMW) o alto peso molecular (HMW) cuando se encuentran unidos por sulfuros, las PCs pueden formar complejos con MPs que luego son secuestrados en las vacuolas mediante transportadores ATP-binding cassette (ABC); (4) Metalotioneinas (MTs) que son proteínas pequeñas ricas en cisteína con motivos sulfurillo que interactúan con los iones metal bivalentes y así actuar como agentes quelantes o reductores de ROS. En general, las especies hiperacumuladoras se caracterizan por una mayor habilidad de quelación que las no hiperacumuladoras (Kramer, 2010).

D) Promoción de salida del metal (eflux)

Otro mecanismo para reducir la toxicidad es expulsando los metales de las células ya sea mediante retorno a la solución del suelo o manteniéndolos en el apoplasto. En plantas no hiperacumuladoras el flujo de transporte de MPs es directo a la solución del suelo, mientras que en especies hiperacumuladoras éste es hacia el xilema y la parte aérea (Lin & Aarts, 2012), este transporte es determinado en gran parte por la enzima Heavy Metal ATPasa 4 (HMA4) (Kramer, 2010). En *Arabidopsis* se han descrito varios transportadores de salida: (1) HMA4 un prominente transportador de Zn que se encuentra en la membrana plasmática y es responsable de su carga en el xilema, (2) PCR1 y PCR2 (Plant Cadmium Resistance 1 y 2) proteínas que exporta el Cd fuera de las células y (3) PDR8 (Pleiotropic Drug Resistance 8) que bombea el Cd fuera de la membrana de las células epidérmicas de la raíz (Lin & Aarts, 2012).

E) Secuestro y movilización del metal

Cuando la planta no puede controlar la concentración por medio de flujos de salida, esta requiere almacenar los MPs en “lugares seguros” como la vacuola que proveen un reservorio de almacenaje controlado (Lin & Aarts, 2012). Los MPs no pueden ser ingresados mediante los transportadores del tonoplasto pero si mediante agentes quelantes (e.g. ZIF1 y NA). Especies no tolerantes promueven el secuestro vacuolar en las raíces para prevenir el transporte a hojas fotosintéticas donde los MPs pueden ser potencialmente más nocivo que para las raíces, mientras que especies MPs-tolerantes tienen mayor capacidad de secuestro en los tejidos aéreos que en el de las raíces (Kramer, 2010). Varias proteínas también caracterizadas en *Arabidopsis* están involucradas en este mecanismo: (1) Metal Tolerance Protein 1 (MTP1) que pertenece a la familia de Cation Diffusion Facilitator Proteins (CDF) y probablemente el más importante transportador de Zn vacuolar, (2) HMA3 está ubicado en el tonoplasto de las células de la raíz y limita la traslocación raíz-parte aérea secuestrando el Cd en las vacuolas de las células de la raíz, (3) Natural Resistance-Associated Macrophage Protein (NRAMP), involucrada en la regulación de la homeostasis de MPs y requerido para el

transporte vacuolar de Fe y Mn, pero que también contribuye en la tolerancia de Cd (Lin & Aarts, 2012).

F) Detoxificación de ROS

Los MPs inducen la producción de ROS, moléculas altamente reactivas que interactúan con varios componentes celulares que inducen daño oxidativo de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, azúcares y lípidos que pueden resultar en la muerte celular en casos severos (Hermes-Lima, 2005). Para sobreponerse a una condición de estrés oxidativo, las plantas poseen sistemas antioxidantes que detoxifican las ROS en diferentes proporciones, esta habilidad de detoxificación puede ser conferida principalmente por la síntesis de prolina o la acción de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). En plantas acumuladoras la actividad de estas enzimas es mayor que plantas no acumuladoras (Emamverdian et al., 2015; Lin & Aarts, 2012).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares

Los HFMA (Filo: Glomeromycota) son simbioses obligados que asocian ~71% de las plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018) con ~317 especies de HFMA descritas a la fecha (Goto & Jobim, 2019). A pesar de su aparentemente limitada habilidad de dispersión, los HFMA han sido encontrados en los seis continentes del globo (Davison *et al.*, 2015). Esta asociación es ampliamente conocida por ser una de las estrategias más antiguas y extendidas para aumentar la absorción de nutrientes, la tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Hildebrandt *et al.*, 2007; Kumar & Verma, 2018). Esta interacción se caracteriza por la baja especificidad entre su huésped-hospedante que le permite al hongo colonizar un amplio rango de plantas hospedero; y se basa en un intercambio de recursos donde la planta hospedera suministra fuentes de carbono a cambio de agua y nutrientes por parte del hongo (Barea, *et al.*, 2002).

Los HFMA como estrategia de mitigación de los MPs en las plantas

La simbiosis con HFMA son fundamentales en el funcionamiento de las raíces de muchas especies de plantas (Brundrett & Tedersoo, 2018). En estas asociaciones el hongo coloniza la corteza de la raíz y emite una red de hifas en la rizosfera que extiende el área

de exploración de las raíces en su ambiente circundante (Wang *et al.*, 2017). Estas hifas externas no solo contribuyen a la toma de nutrientes con baja movilidad como P, Zn y Cu, sino también pueden mitigar la toxicidad por MPs en sus plantas hospedero (Ferrol *et al.*, 2016). MPs como Cu, Zn, Fe y Mn son elementos esenciales pero tóxicos cuando se encuentran presentes en exceso por lo que el transporte y control homeostático es de vital importancia (Römheld, 2011). Los HFMA juegan un papel importante en la modulación de la toma de MPs por las plantas incrementando y/o disminuyendo la concentración acumulada en la planta (Tabla 2), dependiendo de diferentes factores como la concentración y tipo de MPs (Audet & Charest, 2007), la especie de la planta (Meier *et al.*, 2012) y de los HFMA (He *et al.*, 2014).

Tabla 2. Efecto de la inoculación de diferentes especies de HFMA sobre la acumulación del Cd en plantas hospederas sometidas a estrés por este metal con respecto a plantas no inoculadas. Se resalta en color gris los estudios encontrados en cacao.

| Especie hospedera | Especie de HFMA | Concentración de Cd | Shoot | | Root | | Referencia |
|-------------------------------|--|---------------------|-------|-------|-------|-------|---|
| | | | [Cd]↑ | [Cd]↓ | [Cd]↑ | [Cd]↓ | |
| <i>Helianthus annuus</i> L. | <i>F. mosseae</i> | 0.75, 10, 40 ppm | | x | | x | (Hassan <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>G. mosseae</i> | 0.2 mM | | x | | x | (Liu <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>G. constrictum</i> | 0.2 mM | | x | x | | (Liu <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Lonicera japonica</i> | <i>G. versiforme</i> , <i>R. intraradices</i> | 10 y 20 ppm | | x | x | | (Jiang <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Solanum photeinocarpum</i> | <i>G. versiforme</i> | 5,10,20, 40 ppm | | x | x | | (Tan <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Brassica chinensis</i> L. | <i>G. versiforme</i> | 0.9 y 1.5 ppm | | x | x | | (Wu <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Zea mays</i> L. | <i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> | 10 y 20 ppm | | x | | | (Aghababaei <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Helianthus annuus</i> L. | <i>G. intraradices</i> | 20 ppm | | x | | | (Aghababaei <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Medicago sativa</i> L. | <i>G. intraradices</i> | 5, 20 ppm | | x | x | | (Wang <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | <i>G. intraradices</i> | 1 ppm | | x | | x | (Janoušková <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Tagetes erecta</i> L. | <i>G. intraradices</i> , <i>G. constrictum</i> , <i>G. mosseae</i> | 5, 50 ppm | | x | | x | (Liu <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Picea abies</i> | <i>Laccaria bicolor</i> , <i>Paxillus involutus</i> | 5 ppm | | x | | x | (Jentschke <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>Medicago truncatula</i> | <i>R. irregularis</i> | 2 ppm | | x | | x | (Aloui <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Oryza sativa</i> L. | <i>R. intraradices</i> & <i>F. mosseae</i> | 0.025, 0.1 mM | | x | | x | (Li <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Theobroma cacao</i> | Consorcio de HFMA nativas | 24 ppm | | x | | x | (Pérez <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Theobroma cacao</i> | Mix <i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. aggregatum</i> , <i>G. etunicatum</i> | 10 ppm | x | | x | | (Ramtahal <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Aster tripolium</i> L. | <i>G. geosporum</i> | 0.5mM | x | | x | | (Carvalho <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Lolium multiflorum</i> | <i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i> | 5, 10 ppm | x | | x | | (Yu <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Pisum sativum</i> L. | <i>G. intraradices</i> | 100 ppm | x | | x | | (Rivera-Becerril <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Canavalia ensiformis</i> | <i>G. etunicatum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. macrocarpum</i> | 5 uM | x | | x | | (López de Andrade <i>et al.</i> , 2005) |

| | | | | | |
|--------------------------------|--|------------------|---|---|--------------------------------|
| <i>Linum usitatissimum</i> | Mix <i>G. clarum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. etunicatum</i> | 5, 15 ppm | x | x | (Hancock <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Brassica chinensis</i> L. | <i>R. intraradices</i> , <i>F. mosseae</i> | 0.9, 1.5 ppm | x | x | (Wu <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>Solanum lycopersicum</i> L. | <i>R. irregularis</i> . | 25 uM | x | | (Kumar <i>et al.</i> , 2015) |
| <i>Helianthus annuus</i> L. | <i>R. irregularis</i> | 0.75, 10, 40 ppm | x | x | (Hassan <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>Lotus japonicus</i> L. | <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Acaulospora longula</i> , | 5 y 50 ppm | x | x | (Zhang <i>et al.</i> , 2015) |

La toma de MPs esenciales y no esenciales desde el suelo hacia los HFMA ocurre a través de proteínas localizadas en las membranas plasmáticas del HFMA y la planta (Fig. 4). En el hongo *Rhizophagus irregularis* mediante el análisis transcriptómico se han identificado genes codificantes para proteínas putativas que modulan el transporte de Cu, Zn, Fe y Mn, incluyendo miembros de la familia ZIP, NRAMP, transportadores de Cu (CTR) y permeasas de Fe (RiFTR1) (Tamayo *et al.*, 2014). Los MPs una vez alcanzan el micelio antirradical (arbúsculo) pueden ser liberados al apoplasto de la interfaz simbiótica por transportadores, bombas o canales como Cu-ATPasa (CCC2) o miembros de la familia de facilitadores de difusión de cationes (CDF). Los MPs no esenciales son tóxicos por lo que es probable que no existan transportadores específicos de HFMA y que su toma y transporte sea logrado a través del sistema de transporte de los elementos esenciales Cu, Zn, Fe y Mn, o incluso a través de los transportadores de fosfatos (Ferrol *et al.*, 2016).

Mecanismos de los MPs en la homeostasis de los HFMA

El balance iónico de los metales al interior de la célula requiere un control adecuado para evitar deficiencias o potenciales excesos para las plantas y los HFMA (Ferrol *et al.*, 2016), por esta razón existen diferentes mecanismos para inactivar o remover los efectos tóxicos de los MPs. Estos mecanismos han sido ampliamente estudiados (Meier *et al.*, 2012; Cabral *et al.*, 2015; Ferrol *et al.*, 2016; Kaur & Garg, 2018) y se pueden categorizar en estrategias para: restringir la entrada de MPs, quelación intracelular, compartimentización de MPs, flujos de salida de MPs, regulación de la actividad antioxidante y de la respuesta de las plantas. Estos mecanismos serán ampliados a continuación.

A) Restricción de entrada de MPs:

Las estrategias comúnmente usadas por los microorganismos del suelo para prevenir la entrada de los MPs al citoplasma corresponden a: (1) la liberación de agentes complejantes y precipitantes de MPs al suelo como la glomalina (Glomalin-

Related Protein) (Ferrol *et al.*, 2016); (2) la exudación de HCO_3^- (OH^-) o iones H^+ que aumentan el pH de la rizósfera y reducen la disponibilidad de los MPs (Wu *et al.*, 2016) y (3) la unión de MPs a constituyentes de la pared celular como aminoácidos, grupos carboxilo, quitina, melanina o glomalina (Khan, 2006), responsables del ~50% del metal retenido por los HFMA y cuya constitución puede variar entre especies de HFMA (Ferrol *et al.*, 2016).

B) Quelación intracelular:

La quelación de MPs en el citosol por ligandos de alta afinidad son potencialmente un mecanismo importante de detoxificación y tolerancia para los HFMA. Potenciales ligandos incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos y péptidos como PCs, MTs y GSH (Ferrol *et al.*, 2016).

C) Compartimentización de MPs

El secuestro de MPs en la vacuola es también un mecanismo de tolerancia de los HFMA. Moléculas de polifosfatos (PolyP) pueden actuar como ion estabilizador de los MPs y luego ser transportados mediante transportadores ABC o de Zn a través del tonoplasto para su almacenaje en la vacuola (Ferrol *et al.*, 2016). Otro mecanismo de compartimentación es el almacenaje de MPs en las esporas, como ha sido reportado en aislados de *R. irregularis* de suelos contaminados con Cu (Cornejo *et al.*, 2013).

D) Defensa antioxidante

Los MPS pueden causar daño por la inducción de estrés oxidativo por los que estos hongos activan la expresión de genes que codifican para algunos componentes de su red antioxidante como: *GintSOD1* que codifica para SOD; *GintGRX1* que codifica para una proteína multifuncional que induce la actividad de oxidorreductasas, peroxidasas (POX) y glutatión S-transferasas; y *GintPDX1* que codifica para una enzima involucrada en la biosíntesis de la vitamina B6. Adicionalmente, los HFMA poseen pequeñas moléculas como GSH y vitaminas B6, C y E las cuales actúan como antioxidantes (Ferrol *et al.*, 2016).

E) Regulacion de la respuesta de las plantas

Los HFMA pueden reducir la toxicidad de MPs en las plantas, por lo que la regulación de varias vías de respuestas involucradas en la respuesta detoxificación es probable. Algunos estudios han mostrado que las respuestas de las plantas a los MPs es modulada por la simbiosis mediante: (1) incrementos en la activación de enzimas antioxidantes, (2) inducción de la expresión de genes que codifican para PCs y MTs (Ferrol *et al.*, 2016); o (3) “Dilución” de MPs en tejidos de las plantas debido incrementos en el crecimiento por incrementos en la toma de agua y otros nutrientes (Cabral *et al.*, 2015).

Los mecanismos descritos anteriormente muestran el potencial de los HFMA para incrementar la toma de micronutrientes de baja movilidad y/o reducir la toxicidad de MPs en suelos contaminados. No obstante, se requiere un mejor entendimiento de los factores involucrados en la respuesta de las plantas a los HFMA para su implementación como herramienta biotecnológica, tanto para la biofortificación de nutrientes en zonas deficientes como para la mitigación de MPs en zonas contaminadas.

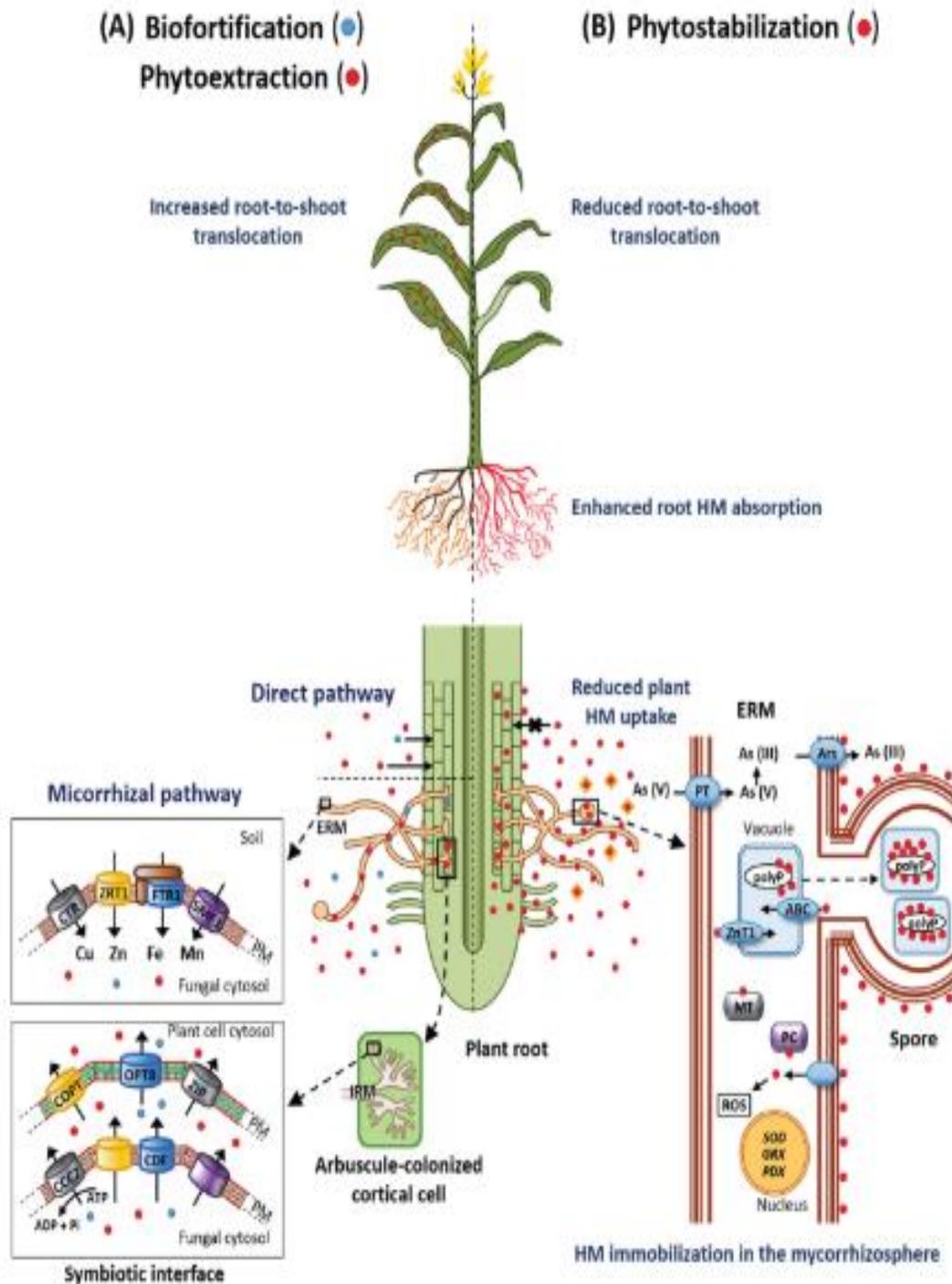


Figure 4. Mecanismo involucrados en la tolerancia a MPs por HFMA y su contribución para la biofortificación (a) y fitorremediación (b) (Ferrol *et al.*, 2016).

1. Capítulo I: Alta presencia de cadmio y zinc resulta en baja diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a cacao (*Theobroma cacao* L.)

1.1 Resumen

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) son simbioses obligados presentes en la rizósfera de plantas de cacao y la diversidad de sus comunidades se modifica dependiendo de diversos factores abióticos como la presencia de cadmio (Cd) y zinc (Zn) en el suelo. Esta investigación caracterizó la estructura de la comunidad de HFMA locales presentes en la rizósfera de plantas de cacao en dos suelos de Yacopí, Colombia, con bajo (B-Cd-Zn: 0,1-1,8 mg kg⁻¹) y alto (A-Cd-Zn: 20,9-151,3 mg kg⁻¹) Cd y Zn. Las esporas de HFMA se identificaron mediante claves taxonómicas y su abundancia, riqueza y diversidad se determinó en muestras de suelo originales y después de su multiplicación mediante cultivos trampa. Las comunidades de HFMA se compararon mediante el uso de análisis de componentes principales (ACP) e índices de diversidad alfa y beta. Los resultados indicaron que la abundancia, riqueza y diversidad de morfoespecies HFMA son significativamente menores en A-Cd-Zn, con respecto a B-Cd-Zn. La composición de la comunidad de HFMA en ambos suelos fue similar a nivel de géneros (5 de 7), pero diferente a nivel de morfoespecies (4 de 23). El análisis de diversidad beta y el ACP determinaron baja similaridad y tasa de recambio entre las comunidades de HFMA. La dominancia de *Diversispora spurca*, *Rhizogloium* sp. y *Claroideogloium etunicatum* en A-Cd-Zn sugiere que estas morfoespecies son estrés-tolerantes y candidatos potenciales para el desarrollo de estrategias de mitigación en suelos con Cd y Zn.

Palabras Clave: dominancia, estrategia estrés-tolerante, estructura de la comunidad, metales pesados, morfoespecies.

1.2 Introducción

Los metales pesados (MPs) pueden estar presentes en diversos suelos alrededor del mundo (Mahar *et al.*, 2016) y son considerados como uno de los mayores estreses abióticos que pueden afectar y modificar las poblaciones microbianas del suelo, incluidos los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) (Krishnamoorthy *et al.*, 2015). Dentro de los MPs se encuentra el cadmio (Cd) y el zinc (Zn) que están presentes naturalmente en el suelo como resultado de la meteorización de su material parental (Gramlich *et al.*, 2018) o producto de actividades antropogénicas como la aplicación de fertilizantes, riego con aguas contaminadas o vertimiento de residuos industriales (Lora y Bonilla, 2010; Schneider *et al.*, 2016).

El cacao es una planta que tiene alta capacidad para extraer, transportar y acumular Cd en sus frutos (Gramlich *et al.*, 2018), por lo cual la probabilidad de encontrar trazas de este metal en el grano aumenta con el establecimiento de cultivos en suelos con disponibilidad de Cd. La presencia de Cd en suelos cacaoteros se ha reportado en diferentes países productores de América como: Venezuela (Lanza *et al.*, 2016), Perú (Arévalo-gardini *et al.*, 2017), Ecuador (Chavez *et al.*, 2015), Colombia (Bravo *et al.*, 2018), Bolivia (Gramlich *et al.*, 2016) y Honduras (Gramlich *et al.*, 2018). Por esta razón, la búsqueda de alternativas que mitiguen la toma de Cd por parte de la planta son necesarias para evitar efectos nocivos en la salud de los consumidores (FAO y OMS, 2014) y futuras restricciones de mercado (Jiménez, 2015).

Los HFMA son biótros obligados que se asocian aproximadamente al 71% de las plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018) y su asociación es ampliamente conocida por ser una de las estrategias más antiguas y extendidas para aumentar la tolerancia a estreses bióticos y abióticos de las plantas (Hildebrandt *et al.*, 2007). No obstante, la contribución de los HFMA a su planta hospedero depende de la diversidad, abundancia y eficiencia de sus comunidades (Schneider *et al.*, 2016), las cuales varían en función de diversos factores

como la altitud (Oehl *et al.*, 2017), régimen de humedad, fertilidad del suelo (Hazard *et al.*, 2012), contenido y tipo de MPs (Xu *et al.*, 2017), composición de la microbiota del suelo (Svenningsen *et al.*, 2018), manejo agronómico (Souza *et al.*, 2017), entre otros factores.

La determinación de la composición de las comunidades HFMA locales, presentes en suelos enriquecidos con MPs, es la base para desarrollar estrategias de mitigación que amortigüen el impacto de estos suelos en un agroecosistema (Schneider *et al.*, 2016); ya que estas comunidades pueden haber desarrollado tolerancia al metal y jugar un papel importante en la fitorremediación en sitios contaminados (Khan *et al.*, 2000), reduciendo la acumulación de MPs y la fitotoxicidad en sus plantas hospedero (Hildebrandt *et al.*, 2007; Millar y Bennett, 2016). Esta respuesta benéfica para las plantas hospedero no está asociada exclusivamente a una única especie de HFMA sino a la función que cumple la comunidad (Rodríguez y Sanders, 2015); ya que se han detectado diferencias en la retención y secuestro de MPs entre especies de HFMA (Pagano *et al.*, 2010). No obstante, otro tipo de respuestas, como incrementos en la toma de MPs, pueden suceder ya que esta es dependiente de otros factores como la especie de planta hospedero y el tipo y concentración de MPs en el suelo (Audet y Charest, 2007).

La dinámica de las comunidades de HFMA en presencia de un estrés ambiental ha sido descrita mediante el uso de los modelos de exclusión y adaptación propuestos por Millar & Bennett (2016), en donde se proponen modificaciones en la estructura de la comunidad de HFMA dependiendo de la intensidad y duración del tipo de estrés. En general, los estudios de diversidad de HFMA realizados en suelos contaminados con MPs se enfocan en el análisis de áreas expuestas a algún tipo de contaminación antropogénica como el vertimiento de residuos industriales (Krishnamoorthy *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2016), alcantarillado (Del Val *et al.*, 1999) y minería (Vogel-Mikuš *et al.*, 2005). Estos estudios únicamente corroboran la hipótesis de exclusión de Millar & Bennet donde la diversidad de HFMA se reduce y se modifica a corto plazo tras la aplicación del estrés en el suelo. En la actualidad no se han reportado estudios de diversidad de HFMA en suelos enriquecidos naturalmente con MPs en donde la intensidad del estrés ha sido constante y continuo, ideales para corroborar la hipótesis de adaptación y encontrar comunidades de HFMA locales que tengan un efecto benéfico para sus plantas hospedero (Millar y Bennett, 2016).

En este estudio se caracterizó la estructura de la comunidad de HFMA presentes en la rizósfera de plantas de cacao en dos suelos con niveles contrastantes y naturales de Cd y Zn mediante (i) la determinación de propiedades físico-químicas de los suelos, (ii) la identificación de morfoespecies presentes, (iii) la cuantificación de abundancias relativas de morfoespecies y (iv) la comparación de las comunidades mediante la determinación de índices de diversidad alfa y beta así como por un análisis de componentes principales (ACP). Los resultados permitieron discutir la hipótesis de adaptación de comunidades de HFMA a un estrés constante y continuo de estos MPs e identificar HFMA con potencial uso en el desarrollo de programas de mitigación de la toma de Cd por las plantas.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Localización y muestreo de suelo

El muestreo se realizó en dos fincas cacaoteras caracterizadas previamente por su bajo y alto contenido de Cd y Zn de la región de Yacopí, Colombia (Rodríguez Albarracín *et al.*, 2019). La distancia entre fincas es de 5 km y ambas pertenecen a la región natural de bosque húmedo tropical. En cada finca y en temporada seca, se seleccionaron cuatro árboles a una distancia de 10 m entre sí y se tomaron 4 muestras de suelo rizosférico por cada árbol para obtener una muestra compuesta de 5 kg de suelo por árbol. En total, se obtuvo cuatro muestras del suelo de cada finca caracterizada por sus bajas (B-Cd-Zn) y altas concentraciones de Cd y Zn (A-Cd-Zn) para determinar el contenido de Cd disponible (Cd-d), Zn disponible (Zn-d) y Cd total (Cd-t), caracterizar las poblaciones de HFMA presentes y obtener el inóculo base para su multiplicación de esporas mediante cultivos trampa. Por otro lado, se utilizaron dos muestras compuestas por cada tipo de suelo para analizar sus propiedades físicoquímicas.

1.3.2 Análisis físico-químicos y taxonomía del suelo

Las propiedades físicoquímicas de suelo y las metodologías empleadas corresponden a la textura por el método de Bouyoucos previa dispersión con Hexametáfosfato de Sodio; pH en suspensión suelo agua 1:1 (p/v); CICE por suma de cationes intercambiables; CO por el método de analizador elemental; P disponible por el método de Bray II; K, Ca, Mg y Na

intercambiables extraídos con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M pH 7; Acidez Intercambiable (AI) extraída con KCl 1 M; Cd-d, Cu, Fe, Mn y Zn-d, disponibles extraídos con DTPA 1:2 (p/v). La determinación de Cd-t se realizó por extracción ácida con HCl:HNO₃ 1:8 (p/v). La cuantificación de metales fue determinada usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK). Los análisis físico-químicos fueron realizados en el Laboratorio de Aguas y de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (UNAL). La taxonomía de los dos suelos se determinó mediante la descripción de perfiles utilizando la clave para la taxonomía de suelos (USDA, 2014) y el estudio general de suelos reportado para la zona de estudio (IGAC, 2000).

1.3.3 Multiplicación de esporas de HFMA

Para la multiplicación de HFMA se utilizó la metodología de “cultivo trampa” de Morton *et al.*, (1995) usando como hospedero plantas de cebolla (*Allium fistulosum* var. Tokio Long White, Fercon®) en materas de plástico de 1 L durante seis meses en los invernaderos del departamento de Biología de la UNAL. Este procedimiento se realizó para obtener esporas en buen estado para facilitar su identificación taxonómica y para para identificar morfoespecies que en el momento del muestreo se encontraran en baja frecuencia o como fragmentos de hifas o vesículas presentes en la raíz (Antoniolli *et al.*, 2002).

1.3.4 Extracción de esporas

Se realizaron extracciones de esporas de HFMA a partir de las cuatro muestras de suelo por cada una de las dos localidades seleccionadas por su contenido contrastante de Cd-Zn con tres repeticiones técnicas cada una. La extracción de esporas se realizó según Brundrett *et al.*, (1984) en las muestras de suelo A-Cd-Zn y B-Cd-Zn traídas de campo (Original) y a los seis meses posteriores a la multiplicación en los “cultivos trampa” (Multiplicada).

1.3.5 Identificación morfológica de esporas de HFMA

Las esporas se identificaron a nivel de morfoespecies y géneros en ambos suelos, diferenciando los morfoespecies por criterios morfológicos de tamaño, forma, color, número de paredes, tipo de conexión hifal y reacción histoquímica al reactivo Melzer. Para

la identificación de géneros de HFMA las esporas se montaron en portaobjetos con alcohol polivinílico-ácido láctico glicerol (PVLG) o PVLG mezclado con reactivo de Melzer en proporción 1:1 (v/v). Se siguieron las metodologías propuestas por Schenk y Perez (1990) y Oehl *et al.*, (2011) y las descripciones del International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, <http://invam.caf.wvu.edu>).

1.3.6 Determinación de estructura de la comunidad de HFMA

La estructura de la comunidad de HFMA se determinó mediante el cálculo de la riqueza y abundancia relativa de morfoespecies y géneros, además del uso de índices de diversidad alfa y beta. La riqueza se calculó como la cantidad de morfoespecies diferentes por género encontrados en cada muestra de suelo. La abundancia se calculó como la cantidad de esporas de HFMA encontrada por gramo de suelo seco. La abundancia relativa se determinó mediante conteos individuales de morfoespecies sobre el número de esporas totales en la muestra de suelo mediante la fórmula: $f_i = n_i * 100 / N$, donde n_i es la sumatoria del número de morfoespecies y N la sumatoria del número individuos encontrados. Para el análisis de la diversidad alfa se determinaron los índices de Shannon-Weiner, dominancia de Simpson, uniformidad de Pielou y riqueza de Margalef; y para la diversidad beta se determinó el coeficiente de similitud de Jaccard, el coeficiente de disimilitud de Bray-Curtis y el índice de Whittaker para comparar las comunidades de HFMA originales provenientes de B-Cd-Zn y A-Cd-Zn. Los índices de diversidad alfa y beta se calcularon según Villarreal *et al.*, (2004).

1.3.7 Análisis estadístico

Los resultados del contenido de Cd-t, Zn-d, Cd-d, abundancia e índices de diversidad se analizaron mediante ANOVA y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha < 0,05$) siguiendo un diseño factorial simple en arreglo completamente al azar, posterior a la revisión de supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen, $p > 0,05$). Adicionalmente, con la abundancia de cada morfoespecie de HFMA encontrada en muestras originales de ambos suelos se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un clúster jerárquico usando la distancia de Bray-Curtis para comparar la estructura de la comunidad entre sitios mediante la librerías *FactomineR*

(Kassambara, 2017) y *pvclust* (Suzuki y Shimodaira, 2006). El método “average” se implementó en la creación de clústeres y se evaluó su robustez con una estrategia de bucle de remuestreo. Los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico R 3.4.0.

1.4 Resultados

1.4.1 Composición físico-química y taxonomía del suelo

Los análisis físico-químicos de suelo confirmaron que existen diferencias significativas en los contenidos de Zn-d, Cd-t y Cd-d entre las muestras de los suelos evaluados (Tabla 3). A-Cd-Zn presentó 83, 18 y 209 veces más Zn-d, Cd-t y Cd-d respectivamente, a lo encontrado en B-Cd-Zn. Con respecto a los demás elementos se encontró que A-Cd-Zn presentó mayores contenidos de Ca (2054%), Cu (783%), Mn (689%) que B-Cd-Zn. Adicionalmente, B-Cd-Zn presentó un pH extremadamente ácido (4,2) y a A-Cd-Zn uno moderadamente ácido (5,9) y únicamente en B-Cd-Zn se detectó acidez intercambiable de 5,38 meq / 100 g. Ambos suelos presentaron una textura franco-arcillosa y de acuerdo a la caracterización de perfiles de suelo B-Cd-Zn se clasificó como Typic dystrudepts (Inceptisol) y A-Cd-Zn como Typic udorthents (Entisol) (USDA, 2014) (Tabla S1).

Tabla 3. Análisis físico-químico de las muestras de suelo con baja (B-Cd-Zn) y alta (A-Cd-Zn) concentración de Cd y Zn.

| Suelo | CO NT | | K | Ca | Mg | Na | Al | CICE | P | S | Cu | Fe | Mn | Zn-d | B | Cd-t | Cd-d | pH 1:1 | Textura | Taxonomía |
|-----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|------|-----|-----|-------|------|-------|-------|-----------|---------|----------------------|
| | % | % | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B-Cd-Zn | 7,29 | 0,63 | 0,29 | 1,1 | 0,3 | 0,04 | 5,38 | 7,11 | 21 | 22 | 0,48 | 310 | 1,9 | 1,83 | 0,44 | 1,5b | 0,10b | 4,2 | FAr | Typic dystrudepts |
| A-Cd-Zn | 5,75 | 0,5 | 0,18 | 23,7 | 1,02 | 0,07 | 0 | 25 | 30 | 13,5 | 4,24 | 175 | 15 | 151,3 | 0,41 | 27,3a | 20,9a | 5,9 | FAr | Typic udorthents |
| <i>p</i> -valor | | | | | | | | | | | | | | *** | | *** | *** | | | |

CO: Carbono orgánico; NT: Nitrógeno total; CICE: Capacidad de intercambio catiónico efectiva; Al: Acidez intercambiable; Zn-d: Zinc disponible; Cd-t: Cadmio total; Cd-d: Cadmio disponible; FAr: Franco-arcillosa. Asteriscos indican *p*-valor (***, <0.001) del análisis de variancia correspondientes a las diferencias entre tipos de suelo. Valores con la misma letra en sentido vertical no son estadísticamente diferentes según pruebas de Tukey ($\alpha < 0,05$; $n=4$, CV: 20,6%).

1.4.2 Estructura de la comunidad de HFMA

Con base en el análisis taxonómico de las esporas presentes en B-Cd-Zn y A-Cd-Zn, en muestras originales y multiplicadas en plantas trampa, se identificaron en total 23

morfoespecies diferentes (Fig. 5) pertenecientes a un total de 7 géneros (Fig. 6a), de los cuales *Glomus*, *Claroideoglomus*, *Rhizoglomus*, *Acaulospora* y *Funneliformis* (5) estuvieron presentes en ambos suelos. Los géneros *Ambispora* y *Diversispora* solamente se detectaron en B-Cd-Zn y A-Cd-Zn, respectivamente. Comparando la riqueza de morfoespecies presente en las muestras originales, se encontró una mayor riqueza de morfoespecies en B-Cd-Zn (15), destacándose *Glomus* y *Acaulospora*, con respecto A-Cd-Zn (12) donde se encontró un mayor número de morfoespecies de *Claroideoglomus* (Fig. 6a). Por otro lado, la riqueza de B-Cd-Zn y A-Cd-Zn después del proceso de multiplicación de las esporas se vio disminuida en un morfoespecie con respecto a las muestras originales.

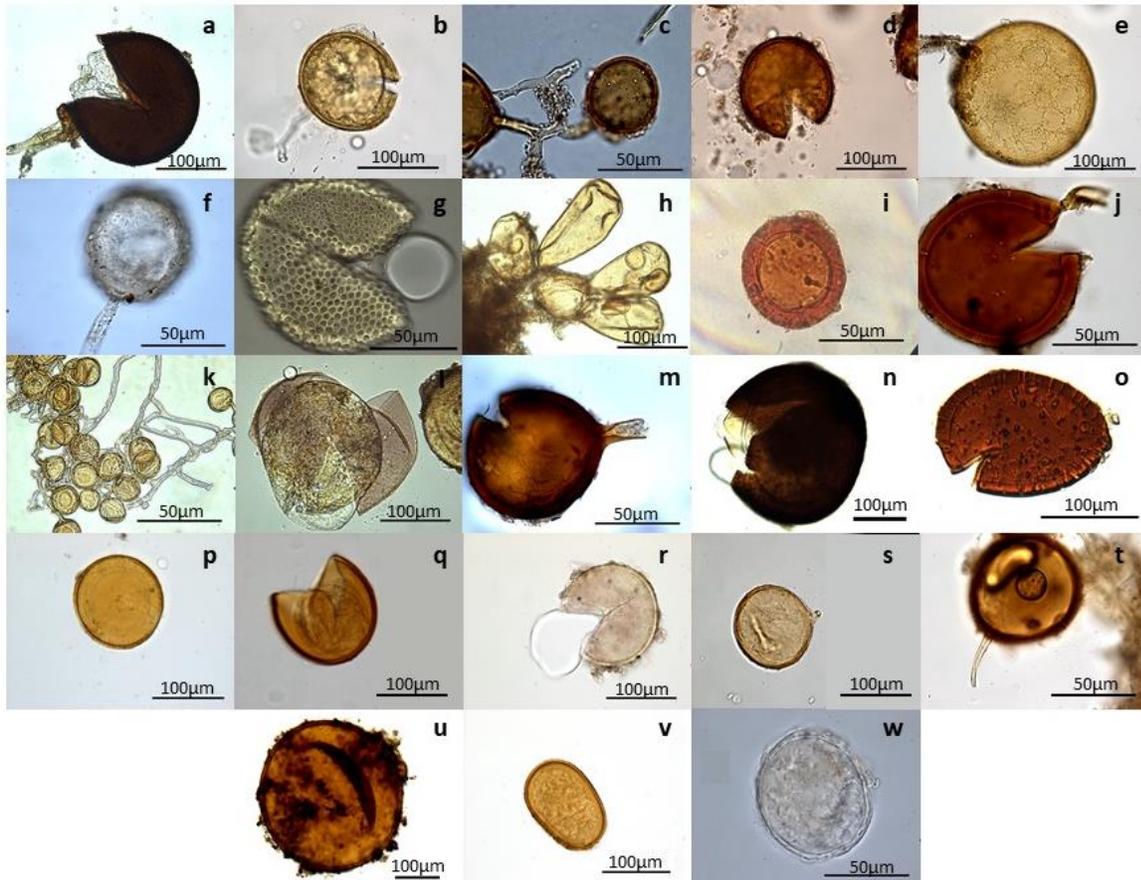


Figura 5. Morfoespecies de HFMA encontrados en muestras de suelo con alta (a-l) y baja (i-w) concentración de Cd y Zn. *Glomus atrouva* (a), *Claroideoglomus* sp.1 (b), *Rhizoglomus* sp. (c), *Claroideoglomus etunicatum* (d), *Funneliformis mosseae* (e), *Diversispora spurca* (f), *Acaulospora* sp.1 (g), *Glomus Sinuosum* (h), *Glomus microcarpum* (i), *Rhizoglomus fasciculatum* (j), *Rhizoglomus microaggregatum* (k), *Acaulospora* sp.2 (l), *Glomus aureum* (m), *Acaulospora foveata* (n), *Glomus* sp.1 (o), *Glomus* sp.3 (p), *Acaulospora colombiana* (q),

Claroideoglopus drumondii (r), *Glomus* sp.2 (s), *Claroideoglopus* sp.2 (t), *Funneliformis verriculosos* (v), *Acaulospora mellea* (v), *Ambispora* sp. (w).

La abundancia de esporas de HFMA en las muestras originales fue significativamente menor en A-Cd-Zn (21%) con respecto a B-Cd-Zn (Fig. 6b), posterior al proceso de multiplicación la abundancia se incrementó significativamente en B-Cd-Zn (62%) y A-Cd-Zn (208%) con respecto a su abundancia en muestras originales. Finalmente, la diversidad medida mediante el índice de Shannon fue significativamente menor en A-Cd-Zn con respecto a B-Cd-Zn (11%) y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras tanto originales como multiplicadas (Fig. 6c).

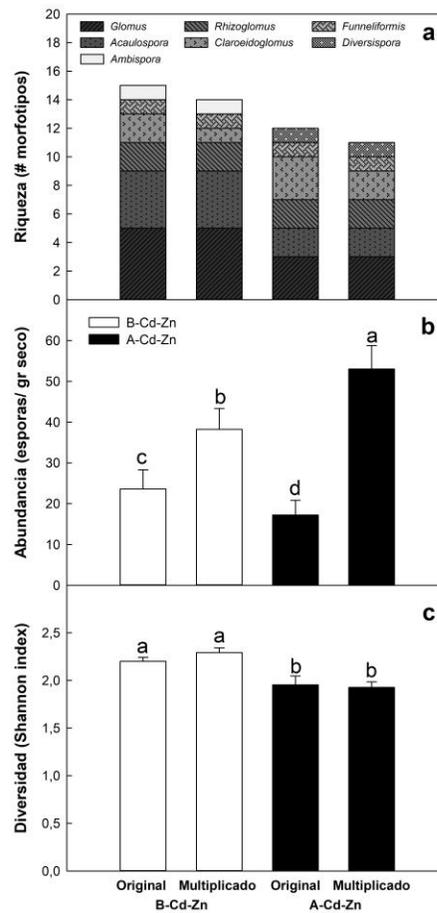


Figura 6. Riqueza (a), abundancia (b) y diversidad (c) de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) encontrados en suelos con baja (B-Cd-Zn) y alto (A-Cd-Zn) concentración de Cd y Zn, en muestras del suelo original (Original) y después de multiplicar sus esporas mediante plantas trampa durante seis meses (Multiplicado). Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según pruebas de Tukey ($\alpha < 0,05$; $n=12$). Las diferentes texturas en la figura (a) corresponden al género de los morfoespecies encontrados.

La abundancia relativa de morfoespecies de HFMA en muestras originales de ambos suelos presentó diferencias (Fig. 7a). En B-Cd-Zn predominó *R. fasciculatum* (17%),

Claroideoglo mus sp.2 (15%), *Acaulospora mellea* (13%), *Glomus* sp.1 (13%), mientras que en A-Cd-Zn predominó *Diversispora spurca* (22%), *Rhizoglo mus* sp. (20%), *Claroideoglo mus etunicatum* (16%), *Acaulospora* sp.1 (10%) y *Rhizoglo mus microaggregatum* (9%). Únicamente 4 morfoespecies de los 23 descritos se presentaron en ambas muestras (Fig. 7a), correspondientes a *Glomus microcarpum* (Fig. 5i), *Rhizoglo mus fasciculatum* (Fig. 5j), *Rhizoglo mus microaggregatum* (Fig. 5k) y *Acaulospora* sp.1 (Fig. 5l).

Posterior al proceso de multiplicación con plantas trampa, se observó que los morfoespecies *Acaulospora* sp.1, *Ambispora* sp., *Claroideoglo mus drumondi*, *Funneliformis verriculosos* y *Glomus microcarpum* en B-Cd-Zn fueron 4, 4, 3, 3 y 2 veces, respectivamente, más frecuentes que en sus muestras originales (Fig. 7). En A-Cd-Zn *Claroideoglo mus etunicatum*, *Rhizoglo mus fasciculatum* y *Funneliformis mosseae* fueron 2,5, 2,4 y 2 veces, respectivamente, más frecuentes que en sus muestras originales. No se detectó *Rhizoglo mus microaggregatum* (Fig. 5k) en ninguna de las muestras de suelo estudiadas (Fig. 7b).

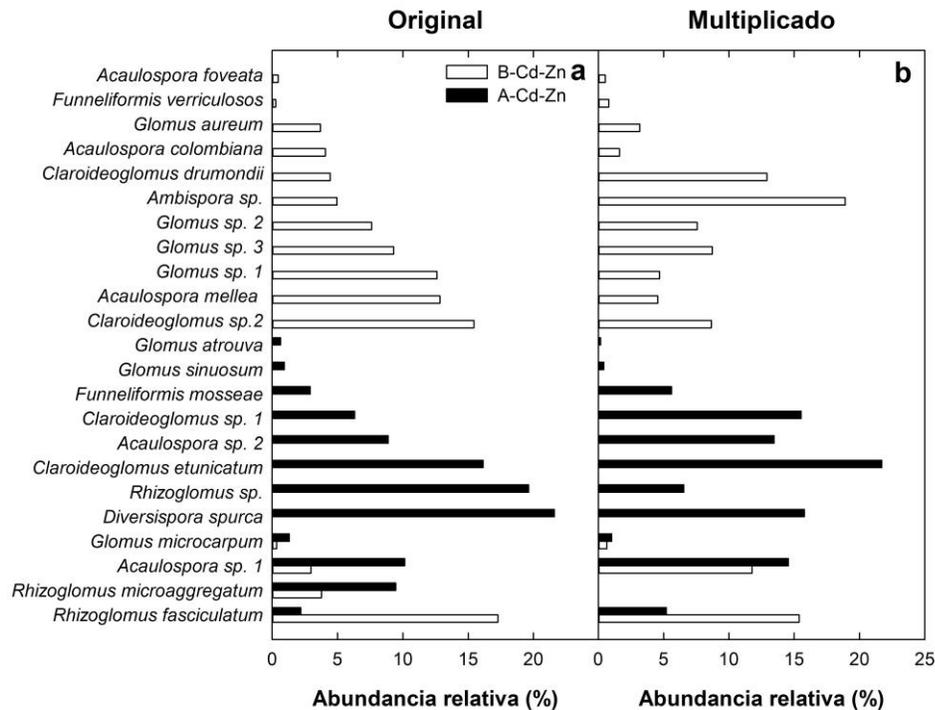


Figura 7. Abundancias relativas de morfoespecies de HFMA encontrados en suelos con baja (B-Cd-Zn) y alta (A-Cd-Zn) concentración de Cd y Zn, en muestras de suelo originales (a) y posterior a su multiplicación en plantas trampa de cebolla durante seis meses (b).

1.4.3 Índices de diversidad y ACP

Los índices de diversidad alfa mostraron diferencias significativas en la estructura de la comunidad de HFMA en las muestras de B-Cd-Zn y A-Cd-Zn (Tabla 4). El índice de Simpson presentó un mayor valor en A-Cd-Zn con respecto a B-Cd-Zn, mientras que los índices de uniformidad y de Margalef alcanzaron valores mayores en B-Cd-Zn con respecto a A-Cd-Zn. En cuanto a los índices de diversidad beta, se identificó una baja similaridad (Jaccard < 0,5 y Bray-Curtis > 0,5) y tasa de recambio (Whittaker: 1,64) entre las comunidades de HFMA presentes en ambos suelos. Por otra parte, el ACP reveló que dos componentes explican el 64,7% de la variabilidad total de los morfoespecies de HFMA encontrados en este estudio (Fig. 8a); esta variabilidad se distribuyó en el componente 1 (56,8%) y componente 2 (7,9%). En el componente 1 se representó 65,2% de todos los morfoespecies de HFMA ($R^2 > 0,6$), mientras que en el componente 2 correspondió a 4,3% ($R^2 > 0,5$) (Tabla S2). El ACP y el clúster jerárquico mediante la distancia de disimilaridad de Bray-Curtis ($p < 0,05$) evidenció que los morfoespecies se agrupan de acuerdo con el origen del suelo con diferentes contenidos de Cd (B-Cd-Zn y A-Cd-Zn) (Fig. 8b).

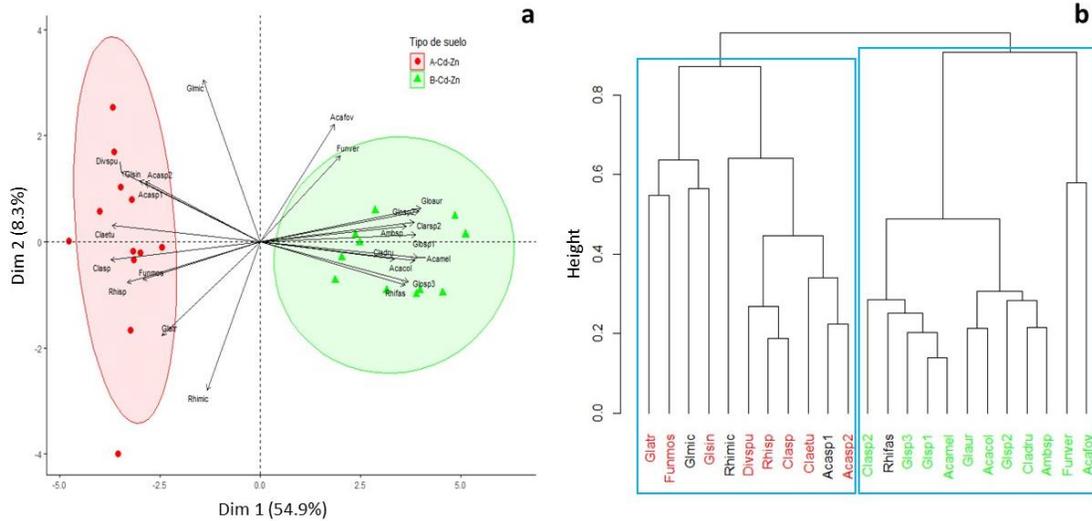


Figure 8. Análisis de componentes principales (a) y clúster jerárquico basada en la disimilaridad de Bray-Curtis (b) de los morfoespecies de HFMA encontradas en muestreos de dos suelos con baja (B-Cd-Zn, verde) y alta (A-Cd-Zn, rojo) concentración de Cd y Zn, o ambos (negro) (n=12). Recuadros azules indican probabilidad (>95%) de la existencia de un clúster usando valor aproximado sin sesgo. Nombres de los morfoespecies se encuentran abreviados de la siguiente manera: *Glomus microcarpum* (Glmic), *Rhizogloium fasciculatum* (Rhifas), *Glomus atrouva* (Glatr), *Claroideogloium* sp. 1 (Clasp1), *Rhizogloium* sp. (Rhisp), *Claroideogloium etunicatum* (Claetu), *Funneliformis mosseae* (Funmos), *Diversispora spurca* (Divspu), *Acaulospora* sp. 1 (Acasp1), *Acaulospora* sp.2 (Acasp2), *Glomus microaggregatum* (Glmic), *Glomus Sinuosum* (Glsin), *Glomus aureum* (Glaur), *Rhizogloium fasciculatum* (Rhifas), *Acaulospora foveata* (Acafov), *Glomus* sp.1 (Gls1), *Acaulospora colombiana* (Acacol), *Glomus microcarpum* (Glmic), *Glomus* sp.2 (Gls2), *Claroideogloium* sp.2 (Clasp2), *Glomus* sp.3 (Gls3), *Funneliformis verriculosos* (Funver), *Acaulospora mellea* (Acamel), *Ambispora* sp. (Ambsp), *Claroideogloium drumondii* (Cladru).

Tabla 4. Índices de diversidad alfa y beta de HFMA encontrados en muestras originales de suelos con baja (B-Cd-Zn) y alta (A-Cd-Zn) concentración de Cd y Zn.

| Índice | Tipo de suelo | | p-valor |
|-----------------------------|---------------|---------|---------|
| | B-Cd-Zn | A-Cd-Zn | |
| Diversidad Alfa | | | |
| Simpson | 0,129b | 0,170a | *** |
| Uniformidad | 0,852a | 0,800b | *** |
| Margalef | 1,960a | 1,681b | *** |
| Diversidad Beta | | | |
| Whittaker | | 1,64 | |
| Coefficiente de Jaccard | | 0,17 | |
| Coefficiente de Bray-Curtis | | 0,66 | |

p-valores generados por el análisis de varianza (***: $p < 0,001$, $n=4$).

1.5 Discusión

La alta concentración de Cd y Zn presente en las muestras A-Cd-Zn (Tabla 3) puede estar relacionada con el material parental sedimentario presente en esta zona de Yacopí, en donde se ha reportado *cherts*, calizas, areniscas y *shales* negros (IGAC, 2000). En este último tipo de roca encontrada en otros suelos, se han reportado concentraciones hasta 200 mg kg⁻¹ de Cd (He *et al.*, 2005) y 1500 mg kg⁻¹ de Zn (Edelstein & Ben-Hur, 2018), por lo que suelos desarrollados a partir de estas rocas pueden reflejar este tipo de composición química. Por otra parte, la alta concentración de Cd y Zn disponible en A-Cd-Zn (20,9-151,3 mg kg⁻¹) puede estar relacionada con la moderada acidez del suelo (5,9) y la presencia de carbonatos en la zona (Rodríguez Albarrcín *et al.*, 2019); ya que por ejemplo el Cd puede encontrarse disponible en las fracciones acida soluble (Chavez *et al.*, 2016) y la dependientes de carbonatos (Rodríguez Albarrcín *et al.*, 2019). Otros elementos como Cu y Mn se encontraron en mayor concentración en A-Cd-Zn, no obstante estos se encontraron dentro del rango normal en suelos (Kabata-Pendias y Barbara, 2015).

La alta concentración y disponibilidad de Cd y Zn probablemente asociada al material parental sedimentario de la región, impone una condición de estrés continua y constante que modifica la estructura de la comunidad de HFMA (Millar y Bennett, 2016). En muestras de suelo rizosférico de cacao que poseían una alta concentración de Cd se encontró una menor riqueza, abundancia y diversidad de morfoespecies de HFMA con respecto a la encontrada en una localidad cercana con una baja concentración de Cd, siendo esta última significativa (Fig. 6). Resultados similares se encontraron en suelos contaminados con Cd y Zn por actividades antropogénicas los cuales presentaron menor riqueza (Vogel-Mikuš *et al.*, 2005), abundancia y diversidad de HFMA (Del Val *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 2011). El Cd es un elemento que, en condiciones *in vitro*, ha mostrado inhibir la germinación de las esporas, restringir el desarrollo de las hifas e interferir con su ciclo de vida (Weissenhorn *et al.*, 1993), por lo que su presencia puede alterar la estructura de la comunidad removiendo las especies más sensibles y favoreciendo aquellas con mayor adaptación (Schneider *et al.*, 2016).

Los HFMA han demostrado adaptabilidad para estar presentes en diversos ambientes extremos (Weissenhorn *et al.*, 1993). En este caso, un suelo enriquecido naturalmente con altas concentraciones de Cd y Zn posiblemente proporciona una condición de estrés constante y continua que selecciona a las especies no solo por su funcionalidad

ecosistémica, sino por su capacidad de adaptación al estrés (Millar y Bennett, 2016). Se sugiere que la persistencia de algunos HFMA a estos ambientes está asociada a diferentes mecanismos de tolerancia a la presencia de MPs como secreción de quelatinas, síntesis de glicoproteínas como la glomalina (Lopes *et al.*, 2016), retención en su pared celular por grupos carboxilo e hidroxilo (Khan, 2006), así como la detoxificación y acumulación de iones metal en la vacuola mediante metalotioneinas (Meier *et al.*, 2012).

Los géneros detectados en A-Cd-Zn (Fig. 6a) como *Glomus*, *Acaulospora*, *Claroideoglomus* y *Funneliformis* habían sido reportados en suelos contaminados con Cd y Zn (Krishnamoorthy *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017). Interesantemente, aunque a A-Cd-Zn y B-Cd-Zn presentaron similitud en su composición por géneros (5 de 7 en común, Fig. 6a), fueron diferentes en términos de morfoespecies (4 de 23 en común, Fig. 3a). Esto podría indicar que los morfoespecies presentes en A-Cd-Zn cuentan con una alta capacidad de adaptación y mecanismos de tolerancia que les permite persistir en un ambiente limitante (Weissenhorn *et al.*, 1993; Millar y Bennett, 2016), como altas concentraciones de Cd y Zn. Ejemplos de ello son la presencia de *C. etunicatum*, *F. mosseae* y *G. sinuosum* en A-Cd-Zn, que ya han sido reportados en suelos contaminados con Cd (Weissenhorn *et al.*, 1993; Del Val *et al.*, 1999; Krishnamoorthy *et al.*, 2015), Zn (Zarei *et al.*, 2008) y otro tipo de MPs como Cu, As (Hassan *et al.*, 2011), Pb (Zarei *et al.*, 2008).

La alta capacidad de producción de esporas de los morfoespecies *C. etunicatum* y *R. fasciculatum* en A-Cd-Zn posterior al proceso de multiplicación en cultivos trampa (Fig. 3b) puede estar asociada a una estrategia de reproducción tipo -r (Chagnon *et al.*, 2013) o de colonización (Hart *et al.*, 2001), caracterizadas por una alta producción de esporas y mayores tasas de crecimiento que les confieren ventajas en la colonización del hospedero. Interesantemente, *R. microagregatum* fue el único morfoespecie que no se detectó posterior a los seis meses de cultivo trampa (Fig. 7b). Esto podría deberse a que existen diferencias en el tiempo de esporulación entre especies de HFMA (Antoniolli *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2005) y en la capacidad de multiplicación de las especies hospedero (Del Val *et al.*, 1999). Por estas razones, futuros estudios deberían contemplar el uso de más de una especie de planta trampa, diferentes tiempos de muestreo y otros aspectos que permitan multiplicar la totalidad de la diversidad de esporas presentes en los suelos.

Adicionalmente, el uso de otros enfoques moleculares como metagenómica y análisis de polimorfismos alélicos (Sanders y Rodríguez, 2016) pueden brindar una mejor resolución y entendimiento de la diversidad de HFMA presentes en los suelos estudiados.

Los índices de diversidad alfa y beta permitieron contrastar las diferencias entre las comunidades de HFMA presentes en ambos tipos de suelo (Tabla 4). El índice de uniformidad, que oscila entre 0 (heterogéneo) a 1 (uniforme), permitió identificar que las comunidades de HFMA en B-Cd-Zn son más uniformes con respecto a las encontradas en A-Cd-Zn; esto fue confirmado por el índice de Simpson que presentó valores significativamente mayores en A-Cd-Zn con respecto a B-Cd-Zn, lo que indicaría que existe mayor dominancia por algunos morfoespecies como *Diversispora spurca* (24%), *Rhizogloium* sp. (20%) y *Claroideogloium etunicatum* (16%) que reunieron más del 50% de la comunidad de HFMA presente en A-Cd-Zn (Fig. 7a). Los índices de diversidad beta indicaron una baja similaridad y tasa de recambio entre las comunidades de HFMA provenientes de B-Cd-Zn y A-Cd-Zn (Tabla 2), encontrando en común únicamente los morfoespecies *G. microcarpum*, *Acaulospora* sp., *R. microaggregatum* y *R. fasciculatum* (Fig. 7b). Esto sugiere que estas morfoespecies poseen una alta capacidad para tolerar ambientes con un amplio espectro de concentraciones de Cd.

La baja similaridad encontrada entre las comunidades de HFMA puede deberse a diferencias ecológicas en las estrategias de historia de vida para maximizar su supervivencia en diferentes ambientes (Millar y Bennett, 2016), altas concentraciones de Cd y Zn pueden generar cambios en la proporción de tipos funcionales de HFMA a favor de especies estrés-tolerantes y limitar aquellas ruderales o competidoras. Las especies estrés-tolerantes de HFMA se caracterizan por mecanismos de tolerancia al estrés, bajas tasas de crecimiento y poca pero longeva biomasa extraradical (Chagnon *et al.*, 2013), por lo que plantas perennes y con una tasa lenta de crecimiento como el cacao tienen una mayor probabilidad de verse beneficiadas por estas especies. Adicionalmente, cualquier condición adversa que limite la fijación de carbono por las plantas, en este caso una alta concentración de Cd y Zn, es probable que afecte el flujo de carbono hacia los HFMA, por lo que especies con mayor uso eficiente de carbono como las HFMA estrés-tolerantes pueden ser las más beneficiadas a largo plazo (Chagnon *et al.*, 2013).

1.6 Conclusiones

La alta concentración y disponibilidad de Cd y Zn genera una condición de estrés que afecta la estructura de la comunidad de HFMA presente. En suelos cacaoteros enriquecidos con estos MPs se encontró menor abundancia, riqueza y diversidad de morfoespecies de HFMA, así como comunidades de HFMA menos uniformes y con dominancia con respecto a lo detectado en suelos con baja concentración de estos MPs. La baja similaridad y tasa de recambio entre las comunidades estudiadas puede estar relacionada con las diferencias en estrategias de historias de vida, encontrando mayor proporción de HFMA estrés-tolerantes en A-Cd-Zn, destacando por su mayor abundancia a *D. spurca*, *Rhizoglosum* sp. y *C. etunicatum*. La identificación de estos morfoespecies constituye el primer paso para el desarrollo de estrategias de mitigación de plantas crecidas en suelos con este tipo de estrés.

1.7 Bibliografía

- Antonioli ZI, Facelli E, Miller D, Smith SE. Spore communities of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal association in different ecosystems, South Australia. *Rev Bras Ciência do Solo*. 2002;26(1):627-635.
- Arévalo-gardini E, Arévalo-Hernández CO, Baligar VC, He ZL. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Sci Total Environ*. 2017;606:792-800.
- Audet P, Charest C. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollut*. 2007;147:609-614. doi:10.1016/j.envpol.2006.10.006
- Bravo D, Pardo-Díaz S, Benavides-Erao J, Rengifo-Estrada G, Braissant O, Leon-Moreno C. Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *J Appl Microbiol*. 2018;124(5):1175-1194. doi:10.1111/jam.13698
- Brundrett M, Piche Y, Peterson R. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can J Bot*. 1984;62:2128-2134.
- Brundrett MC, Tedersoo L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol*. 2018. doi:10.1111/nph.14976
- Chagnon P, Bradley RL, Maherali H, Klironomos JN. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends Plant Sci*. 2013;18(9):484-491. doi:10.1016/j.tplants.2013.05.001
- Chavez E, He ZL, Stoffella PJ, et al. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci Total Environ*. 2015;533:205-214. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.106
- Chavez E, He ZL, Stoffella PJ, Mylavrapu RS, Li YC, Baligar VC. Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*. 2016;150:57-62. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.013

- Del Val C, Barea JM, Azcón-Aguilar C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environmental Microbiol.* 1999;65(2):718-723.
- FAO, OMS. Proposed draft maximum levels for cadmium in chocolate and cocoa-derived products. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comisión del codex sobre contaminación en los alimentos. 2014;Item 6:1-20.
- Gramlich A, Tandy S, Andres C, Chicheros J, Amengot L, Schneider M, et al. Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Sci Total Environ.* 2017;580:677-686.
- Gramlich A, Tandy S, Gauggel C, López M, Perla D, Gonzales V, et al. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Sci Total Environ.* 2018;612:370-378. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.145
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN. Life-history strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia.* 2001;93(6):1186. doi:10.2307/3761678
- Hassan S, Boon E, St-Arnaud M, Hijri M. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol Ecol.* 2011;20:3469-3483. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x
- Hazard C, Gosling P, Gast CJ, Mitchell DT, Doohan FM, Bending GD. The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *ISME J.* 2012;7(3):498-508. doi:10.1038/ismej.2012.127
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. 2005;19:125-140. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.010
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry.* 2007;68(1):139-146. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.023
- IGAC. Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca. Bogotá, Colombia: CARTOPRINT Ltda.; 2000. p. 1-571.
- Jiménez Tobón CS. Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+Limpia.* 2015;10(1):89-104.
- Kabata-Pendias A, Barbara S. Trace Elements in Abiotic and Biotic Environments. Vol 91.; 2015. p. 1-393.
- Kassambara A. Practical Guide to Principal Component Methods in R. *STHDA*; 2017.p.1-170.
- Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere.* 2000;41(1):197-207. doi:10.1016/S0045-6535(99)00412-9
- Khan AG. Mycorrhizoremediation - an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(7):503-514. doi:10.1631/jzus.2006.B0503
- Krishnamoorthy R, Kim C, Subramanian P, Kim K, Selvakumar G, Sa T. Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128784. doi:10.1371/journal.pone.0128784
- Lanza J, Churion P, Liendo N, López V. Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Santa Bárbara de Zulia, Venezuela. *Saber, Univ Oriente.* 2016;28(1):106-115.
- Lopes Leal P, Varón-López M, Gonçalves I, Valentim J, Fonseca CR, Siquiera JO, et al. Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(4):853-862. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.001
- Lora R, Bonilla H. Remediation of a soil contaminated with the heavy metals cadmium and chromium on the high basin of the Bogota river. *Rev UDCA Actual & Divulg Científica.* 2010;13(2):61-70.

- Mahar A, Wang P, Ali A, Kumar M, Hussain A, Wang Q, et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;126:111-121. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.12.023
- Meier S, Borie F, Bolan N, Cornejo P. Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2012;42(7):741-775. doi:10.1080/10643389.2010.528518
- Millar NS, Bennett AE. Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia.* 2016;182(3):625-641. doi:10.1007/s00442-016-3673-7
- Morton JB, Bentivenga SP, Bever JD. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Bot.* 1995;73(S1):25-32. doi:10.1139/b95-221
- Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, Alves da Silva G. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus.* 2011;2(2):191-199. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.10
- Oehl F, Laczko E, Oberholzer H-R, Jansa J, Egli S. Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Biol Fertil Soils.* 2017;(July). doi:10.1007/s00374-017-1217-x
- Pagano MC, Persiano AIC, Cabello MN, Scotti MR. Elements sequestered by arbuscular mycorrhizal spores in riverine soils: A preliminary assessment. *J Biophys Struct Biol.* 2010;2(2):16-21.
- Rodríguez A, Sanders IR. The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J.* 2015;9(5):1053–1061. doi:10.1038/ismej.2014.207
- Rodríguez Albarracín SH, Darghan AE, Henao MC. Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional;* 2019;16:e0214. doi:10.1016/j.geodrs.2019.e00214
- Sanders IR, Rodríguez A. Aligning molecular studies of mycorrhizal fungal diversity with ecologically important levels of diversity in ecosystems. *ISME J.* 2016;10(12):2780-2786. doi:10.1038/ismej.2016.73
- Schenk N, Perez Y. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi.* 3th Editio. Sinergistic Publications; 1990. p. 1-286.
- Schneider J, Bundschuh J, do Nascimento CWA. Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Sci Total Environ.* 2016;572:86-97. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.185
- Souza FA, Dalpé Y, Declerck S, Providencia IE, Séjalon-Delmas N. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. *Vitr Cult mycorrhizas.* 2005;4:73-91. doi:10.1007/3-540-27331-X_5
- Souza J, Oehl F, Donizete C, et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Appl Soil Ecol.* 2017;117-118:178-189. doi:10.1016/j.apsoil.2017.04.023
- Suzuki R, Shimodaira H. Pvclust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics.* 2006;22(12):1540-1542. doi:10.1093/bioinformatics/btl117
- Svenningsen NB, Watts-Williams SJ, Joner EJ, et al. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *ISME J.* 2018. doi:10.1038/s41396-018-0059-3
- USDA. *Claves Para La Taxonomía de Suelos.* Décima seg. Montecillo, Texcoco, Estado de México; 2014.p.1-410.
- Villarreal H, Álvarez S, Córdoba F, Escobar G, Fagua F, Gast H, et al. Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. In: *Manual de Métodos Para El Desarrollo de Inventarios de Biodiversidad.*

- Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos S.A.; 2004:187-225. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Vogel-Mikuš K, Drobne D, Regvar M. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environ Pollut.* 2005;133(2):233-242. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.021
 - Weissenhorn I, Leyval C, Berthelin J. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant Soil.* 1993;157(2):247-256. doi:10.1007/BF00011053
 - Xu X, Chen C, Zhang Z, et al. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Sci Rep.* 2017;7(December 2016):1-11. doi:10.1038/srep45134
 - Zarei M, König S, Hempel S, Nekouei MK, Savaghebi G, Buscot F. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environ Pollut.* 2008;156(3):1277-1283. doi:10.1016/j.envpol.2008.03.006

2. Capítulo II: Nutrición, eficiencia fotosintética y crecimiento de dos genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en suelos con alta concentración de zinc y cadmio

2.1 Resumen

El zinc (Zn) y el cadmio (Cd) son metales que en altas concentraciones en el suelo pueden alterar la fisiología de plantas de cacao. Estas alteraciones varían entre genotipos y únicamente han sido descritas en condiciones artificiales que modifican la dinámica natural de los metales en el sistema suelo-planta. En este estudio se evaluó la nutrición, eficiencia fotosintética y el crecimiento en dos genotipos de cacao (IMC67 y PA121) durante la etapa de vivero (133 días después de siembra, DAS) en suelos con concentraciones naturales bajas (CS-suelo control: 9 mg kg⁻¹ Zn, <0.1 mg kg⁻¹ Cd) y altas (ES-suelo enriquecido: 123 mg kg⁻¹ Zn, 24 mg kg⁻¹ Cd) de estos metales. La alta relación Zn/Cd en el ES (5.1) modificó en la toma de Zn y Cd por las plantas, encontrándose concentraciones de Zn por encima (2.2 veces) y de Cd por debajo (0.8 veces) del umbral de toxicidad reportado para tejidos de cacao. Ambos genotipos en ES acumularon menor concentración de Mg y mayores concentraciones de Zn y Cd en hojas, mostrando clorosis en hojas del tercio medio superior. Las plantas en ES incrementaron el *quenching* no fotoquímico (NPQ) a los 98 DAS y redujeron el *quenching* fotoquímico (qP), el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m), la tasa de transporte de electrones (ETR), la biomasa total, el área foliar y el número de hojas a los 133 DAS. Los resultados sugieren que las plantas crecidas en suelos naturales con altas concentraciones de Cd y Zn disminuyeron la toma de Mg, el contenido de pigmentos, la eficiencia fotosintética y el crecimiento. El cacao acumuló Cd y Zn principalmente en los tejidos aéreos como ocurre en otras especies hiperacumuladoras.

Palabras Clave: genotipo, metales pesados, planta hiperacumuladora, toxicidad por zinc, relación Zn/Cd

2.2 Introducción

Los metales pesados (MPs) son elementos que pueden estar presentes en los suelos debido a fuentes geogénicas o por algunas actividades antropogénicas como la minería y la fertilización (He *et al.*, 2005; Lora & Bonilla, 2010; Zug *et al.*, 2019). El zinc (Zn) y el cadmio (Cd) son MPs que comparten una naturaleza química similar y se pueden encontrar simultáneamente en condiciones naturales, ya que estos son liberados durante la meteorización de materiales sedimentarios enriquecidos (Olade, 1987). Estos metales son de carga bivalente y pueden causar deficiencias nutricionales y alteraciones en la homeostasis de las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2018), ya que ambos compiten por el ingreso a las células de la raíz con elementos esenciales de carga similar, como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} , que emplean los mismos canales y transportadores (Luo *et al.*, 2016).

El Zn y el Cd pueden reducir el crecimiento de las plantas dependiendo de su concentración en el suelo (Reichman, 2002; Sheoran *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2017). El Zn es un microelemento esencial involucrado en la síntesis de proteínas, la expresión génica, la activación de enzimas y el metabolismo de carbohidratos (Hafeez *et al.*, 2013). No obstante, cuando su concentración en suelo y tejidos vegetales se encuentra por encima de la concentración tóxica crítica (CTC), este metal puede producir clorosis en hojas jóvenes (Reichman, 2002), denaturación de los complejos pigmento-proteínas del fotosistema II (Nagajyoti *et al.*, 2010; Küpper & Andresen, 2016) y desórdenes en la homeostasis mineral (Kramer, 2010). Del mismo modo, la presencia de Cd en el suelo puede competir con la toma de nutrientes (Nazar *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2016), afectar la eficiencia fotosintética (Viehweger, 2014) y generar estrés oxidativo por la interferencia con procesos metabólicos, casuando disminución en la biomasa total y el rendimiento en las plantas (Hossain *et al.*, 2012; He *et al.*, 2017).

La tolerancia a estreses por MPs como Zn y Cd varía entre especies hiperacumuladoras y no hiperacumuladoras (Y. F. Lin & Aarts, 2012; Luo *et al.*, 2016). Estas diferencias son atribuidas a diversos mecanismos de respuesta de las plantas como modificaciones en procesos fisiológicos de toma, transporte, secuestro y detoxificación de los MPs (Lux *et al.*,

2011; Luo *et al.*, 2016). Particularmente, en especies leñosas e hiperacumuladoras se ha encontrado mayor habilidad para acumular MPs en sus órganos, probablemente por poseer mayor número de genes que codifican proteínas transportadoras de este metal asociadas a complejos de translocación (Kramer, 2010; Luo *et al.*, 2016). El cacao se ha reportado como una planta con alta capacidad para extraer, transportar y acumular Cd en sus tejidos (Chavez *et al.*, 2015; Gramlich *et al.*, 2018), y esta respuesta difiere entre grupos genéticos de cacao (Arévalo-gardini *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2018; Engbersen *et al.*, 2019). De esta manera, el estudio de genotipos con menor eficiencia en la toma y acumulación de metales es una herramienta importante para el desarrollo de programas de mejoramiento a largo plazo.

El cacao colombiano se destaca internacionalmente por sus características finas de sabor y aroma (Chaux & Pérez, 2017), no obstante, la presencia de altas concentraciones de Cd y Zn en algunas regiones productoras de Colombia (Rodríguez *et al.*, 2019) podría incidir sobre el rendimiento y calidad de sus frutos. Los efectos nocivos del Cd y Zn sobre la fisiología de plantas de cacao han sido previamente estudiados de manera independiente y mediante aplicaciones exógenas de los metales sobre un sustrato (Cruz *et al.*, 2015; Pereira de Araújo *et al.*, 2017). Sin embargo, estos experimentos no proveen información del comportamiento fisiológico de plantas de cacao en condiciones naturales donde (1) el Cd y el Zn pueden ser encontrados en el suelo en altas concentraciones de manera simultánea (Olade, 1987) y (2) existe mayor proporción de los metales en las fracciones residuales, oxidables y reducibles del suelo que en las fracciones solubles (Chavez *et al.*, 2016).

El Cd y el Zn son metales que debido a su similitud química pueden interactuar produciendo efectos aditivos, sinérgicos y/o antagónicos que modifican el ingreso de estos iones a las células de la raíz, dependiendo de varios factores como las concentraciones de estos MPs, la capacidad de adsorción del suelo, la especie y genotipo de la planta, entre otros (Lin & Aarts, 2012; Kaur & Garg, 2018). En cacao, se desconoce el efecto de estas interacciones sobre la respuesta fisiológica de los genotipos utilizados comercialmente como patrón de injertación en diferentes regiones de Colombia. Por esta razón, este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de suelos con concentraciones naturales altas de Zn y Cd sobre la fisiología, nutrición y acumulación de estos metales en dos genotipos de patrón para cacao en la etapa de vivero. Los resultados de esta investigación proporcionan información novedosa acerca de las interacciones catiónicas

de un sistema natural suelo-planta, así como de las alteraciones en la fisiología de la planta de cacao en presencia de estos metales.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Establecimiento del experimento y material vegetal

El experimento se realizó en un vivero en la región de Yacopí, Colombia (5° 27' 09"N, 74° 20' 16"W) a 1350 m.s.n.m. Se utilizaron semillas de cacao pertenecientes a dos grupos genéticos (IMC67: Iquitos y PA121: Marañon) obtenidas de la colección de trabajo de la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). Las semillas se sembraron individualmente en bolsas de plástico de 8 L. Se utilizó suelo proveniente de dos localidades del municipio de Yacopí, Colombia (Rodríguez & Henao, 2017), una con concentraciones naturales de Zn y Cd bajas o suelo control (CS: 9 mg kg⁻¹ Zn y <0.1 mg kg⁻¹ Cd) y otra con un suelo enriquecido naturalmente con concentraciones altas de Zn y Cd (ES: 123 mg kg⁻¹ Zn y 24 mg kg⁻¹ Cd) (Tabla S3). De cada localidad se tomó una tonelada de suelo a 30 cm de profundidad el cual se tamizó con malla de 2 cm y se transportó al vivero. Se analizaron cuatro muestras de cada tipo de suelo para determinar sus propiedades fisicoquímicas y con base en estos se ajustó el contenido de elementos minerales y el pH (Tabla S3) mediante fertilización química edáfica, según los requerimientos nutricionales de las plántulas de cacao (Crespo & Crespo, 1997; Molina, 1999).

Las plantas fueron crecidas en condiciones de vivero durante 133 días después de siembra (DAS) bajo sombrío de 50% con polisombra negra, con temperatura media 22.5 ± 4.5 °C, humedad relativa promedio 83 ± 5% y precipitación promedio anual de 2533 mm. Se aplicó riego cada cuatro días cuando se presentó ausencia de lluvias por un periodo mayor a una semana y el manejo agronómico de plagas y enfermedades se realizó de acuerdo a Fedecacao (2015). Se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2 usando como factores el genotipo del patrón (IMC67 y PA121) y el tipo de suelo (CS y ES), de esta manera se tuvieron cuatro tratamientos: CS-IMC67, CS-PA121, ES-IMC67 y ES-PA121. Para las variables verdor y contenido de nutrientes cada tratamiento tuvo 4 repeticiones y para los parámetros de crecimiento y eficiencia fotosintética cada

tratamiento contó con 16 repeticiones por punto de muestreo, la unidad experimental fue una planta.

2.3.2 Análisis físico-químico de suelo

Se analizaron las propiedades físico-químicas de suelo (textura, pH, CICE, y contenido de carbono orgánico (CO), nitrógeno total (NT), P, K, Ca, Mg, Na, Acidez intercambiable (AI), Cu, Fe, Mn, Cd y Zn) en cuatro muestras de cada tipo de suelo (CS y SE), este procedimiento se realizó antes de ajustar los requerimientos nutricionales y a los 90 DAS (Tabla S3). La textura se determinó por el método de Bouyoucus mediante dispersión en $(\text{NaPO}_3)_6$. El pH se determinó en suspensión suelo agua p:v (1:1). La capacidad de intercambio catiónica efectiva (CICE) se realizó por suma de cationes intercambiables. El carbono orgánico (CO) por el método de analizador elemental. El contenido de P disponible por el método de Bray II. El contenido de K, Ca, Mg y Na intercambiables se extrajo con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M pH 7, la acidez intercambiable (AI) con KCl 1M y el contenido de Cu, Fe, Mn y Zn disponibles con DTPA 1:2 (p/v). El Cd total (Cd-t) se determinó por extracción ácida con HCl:HNO₃ 1:8 (p/v) y el Cd disponible (Cd-d) por extracción con DTPA 1:2 (p/v). La cuantificación de elementos fue determinada usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK). Los análisis físico-químicos fueron realizados en el Laboratorio de Aguas y de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (UNAL).

2.3.3 Contenido de nutrientes y Cd en tejidos

La determinación del contenido de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn y Cd en tejido foliar se realizó a los a los 133 DAS haciendo un *pool* de cuatro plantas por tratamiento. Para realizar los análisis químicos, las muestras de tejido fueron deshidratadas (70°C por 72 horas), molidas y tamizadas (0.2 mm). El tejido molido fue calcinado a 650 °C y digerido en HCl para determinación de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn y Zn o digerida en HCl:HNO₃ para determinación de Cd (Carrillo *et al.*, 1994). Las concentraciones de elementos se determinaron usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK) en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNAL. La determinación del contenido de Cd y Zn se realizó espacialmente diferenciando la acumulación de estos metales en dos órganos (hojas y raíz-tallo).

2.3.4 Verdor de la hoja

El verdor de la hoja se midió con un clorofilometro (atLEAF+, FT Green LLC, USA) a los 133 DAS. Las mediciones se realizaron en cada planta, desde la hoja más joven (hoja 1) hasta la hoja más vieja (hoja 7), tomando cuatro mediciones por hoja en cuatro plantas por tratamiento.

2.3.5 Fluorescencia de la clorofila de *a*

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* se determinó con un fluorómetro modulado (MINI-PAM, Walz, Effeltrich, Germany) en la tercera hoja totalmente expandida y fotosintéticamente activa a los 60, 98 y 133 DAS. Las hojas fueron adaptadas a la oscuridad durante 20 minutos, y luego fueron expuestas a un pulso de luz con densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 45 segundos. Se determinaron los parámetros: máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m), tasa de transporte de electrones (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) y *quenching* no fotoquímico (NPQ).

2.3.6 Crecimiento

Se realizaron tres muestreos destructivos a los días 60, 98 y 133 DAS. El tejido vegetal fue deshidratado en un horno (70°C por 72 horas) hasta alcanzar masa constante y luego pesado para determinar la masa seca total de la planta (TMP). El área foliar (LA) y el número de hojas (LN) fueron obtenidos mediante análisis de fotografías con el software imageJ®.

2.3.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos vías ($p < 0.05$) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$), posterior a la revisión de supuestos de normalidad (Lilliefors: $p > 0.05$) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen: $p > 0.05$) utilizando el programa estadístico R 3.4.0.

2.4 Resultados

2.4.1 Composición fisicoquímica del suelo

Los análisis químicos mostraron diferencias significativas en el contenido de metales entre CS y ES a los 90 DAS (Tabla 5). El ES presentó mayores contenidos de Cd-d (2400%), Zn (1251%), Cu (734%), Fe (289%), Mn (303%) y menores de Mg (45%) con respecto a CS. Ambos suelos presentaron pH moderadamente ácido y propiedades físicas similares con textura franco-arcillosa. Estos resultados muestran que los dos suelos a los 90 DAS no se presentaron diferencias significativas en el contenido de los nutrientes N, P, K, Ca y B (Tabla S1), sin embargo si se presentaron concentraciones contrastantes de Cu, Fe, Mn, Mg, Zn y Cd entre CS y ES (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización físico-química de suelos usados para crecer los dos genotipos de cacao. Suelo con contenido bajo de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES) a los 90 DAS.

| Soil type | Mg | Cu | Fe | Mn | Zn | Cd-d | Cd-t | Zn/Cd | pH | Texture |
|-----------------|----------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|-------|-------|-----|---------|
| | meq·100g | | | | | | | | 1:1 | |
| CS | 3.88 | 0.74 | 62.4 | 6.44 | 9.1 | <0.1 | 1.5 | ND | 6.4 | FAr |
| ES | 1.75 | 5.43 | 180 | 19.5 | 123 | 24.0 | 30.85 | 5.1 | 5.0 | FAr |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** | *** | *** | ND | *** | ND | *** | |
| CTC | | >8 ^a | >300 ^b | >50 ^c | >33 ^d | >6 ^e | | | | |

Cd-t: Cadmio total; Cd-d: Cadmio disponible; FAr: Franco-arcillosa. CTC: Concentración crítica tóxica en suelo reportado para: ^a cacao (V. L. Souza et al., 2014); ^b especies anuales y perennes (Suresh, 2005); ^c revisión de varias especies (El-Jaoual & Cox, 1998; Millaleo et al., 2010); ^d cacao (Cruz et al., 2015); ^e cacao (Jacome & Rodriguez, 2017). Asteriscos indican *p*-values (***, <0.001; ns, >0.05; ND, no determinado) del análisis de variancia correspondientes a las diferencias entre tipos de suelo (n=4).

2.4.2 Contenido de nutrientes en la hoja

El contenido de elementos bivalentes como Cd²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ en el tejido foliar presentó diferencias significativas para ambos genotipos en los dos suelos (Tabla 6). El contenido de Mg fue significativamente menor en ES-IMC67 (45%) y ES-PA121 y (42%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121, mientras que el contenido de Mn fue más alto en ES-IMC67 (1489%) y ES-PA121 (1151%), en comparación con CS-IMC67 y CS-PA121. Con respecto al contenido de Ca se encontró interacción significativa entre los factores suelo y genotipo, donde ES-PA121 acumuló 155% más con respecto a CS-PA121. Otros elementos bivalentes como Cu y Fe no presentaron diferencias significativas entre genotipos en los dos suelos. En las relaciones catiónicas se encontraron correlaciones altamente significativas en el contenido de algunos elementos (Tabla S4), con relaciones inversas entre el Mg y Cd (-0.96***), Ca (-0.65***), Mn (-0.80***), y Zn (-0.79***); y relaciones

directas del Cd con Ca (0.7**), Mn (0.82***) y Zn (0.84***) y entre el Zn con Mn (0.98***). Estos resultados indican que el crecimiento de ambos genotipos en ES resultó en una mayor acumulación de Cd, Zn y Mn y menor de Mg en las hojas.

2.4.3 Contenido de Zn y Cd en tejidos

La acumulación de Zn y Cd en ambos genotipos presentó diferencias significativas entre hojas y raíz-tallo dependiendo del tipo de suelo (Fig. 9). Cuando las plantas se crecieron en ES la acumulación de Cd fue mayor en hojas de IMC67 (74%) y PA121 (98%) respecto a la acumulación en su raíz-tallo (Fig. 9a). El Zn también se acumuló en mayor proporción en las hojas de IMC67 (15%) y PA121 (33%) con respecto a la raíz-tallo en plantas crecidas en ES (Fig. 9b), sin embargo, únicamente PA121 presentó diferencias significativas en la acumulación de Zn entre hojas y raíz-tallo. Los dos genotipos de cacao crecidos en CS acumularon en promedio 54.5 mg kg⁻¹ de Zn y 1.72 mg kg⁻¹ Cd, sin diferencias significativas entre órganos y genotipos. Los datos muestran que la acumulación de Cd y Zn se presentó en mayor proporción en las hojas de ambos genotipos de cacao crecidos en ES.

Tabla 6. Contenido de nutrientes bivalentes en hojas de los genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con contenido bajo de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES) a los 133 días después de siembra.

| Parameter | CS | | ES | | P-value | | | CTC |
|--|----------------|----------------|------------------|------------------|---------|-----|-----|--------------------|
| | IMC67 | PA121 | IMC67 | PA121 | S | G | SxG | |
| Heavy metal (mg·kg⁻¹ DW) | | | | | | | | |
| Cd | 1.7 ± 0.2 b | 1.7 ± 0.3 b | 217.5 ± 50.4 a | 235.6 ± 29.9 a | *** | ns | ns | >300 ^a |
| Micronutrient (mg·kg⁻¹ DW) | | | | | | | | |
| Cu | 9.3 ± 1.5 a | 6.8 ± 0.9 a | 7.7 ± 3.8 a | 7.8 ± 1.0 a | ns | ns | ns | >30 ^b |
| Fe | 284.9 ± 48.0 a | 198.5 ± 81.9 a | 241.6 ± 128.0 a | 260.0 ± 85.6 a | ns | ns | ns | >300 ^c |
| Mn | 88.2 ± 7.3 b | 97.1 ± 32.2 b | 1401.8 ± 155.5 a | 1101.3 ± 208.8 a | *** | ns | ns | >3500 ^b |
| Zn | 48.3 ± 1.5 b | 46.6 ± 9.1 b | 777.6 ± 66.3 a | 763.0 ± 135.0 a | *** | ns | ns | >360 ^d |
| Macronutrient (g·kg⁻¹ DW) | | | | | | | | |
| Mg | 4.8 ± 0.2 a | 4.5 ± 0.3 a | 2.6 ± 0.8 b | 2.6 ± 0.3 b | *** | ns | ns | |
| Ca | 21.0 ± 1.3 b | 19.8 ± 2.3 b | 25.7 ± 3.2 b | 50.6 ± 3.6 a | *** | *** | *** | |

CTC: concentración crítica tóxica en tejidos vegetales reportado para: ^a cacao (Jacome & Rodriguez, 2017), ^b plantas en general (Kramer, 2010), ^c especies anuales y perennes (Suresh, 2005), ^d Cacao (Cruz *et al.*, 2015). Valores corresponden a la media de cuatro repeticiones (± desviación estándar). Medias con la misma letra no difieren significativamente a un p < 0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey. Asteriscos indican los P-valores (***, <0.001; ns, >0.05) del análisis de varianza dados por tipo de suelo (S), genotipo (G) y su interacción (SxG).

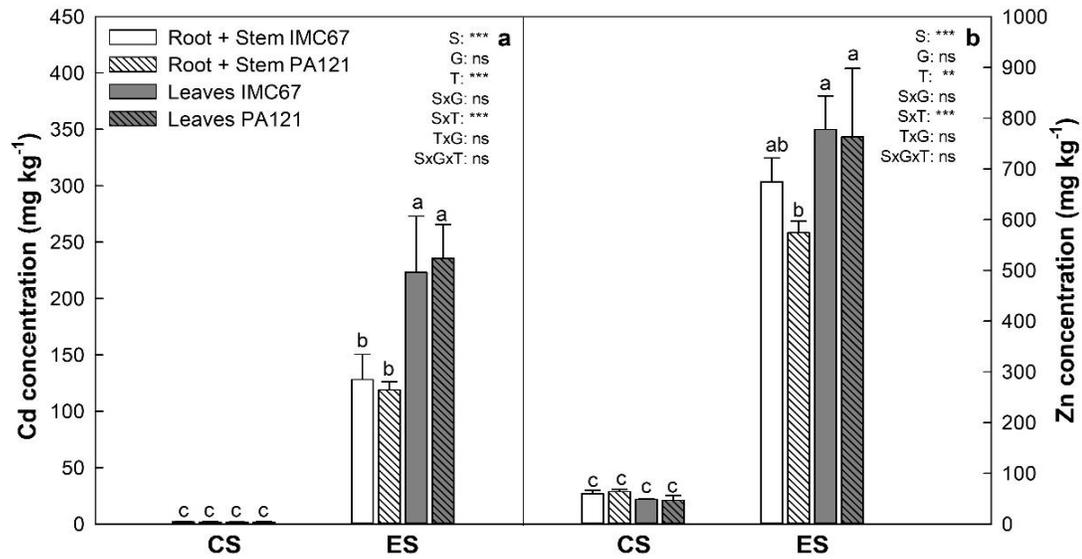


Figura 9. Acumulación de Cd (a) y Zn (b) en los órganos de genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con contenido bajo de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES) a los 133 DAS. Barras indican la media \pm SD. Asteriscos indican los *p*-valores (***, <0.001; **, <0.01; ns, >0.05) del análisis de varianza dados por tipo de suelo (S), tipo de genotipo (G), tipo de órgano (T) y sus posibles interacciones. Las barras indican la media \pm SD (n=4). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a *p*<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

2.4.4 Verdor de la hoja

El verdor de las hojas presentó diferencias significativas entre genotipo dependiendo del tipo de suelo en el que se crecieron las plantas (Fig. 10, Tabla S5). En ES-IMC67 y ES-PA121 se presentaron disminuciones significativas en el verdor de todas las hojas respecto a CS-IMC67 y CS-PA121 a los 133 DAS. La mayor reducción en verdor se observó en ES-IMC67 en las hojas número 1 (78%), 2 (62%) y 3 (25%) y en ES-PA121 en las hojas número 1 (68%), 2 (51%) y 3 (39%). La disminución en el verdor de las hojas fue más drástica en ES-PA121 donde se presentó a partir de la hoja número 5, en contraste con ES-IMC67 donde la disminución se observó a partir de la hoja 3. El genotipo IMC67 presentó mayor verdor en todas las hojas en contraste con el genotipo PA121 cuando se crecieron en CS. Estos resultados indican que el verdor de las hojas jóvenes en ambos genotipos fue menor en ES y que esta disminución fue más marcada en el genotipo PA121.

2.4.5 Fluorescencia de la clorofila a

Los parámetros asociados a la fluorescencia de la clorofila *a* presentaron diferencias significativas con base en el tipo de suelo en los que se crecieron los genotipos (Fig. 11 y Tabla S6). La relación F_v/F_m se redujo significativamente a los 133 DAS para ES-IMC67

(13%) y ES-PA121 (45%), en comparación con CS-IMC67 y CS-PA121, respectivamente (Fig. 11a). El ETR disminuyó significativamente a partir de los 98 DAS para ES-IMC67 (14%) y ES-PA121 (36%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121, la diferencia se hizo mayor a los 133 DAS tanto para ES-IMC67 (61%) como para ES-PA121 (71%) (Fig. 11b). El qP a los 133 DAS disminuyó en ES-IMC67 (49%) y ES-PA121 (44%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121. El NPQ a los 98 DAS aumentó en ES-IMC67 (33%) y ES-PA121 (39%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121, este incremento se mantuvo a los 133 DAS solamente en ES-IMC67, aunque en menor proporción (20%). Estos resultados indican que la eficiencia fotosintética de los dos genotipos se redujo cuando estos se crecieron en ES, sin embargo IMC67 presentó una menor reducción en contraste con CAU43.

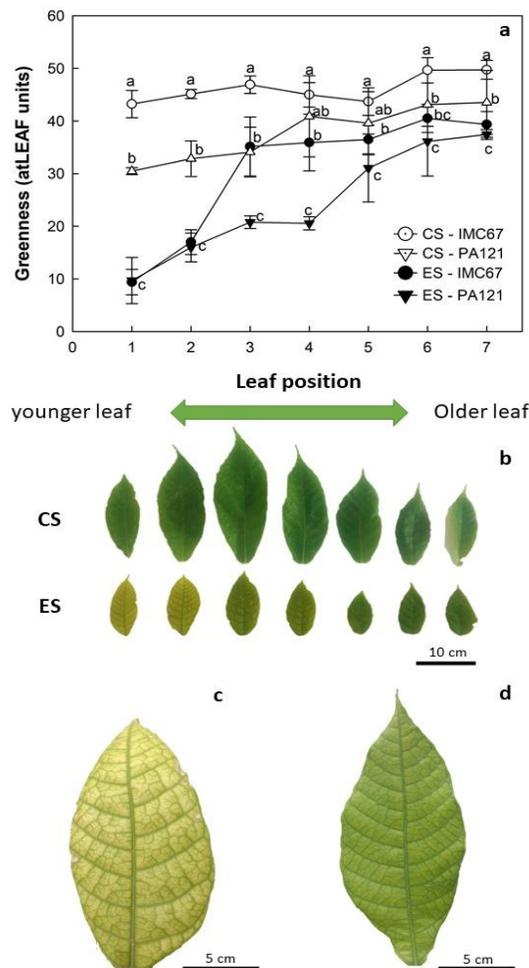


Figura 10. Verdor de hojas en unidades atLEAF según su posición en la planta de los genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con contenido bajo de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente

enriquecido con Zn y Cd (ES) a los 133 DDS (a). Hojas del genotipo PA121 en CS y ES a los 133 DAS (b). Hoja número 1 del genotipo PA121 en ES (c). Hoja número 3 del genotipo PA121 en ES (d). Símbolos representan la media \pm SD (n=4). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

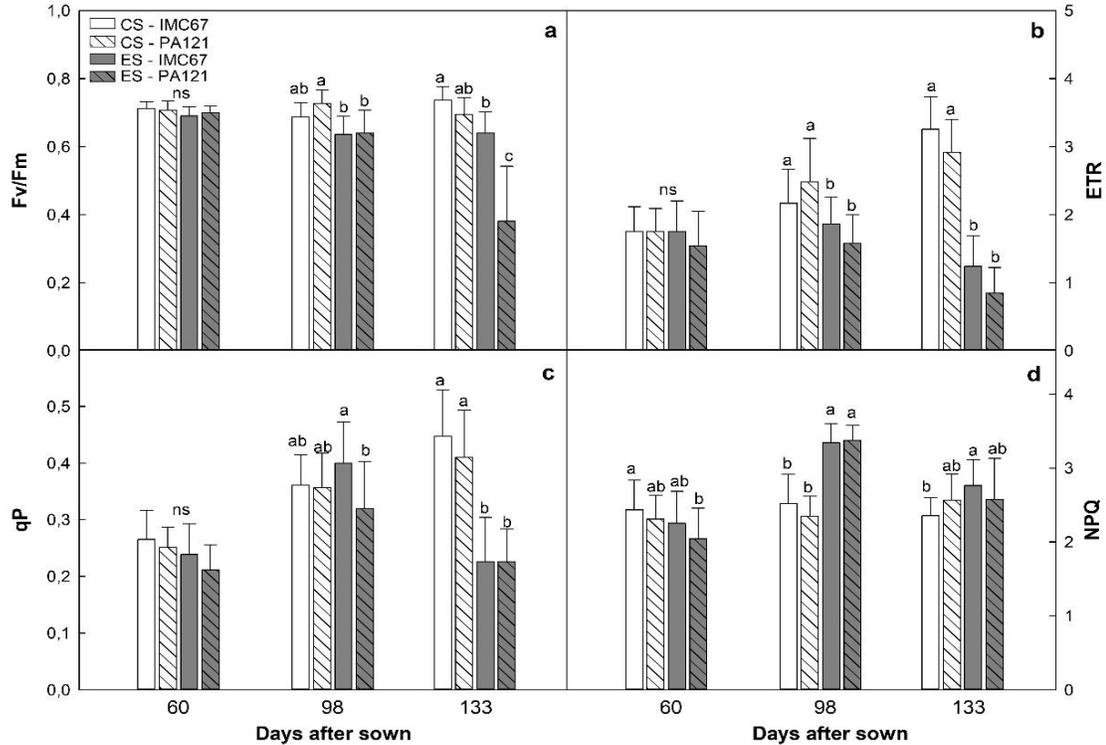


Figure 11. Máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v / F_m) (a), tasa de transporte de electrones (ETR) (b), *quenching* fotoquímico (qP) (c) y *quenching* no fotoquímico (NPQ) (d) de los genotipos de cacao IMC67 y PA121 crecidos en suelo con contenido bajo Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES). Barras representan la media \pm SD (n=16). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

2.4.6 Crecimiento

Plantas de IMC67 y PA121 crecidas en ES presentaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento por el tipo de suelo (Fig. 12, Tabla S6). La TMP a partir de los 98 DAS fue significativamente menor en ES-IMC67 (29%) y ES-PA121 (39%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121 (Fig. 12a). A los 133 DAS la reducción en TMP fue mayor tanto para ES-IMC67 (50%) como para ES-PA121 (59%). Igualmente, a los 133 DAS se presentó una reducción en el LA en ES-IMC67 (69%) y ES-PA121 (63%) con respecto a CS-IMC67 y CS-PA121 (Fig. 12b). El LN fue mayor a los 98 DAS (21%) y a los 133 DAS (23%) para CS-IMC67 respecto a CS-PA121 (Fig. 12c). El LN a los 60 DAS fue menor en ES-PA121 (32%) que en CS-PA121 y a partir de los 98 DAS fue menor tanto para ES-IMC67 (36%) como para ES-PA121 (31%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121. A los 133 DAS la

disminución en el LN fue mayor en ES-IMC67 (52%) y ES-PA121 (35%) respecto a CS-IMC67 y CS-PA121. Estos datos muestran que los dos genotipos crecidos en ES presentaron reducciones marcadas en los parámetros de crecimiento a los 133 DAS.

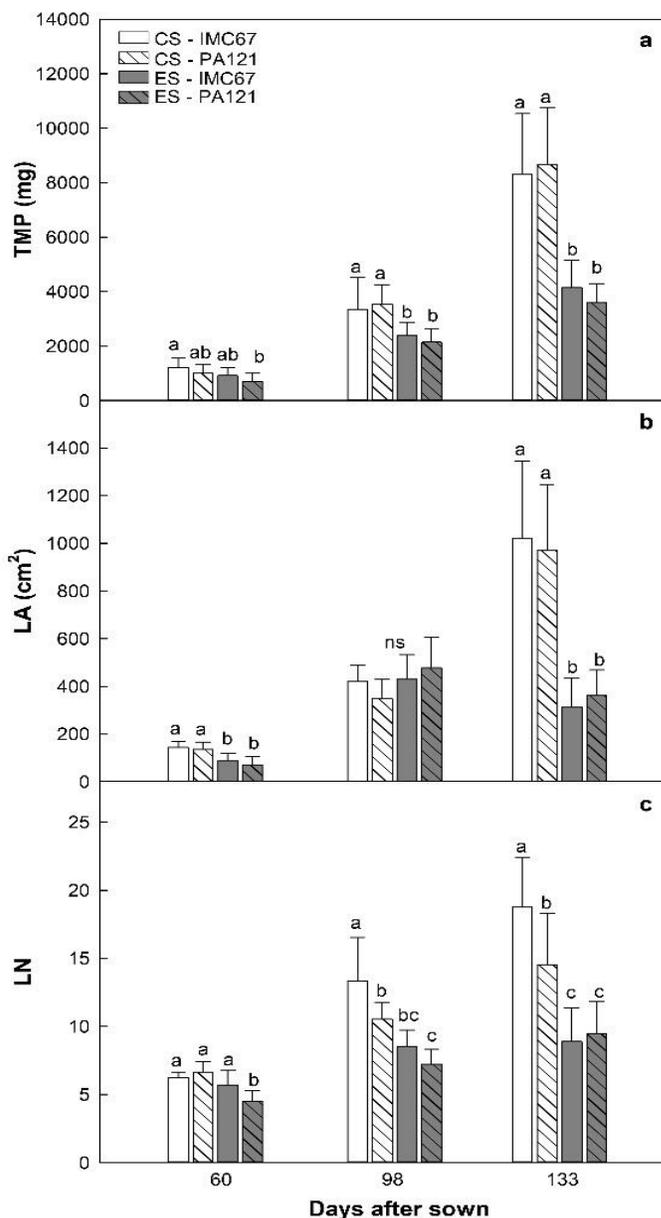


Figura 12. Parámetros de crecimiento en plantas de cacao de los genotipos IMC67 y PA121 crecidos en suelo con concentraciones bajas de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES). Masa total de la planta (TMP) (a), área foliar (LA) (b) y número de hojas (LN) (c). Barras representan la media \pm SD (n=16). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

2.5 Discusión

El presente estudio permitió evaluar el comportamiento fisiológico de dos de los genotipos de patrón para cacao más utilizados en Colombia (IMC67 y PA121) en un suelo naturalmente enriquecido con altas concentraciones de Cd y Zn. A diferencia de otros estudios donde los MPs a evaluar son adicionados al sustrato, aquí se utilizaron dos suelos con contenidos naturales contrastantes de Cd y Zn los cuales se acondicionaron mediante fertilización química para proporcionar los requerimientos nutricionales óptimos para las plantas de cacao. El uso de esta metodología permitió analizar la dinámica suelo-planta de estos metales con otros cationes bivalentes y sus efectos sobre el contenido de pigmentos, eficiencia fotosintética y crecimiento de plantas de cacao durante la etapa de vivero.

2.5.1 Suelos enriquecidos naturalmente con Cd y Zn

La presencia de altas concentraciones de Cd y Zn en suelos ha sido asociada con materiales parentales de tipo sedimentario y sustratos aluviales (He *et al.*, 2015; Gramlich *et al.*, 2018). La región de Yacopí posee un origen parental compuesto por carbonatos (Rodríguez *et al.*, 2019) y *black shales* (IGAC, 2000; Gómez *et al.*, 2015), los cuales pueden contener hasta 200 mg kg⁻¹ de Cd (He *et al.*, 2005) y 1500 mg kg⁻¹ de Zn (Edelstein & Ben-Hur, 2018), por lo que al meteorizarse pueden dar origen a suelos con altas concentraciones de estos metales (Tabla 5). El ES presentó concentraciones altas de Cu, Fe y Mn con respecto a CS, no obstante, solo el Cd y el Zn se encontraron en el suelo en concentraciones tóxicas por encima del CTC para plantas de cacao (Tabla 5). De acuerdo a la clasificación de umbrales para metales pesados en el suelo por Siebielec *et al.*, (2012), el ES presentó concentraciones de Cd correspondientes al nivel V (*very strong contamination*) y de Zn al nivel I (*elevated content*). El CS presentó concentraciones de Cd y Zn correspondientes al nivel 0 (*natural content*). El Mg se encontró en menor proporción en ES con respecto a CS (Tabla 5), no obstante, su contenido al igual que otros elementos como N, P, K y Ca, se encontró en ambos suelos por encima de los requerimientos nutricionales óptimos para plántulas de cacao de seis meses de edad (Tabla S3) (Crespo & Crespo, 1997).

2.5.2 Nutrición y acumulación de Cd y Zn en la planta

La presencia de Cd y altas concentraciones de Zn alteran la toma y la acumulación de nutrientes minerales en las plantas (Reichman, 2002; Luo *et al.*, 2016). En este estudio se encontró que a pesar de la alta concentración de Cd encontrada en el suelo (Tabla 5), la concentración de Cd en las hojas de ES-IMC67 y ES-PA121 está 0.8 veces por debajo del CTC (300 mg kg⁻¹ Cd) reportado para cacao por Jacome & Rodriguez (2017) (Tabla 6). La disminución en la toma de Cd por la planta puede deberse al incremento en la concentración de otros metales como el Zn que compiten por su ingreso (Murtaza *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017), ya que la entrada de Cd se da principalmente a través de transportadores de Zn (Song *et al.*, 2017b), que tienen una mayor afinidad por el Zn cuando la relación Zn/Cd en el suelo es alta (Papoyan *et al.*, 2007; Topperwien *et al.*, 2007; Rizwan *et al.*, 2019), como se encontró en este estudio (Tabla 5).

La concentración de Zn en hojas y raíz-tallo en ES-IMC67 y ES-PA121 (Tabla 6, Fig. 9) se encontró hasta 2.2 veces por encima del CTC (360 mg kg⁻¹ Zn) reportado para cacao (Cruz *et al.*, 2015). Concentraciones altas de Zn pueden generar toxicidad debido a la inhibición de procesos metabólicos que causan retardos en el crecimiento e inducen la senescencia (Reichman, 2002; Nagajyoti *et al.*, 2010). El incremento en la acumulación de Zn y Cd en las hojas se correlacionó positivamente ($r^2=0.84$) (Tabla S4), semejante a lo reportado en *Thlaspi caerulescens*, una planta hiperacumuladora (Papoyan *et al.*, 2007). Por otra parte, el contenido de Mn foliar se incrementó en ambos genotipos en ES (Tabla 6), y aunque no se encontraron diferencias significativas entre genotipos, ES-IMC67 acumuló 27% más Mn que ES-PA121. En otros estudios, incrementos en la toma de este elemento sugieren que el Mn puede estar asociado a mecanismos de tolerancia debido a que esté puede restaurar parcialmente la estructura de los cloroplastos afectados por el desplazamiento del Mg²⁺ en la molécula de al clorofila por MPs (Sarwar *et al.*, 2010).

En este estudio también se observó menor contenido de Mg en hojas de ES-IMC67 (45%) y ES-PA121 (42%) con respecto a CS-IMC67 y CS-PA121 (Tabla 6). Se ha reportado que altas niveles de Zn y Cd pueden inducir deficiencias de Mg como resultado de la competencia del ingreso de cationes a nivel de las proteínas transportadores (Nagajyoti *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2015) o por limitaciones en el transporte a través del floema

(Reichman, 2002). En cacao se encontró una relación inversa entre el Cd y Mg ($r^2 = -0.96$) y entre el Zn y el Mg ($r^2 = -0.79$) (Tabla S4). La competencia entre estos dos elementos por su ingreso podría explicar el bajo contenido de Mg encontrado en ES-IMC67 y ES-PA121, ya que a pesar de que la concentración de Mg en el suelo se encontraba por encima de los requerimientos nutricionales de plántulas de cacao (Crespo & Crespo, 1997), hubo menor acumulación de este elemento en sus hojas respecto a las concentraciones recomendadas para hojas de cacao ($4 - 9 \text{ g kg}^{-1}$) según Puentes-Páramo *et al.*, (2016). No obstante, otros factores no controlados en este estudio como las propiedades físico-químicas del suelo podrían modular la disponibilidad del Mg (Gransee & Führs, 2013), por lo que futuros experimentos deberían abordar el comportamiento del Mg en condiciones de estrés por Cd y Zn mediante sistemas de nutrición controlados como medios hidropónicos.

La acumulación de Ca se incrementó 155% en hojas de ES-PA121 con respecto a CS-PA121 (Tabla 6), estos resultados son semejantes a los reportados por Pereira de Araújo *et al.*, (2017) donde el genotipo de cacao CCN51 acumuló 65% más Ca cuando fue crecido en un suelo contaminado con 50 mg kg^{-1} Cd. El incremento en la toma de Ca por PA121 en presencia de altas concentraciones de Cd y Zn es una respuesta dependiente del genotipo y puede estar asociado a un mecanismo de tolerancia. Varios autores sugieren que la formación de cristales de oxalatos de calcio puede ser un mecanismo de detoxificación de MPs (Choi & Harada, 2005; Franceschi & Nakata, 2005).

2.5.3 Distribución de Cd y Zn en tejidos

Las plantas no hiperacumuladoras tienden a almacenar los MP en las raíces como mecanismo de exclusión de la parte aérea, probablemente por la alta sensibilidad de su metabolismo fotosintético a la presencia de MPs (Reichman, 2002). Sin embargo, en IMC67-ES y PA121-ES se observó una mayor acumulación de Cd y Zn en el tejido foliar con respecto a la raíz y al tallo (Fig. 9). Este patrón de distribución es semejante al observado en plantas hiperacumuladoras de Cd (Choppala *et al.*, 2014) y Zn (Lasat *et al.*, 1998), las cuales poseen una mayor habilidad de transportar, acumular y redistribuir los MPs en los tejidos aéreos y así reducir la toxicidad en sus tejidos de raíz (Kramer, 2010; Luo *et al.*, 2016). En cacao se ha reportado que no existen diferencias en la acumulación de Cd entre los órganos de la planta (Pereira de Araújo *et al.*, 2017), sin embargo en este estudio se encontró mayor acumulación del Cd y Zn en la parte aérea. Por lo tanto, este

es el primer reporte de este patrón de distribución de metales en cacao característica particular de especies hiperacumuladoras. No obstante, más estudios que caractericen los mecanismos involucrados en la toma, transporte y detoxificación de Cd y Zn (Kramer, 2010; Dalcorso *et al.*, 2013), son necesarios para establecer si el cacao es una especie perteneciente a esta clasificación.

2.5.4 Verdor de la hoja

Síntomas visibles como cambios en el color de las hojas son característicos de diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos (Shabala, 2017), entre ellos algunos desórdenes nutricionales producto de la deficiencia o toxicidad por ciertos elementos (Römheld, 2011). Aquí se observó una reducción significativa en el verdor de las hojas en los dos genotipos en ES, siendo más marcada en las hojas jóvenes. La clorosis observada puede estar asociada a los altos niveles de Zn que acumularon las hojas en el ES (Figura 9b). Se ha reportado que cuando el Cd y el Zn se encuentran en exceso y la planta no tiene la capacidad de redistribuirlos, éstos se acumulan principalmente en hojas fotosintéticamente activas (Page & Feller, 2015). Este exceso de metales pueden inducir clorosis debido a reducción en el contenido de clorofilas por estrés oxidativo (Hossain *et al.*, 2012), reducción de la capacidad antioxidante (Dalcorso *et al.*, 2013; Rizwan *et al.*, 2017) e inhibición de enzimas que participan en su síntesis (Seregin & Ivanov, 2000). También se ha reportado que el Cd y el Zn debido a su similitud química puede competir con los sitios de unión de proteínas transportadoras e interferir con la toma y transporte de nutrientes como el Mg (Küpper & Andresen, 2016). En este estudio se encontraron niveles de Mg foliar por debajo de las concentraciones recomendadas para cacao (Puentes-Páramo *et al.*, 2016), por lo que la clorosis intervenal observada en hojas del tercio medio de IMC67-ES y PA121-ES puede estar asociada a deficiencias de este elemento (Figura 10d).

2.5.5 Fluorescencia de la clorofila a

El Zn y Cd son metales que pueden sustituir y desplazar iones metal en el centro activo de proteínas y moléculas importantes de la fotosíntesis como la RuBisCo (Viehweger, 2014), el complejo que media la fotólisis del agua (Teige *et al.*, 1990) y las clorofilas (Küpper *et al.*, 1996). Por lo que las disminuciones en el qP, ETR y F_v/F_m en ES-IMC67 y ES-PA121

(Fig. 11) pueden ser el resultado del daño del PSII causado por el estrés oxidativo (Küpper *et al.*, 1996; Küpper & Andresen, 2016). El NPQ se incrementó en ES-IMC67 y ES-PA121 a los 98DDS como mecanismo de disipación de energía (Fig. 11d). No obstante, a los 133 DAS el NPQ se redujo en ambos genotipos, probablemente debido a que se sobrepasó la capacidad de disipación por este mecanismo. La disminución en F_v/F_m en ES-PA121 fue moderada, mientras que en ES-IMC67 fue leve a los 133 DAS (Fig. 11a), por lo que IMC67 puede ser un genotipo menos susceptible que PA121 a la presencia de altas concentraciones de Cd y Zn. Estos resultados indican que el Cd y el Zn pueden afectar la eficiencia fotosintética de plantas de cacao, sin embargo más estudios mediante metodologías como las pruebas JIP, permitirían identificar los efectos nocivos específicos de estos MPs sobre las reacciones fotosintéticas primarias y los flujos de energía que ocurren entre los complejos de pigmentos fotosintéticos en el PSII (Paunov *et al.*, 2018)

2.5.6 Crecimiento

El crecimiento de plantas de cacao en un suelo enriquecido con Cd y Zn se vio marcadamente reducido en los dos genotipos comparado con plantas crecidas en un suelo con bajas concentraciones de estos metales (Fig. 12). La disminución en la TMP, el LA y el LN en ES-IMC67 y ES-PA121 pueden deberse a la acumulación de altas concentraciones de metales en los diferentes órganos de la planta (Fig. 9) que interfieren en procesos fisiológicos como la toma de nutrientes (Tabla 6), la disminución en el contenido de pigmentos (Fig. 10) y la reducción en la eficiencia fotosintética de la planta (Fig. 11). No obstante, otros aspectos no evaluados en este estudio, pero que han sido reportados como efectos importantes por la toxicidad por Cd y Zn, como el incremento en la especies reactivas de oxígeno (Hossain *et al.*, 2012), la reducción de la actividad antioxidante (Küpper & Andresen, 2016), los cambios en la homeostasis hormonal (Jalmi *et al.*, 2018) y el desplazamiento de iones esenciales en diferentes proteínas (Viehweger, 2014), entre otros, podrían estar involucrados en la reducción en el crecimiento observada.

En este estudio no fue posible determinar los efectos individuales del Cd y el Zn sobre los diferentes parámetros evaluados, sin embargo, los efectos descritos en los dos genotipos pueden deberse principalmente a las altas concentraciones de Zn encontradas en los tejidos ($>360 \text{ mg Zn kg}^{-1}$), ya que a pesar de que la concentración de Cd en los diferentes órganos de la planta fue alta (Tabla 6), esta se encontró por debajo del CTC (Jacome & Rodriguez, 2017). Por otra parte, se encontraron diferencias en la susceptibilidad a altas

concentraciones de Cd y Zn entre los genotipos en variables como el verdor (Fig. 10) y la eficiencia fotosintética (Fig. 11a), no obstante, el crecimiento de ambos genotipos en ES resultó en la disminución de su crecimiento. Esto puede deberse a que IMC67 y PA121 pertenecen a grupos genéticos cercanos (Motamayor *et al.*, 2008), por lo que en futuras investigaciones se podría considerar la evaluación de genotipos pertenecientes a grupos genéticos distantes con el fin de explorar la variabilidad genética del cacao y su respuesta a estos MPs.

2.6 Conclusiones

En condiciones naturales pueden presentarse suelos enriquecidos con concentraciones simultáneamente altas de Cd y Zn que pueden afectar la fisiología de plantas de cacao en la etapa de vivero. En este estudio se encontró que una alta relación Zn/Cd en el suelo limitó la toma de Cd e incrementó la toma de Zn por las plantas de cacao, encontrándose únicamente este último en concentraciones superiores al CTC en todos los tejidos. Este trabajo presenta una primera aproximación de los efectos nocivos del Cd y el Zn sobre la toma de Mg, la eficiencia fotosintética, el contenido de pigmentos y el crecimiento de cacao, aunque se destaca la presencia de diferencias en la susceptibilidad entre genotipos. El cacao demostró la habilidad de tomar y acumular altas concentraciones de estos MPs en hojas como ocurre en otras especies hiperacumuladoras, sin embargo, más estudios son requeridos para identificar los mecanismos involucrados en el transporte y detoxificación del Cd y el Zn en esta especie.

2.7 Bibliografía

- Arévalo-gardini, E., Arévalo-hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 606, 792–800.
- Carrillo, I., Mejía, B., & Franco, H. (1994). *Manual de laboratorio para análisis foliares*. Chinchiná, Colombia: CENICAFE.
- Chaux, M. A., & Pérez, M. A. (2017). *¿Nuevos caminos para los cacaos especiales de Colombia? Una experiencia desde el proyecto Coexca 2012 - 2017*. Bogotá, Colombia: Fundación Swisscontact Colombia.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>

- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Choi, Y. E., & Harada, E. (2005). Roles of calcium and cadmium on Cd-containing intra- and extracellular formation of Ca crystals in tobacco. *Journal of Plant Biology*, 48(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/BF03030570>
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., ... Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(5), 374–391. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.903747>
- Crespo, del C. E., & Crespo, A. (1997). *Cultivo y Beneficio del cacao CCN51*. Quito: El Conejo.
- Cruz Neto, R. de O., Souza Júnior, J. O., Sodr e, G. A., & Baligar, V. C. (2015). Growth and Nutrition of Cacao Seedlings Influenced By Zinc Application in Soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4), 1053–1064. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-238/14>
- Dalcorsio, G., Manara, A., & Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. *Metallomics*, 5(June), 1117–1132. <https://doi.org/10.1039/c3mt00038a>
- Edelstein, M., & Ben-Hur, M. (2018). Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 234(June 2017), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Fedecacao. (2015). *Guía técnica para el cultivo del Cacao* (Sexta edic, Vol. 6). Bogotá, Colombia.
- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Gómez, J., Nivia,  ., Montes, N. E., Almanza, M. F., Alcárcel, F. A., & Madrid, C. A. (2015). *Compilando la geología de Colombia: Una visión a 2015*. Imprenta Nacional de Colombia.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Gransee, A., & F hrs, H. (2013). Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant and Soil*, 368(1–2), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1567-y>
- Hafeez, B., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2), 374–391. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2013/2746>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2018). *Plants under metal and metalloid stress: Responses, tolerance and remediation*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2242-6>
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., & Baligar, V. C. (2015). *Soil Biogeochemistry, Plant Physiology, and Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils*. *Advances in Agronomy* (Vol. 134). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
- He, S., Yang, X., Zhenli, H., & Virupax, B. (2017). Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review. *Pedosphere*, 27(3), 421–438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, 19, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, 2012(Cd), 1–37. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>

- IGAC. (2000). *Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca*. Bogotá, Colombia: CARTOPRINT Ltda.
- Jacome, D., & Rodriguez, A. (2017). Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) sobre un sistema suelo-planta en suelos contaminados con cadmio en etapa de vivero. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., & Tayyeba, S. (2018). Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling, 9(February), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Kaur, H., & Garg, N. (2018). Recent Perspectives on Cross Talk Between Cadmium, Zinc, and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 680–693. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9750-2>
- Kramer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 4(8), 269–285. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
- Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 259–266. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.259>
- Lasat, M. M., Baker, A. J. M., & Kochian, L. V. (1998). Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 118(3), 875–883. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.875>
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Lin, Y. F., & Aarts, M. G. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3187–3206. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1089-z>
- Lora Silva, R., & Bonilla Gutiérrez, H. (2010). Remediation of a Soil Contaminated With the Heavy Metals Cadmium and Chromium on the High Basin of the Bogota River. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 61–70. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Luo, Z. Bin, He, J., Polle, A., & Rennenberg, H. (2016). Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1131–1148. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.07.003>
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., & White, P. J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
- Millaleo, R., Reyes- Diaz, M., Ivanov, A. ., Mora, M. ., & Alberdi, M. (2010). Manganese As Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 470–481. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
- Molina, E. (1999). *Acidez y encalado de los suelos*.
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Looor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Murtaza, G., Javed, W., Hussain, A., Qadir, M., & Aslam, M. (2017). Soil-applied zinc and copper suppress cadmium uptake and improve the performance of cereals and legumes.

- International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 199–206. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207605>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
 - Nazar, R., Iqbal, N., Massod, A., Iqbal, M., Khan, R., Syeed, S., & Khan, N. (2012). Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 03(10), 1476–1489. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178>
 - Olade, M. A. (1987). Dispersion of Cadmium, Lead and Zinc in Soils and Sediments of a Humid Tropical Ecosystem in Nigeria. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment* (pp. 303–313). John Wiley and Sons Ltd.
 - Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy*, 5(3), 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
 - Papoyan, A., Piñeros, M., & Kochian, L. V. (2007). Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02073.x>
 - Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. (2018). Effects of different metals on photosynthesis: Cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
 - Pereira de Araújo, R., Furtado de Almeida, A. A., Silva Pereira, L., Mangabeira, P. A. O., Olimpio Souza, J., Pirovani, C. P., ... Baligar, V. C. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144(January), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
 - Puentes-Páramo, Y. ., Menjivar-Flores, J. C., & Aranzazy-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnostico nutricional en cacao. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 329–336.
 - Puentes-Páramo, Y., Menjivar-Flores, J., & Aranzazu-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnóstico nutricional en cacao. *Mesoamerican Agronomy*, 27(2), 329–336.
 - Reichman, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Environment*. Retrieved from http://www.plantstress.com/articles/toxicity_i/Metal_toxicity.pdf
 - Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Ibrahim, M., Tsang, D. C. W., Zia-ur-Rehman, M., ... Ok, Y. S. (2017). A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*, 182, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.013>
 - Rizwan, M., Ali, S., Zia, M., & Maqbool, A. (2019). A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-019-04174-6>
 - Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>
 - Rodríguez, S., & Henao, M. C. (2017). *Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca*.
 - Römheld, V. (2011). Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Nutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 299–312). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00011-X>
 - Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S. S., Zia, M. H., Naeem, A., Bibia, S., & Farida, G. (2010). Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(6), 925–937. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3916>
 - Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2000). Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic

Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4), 523–544. <https://doi.org/10.1023/A>

- Shabala, S. (2017). *Plant stress physiology*. (S. Shabala, Ed.) (2nd Editio). London, UK: CPI Group (UK) Ltd. <https://doi.org/10.1079/9781780647296.0253>
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2016). Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere*, 26(2), 148–166. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60032-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60032-7)
- Siebielec, G., Smreczak, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Maliszewska-kordybach, B., Terelak, H., Koza, P., ... Suszek, B. (2012). *Monitoring of soil chemistry in Poland 2010-2012*. Pulawy: IUNG PIB. <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.4.455>
- Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Souza, V. L., de Almeida, A. A. F., de S. Souza, J., Mangabeira, P. A. O., de Jesus, R. M., Pirovani, C. P., ... Loguercio, L. L. (2014). Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1217–1230. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1983-4>
- Suresh, S. (2005). Characteristics of Soils Prone To Iron Toxicity and Management - a Review, 26(1), 50–58.
- Teige, M., Huchzermeyer, B., & Schultz, G. (1990). Inhibition of Chloroplast ATPsynthase/ATPase Is a Primary Effect of Heavy Metal Toxicity in Spinach Plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186(3), 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(96\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(96)80003-5)
- Topperwien, S., Behra, R., & Sigg, L. (2007). Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(3), 483–490. [https://doi.org/10.1016/0010-4361\(88\)90728-8](https://doi.org/10.1016/0010-4361(88)90728-8)
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Zug, K. L. M., Huamaní Yupanqui, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3), 72. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>

3. Capítulo III: Efecto de comunidades locales de HFMA sobre la fisiología de dos genotipos de cacao crecidos en suelo enriquecido naturalmente con Cd y Zn

3.1 Resumen

La inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) es una estrategia empleada para reducir la toma y acumulación de metales pesados como cadmio (Cd) y zinc (Zn) en varias plantas; no obstante, esta respuesta benéfica es dependiente de factores como el genotipo de la planta e inóculo de HFMA. Este estudio determinó el efecto de comunidades locales de HFMA extraídas de suelos con baja (ML) y alta (MH) concentración de Cd-Zn sobre la fisiología de dos genotipos de cacao crecidos en un suelo naturalmente enriquecido (ES) con $26 \text{ mg kg}^{-1}\text{Cd}$ y $218 \text{ mg kg}^{-1}\text{Zn}$. Plantas de cinco meses (IMC67 y CAU43, ambos injertados con FSV41) se inocularon con cuatro tratamientos de HFMA (Control, ML, MH o MC: producto comercial) en el momento del trasplante a ES. Cinco meses después de tratamientos se encontró que los dos genotipos acumularon Cd y Zn mayormente en la copa independiente del tratamiento. La alta relación Zn/Cd en ES (8,5) afectó la toma de estos metales por las plantas, encontrando en la copa concentraciones de Cd por debajo (0,4 veces) y de Zn por encima (2,4 veces) del umbral de toxicidad reportado para cacao. Sin embargo, no se presentaron síntomas de clorosis o reducciones en el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m). La inoculación con HFMA incrementó su colonización y generó efectos en la fisiología de las plantas dependiendo del genotipo. MC incremento en un 24% la biomasa total de IMC67, mientras que MH, ML y MC generó reducciones de hasta un 32% en los niveles de Cd presentes en las hojas de CAU43. Este trabajo destaca la importancia de la interacción genotipo del hospedero-HFMA como factor clave para determinar el tipo de respuesta fisiológica de cacao en suelos enriquecidos con Cd y Zn.

Palabras clave: injertación, IMC67/CAU43, metales pesados, mitigación, micorrizas arbusculares, relación Zn/Cd

3.2 Introducción

El cadmio (Cd) y el zinc (Zn) son metales pesados (MPs) que comparten una naturaleza química similar (Kaur & Garg, 2018) y pueden encontrarse en los suelos simultáneamente bajo condiciones naturales (Kabata-Pendias & Barbara, 2015), ya que estos son liberados durante procesos de meteorización de materiales sedimentarios enriquecidos con estos MPs (Olade, 1987). La presencia de Cd y altas concentraciones de Zn en el suelo representan un riesgo para las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2018), ya que pueden generar diferentes efectos nocivos en ellas, como deficiencias nutricionales (Luo *et al.*, 2016), formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jalmi *et al.*, 2018), reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos (Nagajyoti *et al.*, 2010) y disturbios en otros procesos fisiológicos que conllevan a reducciones en el crecimiento de las plantas (Hossain *et al.*, 2012).

El cacao es una planta que tiene alta capacidad para extraer, transportar y acumular Cd (Rodríguez *et al.*, 2019) y Zn en sus tejidos (Sandoval *et al.*, en prensa), por lo que la probabilidad de encontrar trazas de estos en sus granos aumenta con el establecimiento de cultivos en suelos con disponibilidad de estos metales como ha sido reportado en varios países productores de América (Lanza *et al.*, 2016; Arévalo-gardini *et al.*, 2017; Barraza *et al.*, 2017), entre ellos Colombia (Bravo *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2019). El cacao colombiano se ha destacado internacionalmente por su potencial para la producción de granos con características finas de sabor y aroma (Chaux & Pérez, 2017); sin embargo, la entrada en rigor de la norma CX/CF15/9/6, que regula los niveles de Cd en productos derivados del cacao comercializados a países europeos (FAO & OMS, 2014), podría limitar sus oportunidades de exportación. Por esta razón, la búsqueda de alternativas que reduzcan la acumulación de Cd en el grano es necesaria para evitar riesgos en los consumidores (Jiménez, 2015).

La inoculación con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) es una estrategia utilizada para mejorar el rendimiento de los cultivos y disminuir la toma de MPs

por las plantas (Cabral *et al.*, 2015). Estos hongos utilizan diferentes mecanismos para limitar los efectos tóxicos de los MPs como: incrementar el crecimiento de las plantas (Kaur & Garg, 2018), inmovilizar los MPs en la pared celular de sus hifas (Khan, 2006), secuestrar y acumular los MPs en la vacuola (González-Chávez *et al.*, 2004), exudar compuestos químicos para aumentar el pH del suelo (Wu *et al.* 2016), y otros citados por Meier *et al.*,(2012). No obstante, respuestas controversiales como incrementos y/o reducciones en la toma de MPs por las plantas después de inocularlas con HFMA, sugieren que esta interacción es altamente compleja y depende de varios factores como la concentración y tipo de MPs (Audet & Charest, 2007), el genotipo de la planta (Meier *et al.*, 2012), la especie (He *et al.*, 2014) y capacidad de aclimatación del HFMA (Bui & Franken, 2018).

Los HFMA han sido reportados en suelos contaminados con MPs (Zarei *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2011; Krishnamoorthy *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, en prensa), por lo que su persistencia es un indicador de su tolerancia e importancia en la fitorremediación de estos suelos (Khan *et al.*, 2000). Diversas respuestas de aclimatación de los HFMA a un estrés por MPs no solo mejoran su habilidad de supervivencia, sino también pueden beneficiar a las plantas hospederas sometidas al mismo estrés (Bhalerao, 2013; Bui & Franken, 2018), reduciendo de esta forma la fitotoxicidad (Hildebrandt *et al.*, 2007; Cabral *et al.*, 2015; Millar & Bennett, 2016). Recientemente, Bui & Franken, (2018) demostraron que es posible aclimatar una sepa de *Rhizophagus irregularis* a altas concentraciones de Zn en condiciones *in vitro* y que esta sepa confirió una reducción en la toma de este metal en plantas de maíz bajo el mismo estrés. No obstante, diversos efectos benéficos de estos microorganismos pueden estar asociado no solo a la introducción de una especie de HFMA, sino a la función de su comunidad (Rodríguez & Sanders, 2014); ya que existen diferencias en la retención y secuestro de MPs entre especies de HMFA (Pagano *et al.*, 2010; Nayuki *et al.*, 2014).

Otro aspecto importante a considerar en la simbiosis de las plantas de cacao con HFMA son las variaciones genéticas que existen entre genotipos de estos hongos y de las plantas (Rodríguez & Sanders, 2014). En diferentes cultivos como arveja (Rivera-Becerril *et al.*, 2002), trigo (Sharma *et al.*, 2016) y pasto (Sun *et al.*, 2018) se han reportado respuestas diferenciales en la toma de MPs entre distintos genotipos inoculados con HFMA. Esto indica que existen interacciones genotipo dependientes con los HFMA que pueden incidir en el tipo de respuesta de las plantas (Rodríguez & Sanders, 2014) y que el entendimiento de estas interacciones es necesario para direccionar el tipo de respuesta esperada. El

cacao es una especie altamente dependiente de la asociación con HFMA (Laycock, 1945), sin embargo, a la fecha no hay estudios que evalúen la respuesta de los genotipos de cacao usados para patronaje en Colombia (IMC67 y CAU43) en asocio con HFMA locales los cuales podrían tener un efecto benéfico sobre su fitotoxicidad en suelos con MPs.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de comunidades de HFMA locales sobre parámetros fisiológicos y acumulación de metales en dos genotipos de cacao crecidos en suelos naturalmente enriquecidos con Cd y Zn. Los resultados de esta investigación destacan la importancia de las interacciones genotipo-HFMA como uno de los factores que determinan la respuesta fisiológica en plantas de cacao sometidas a esta condición natural de estrés.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Material vegetal

El material vegetal se obtuvo de la colección de trabajo del vivero Agrocacao de Santander en el municipio de Cimitarra, Colombia (200 m.s.n.m.). Semillas de los genotipos IMC67 y CAU43 se utilizaron como patrón y se sembraron individualmente en bolsas de plástico de 2 L de capacidad siguiendo la metodología utilizada por el proveedor. A los 115 días después de siembra (DDS) las plantas de ambos genotipos se injertaron mediante la técnica de “injerto por aproximación” (Rodríguez *et al.*, 2015) con el genotipo FSV41 utilizado como copa. Las plantas se crecieron en condiciones de vivero hasta que presentaron seis hojas totalmente expandidas (133 DDS) y luego se transportaron a las condiciones semi-controladas en Yacopí, Colombia (5° 27' 09"N, 74° 20' 16"W) a 1350 m.s.n.m. donde se llevó a cabo el experimento. Las condiciones climáticas durante el ensayo fueron: temperatura media 22.5 ± 4.5 °C, humedad relativa promedio $83 \pm 5\%$, sombrero del 50% y precipitación promedio anual 2533 mm. Se aplicó riego cada cuatro días cuando se presentó ausencia de lluvias por un periodo mayor a una semana y el manejo agronómico de plagas y enfermedades se realizó de acuerdo a Fedecacao (2015).

3.3.2 Origen del suelo

Se utilizó suelo proveniente de una localidad del municipio de Yacopí, Colombia, caracterizada por su alto contenido de Cd y Zn (Rodríguez *et al.*, 2019). Una tonelada de este suelo naturalmente enriquecido con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn (ES) se tomó a 30 cm de profundidad del perfil y se tamizó por malla de 2 cm. Se analizaron cuatro muestras de suelo para determinar sus propiedades fisicoquímicas; con base en estos resultados (Tabla S7) y a los requerimientos nutricionales de plantas de cacao (Crespo & Crespo, 1997), se realizó la fertilización edáfica previa al trasplante (50 g planta⁻¹ de 16-6-18-2 (Remital®)). Con el fin de simular las condiciones de campo el suelo no se esterilizó.

3.3.3 Inóculos de HFMA

Inóculos provenientes de suelos con bajas (ML) y altas (MH) concentraciones de Cd se multiplicaron mediante el uso de plantas trampa de cebolla acorde a Sandoval *et al.*, (En prensa). El inóculo (suelo rizosférico) se molió junto con las raíces de cebolla y se tamizó (0,5 cm) para su posterior uso. Se utilizó un control negativo (Control) correspondiente al sustrato utilizado para la multiplicación de esporas (suelo:arena 1:1 (p/p), autoclavado tres veces: 110°C, 45 min) y un inóculo comercial (MC) compuesto por un consorcio de seis especies comunes de HFMA (Safer Agrobiológicos®, Colombia). Los inóculos se cuantificaron antes de su aplicación según Brundrett *et al.*, (1984) (Fig. S3).

3.3.4 Establecimiento del experimento

Posterior a un periodo de aclimatación de 48 días (181 DDS) a las condiciones semi-controladas de Yacopí, las plantas injertadas se trasplantaron a bolsas de plástico de 12 L con el ES e inoculadas con el respectivo tratamiento de HFMA (adición de 6000 esporas de HFMA de ML, MH, MC o 100 g del Control). Se estableció un diseño experimental factorial en arreglo completamente al azar usando como factores el genotipo del patrón (IMC67 y CAU43) y la inoculación con HFMA (Control, ML, MH y MC) para un total de ocho tratamientos cada uno con siete repeticiones y una unidad experimental de una planta.

3.3.5 Porcentaje de colonización

Muestras de raíces jóvenes (2 mm) de cada planta se recolectaron en tubos eppendorf de 2 ml a los 154 días después de tratamiento (DDT). Las raíces se tiñeron mediante la

metodología modificada de Vierheilig *et al.*, (1998), las muestras previamente lavadas se sumergieron en una solución de KOH al 10% (p/v) y se calentaron en baño de María (90°C, 90 min). Estas se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 3% (v/v) (15°C, 90 min) y luego en una solución de tinta negra (Sheaffer SKRIP®):CH₃COOH 5:100 (v/v) (20 h, 4°C); posteriormente, se desechó la solución y se lavó con abundante agua hasta eliminar el exceso de tinta. Las raíces teñidas se sumergieron en solución de lacto-glicerol y se almacenaron en refrigeración (2-8°C) para evitar su deterioro hasta su cuantificación. El porcentaje de colonización se evaluó mediante visualización en estereoscopio mediante el método de intersección de la grilla (Giovannetti & Mosse, 1980).

3.3.6 Contenido de Zn y Cd en tejidos vegetales

El contenido de Cd se determinó a los 0 DDT para verificar las concentraciones en el patrón y la copa de las plantas antes de iniciar los tratamientos (<25 mg kg⁻¹ Cd y >250 mg kg⁻¹ Zn; Fig. S4) y a los 154 DDT se determinó la concentración de Zn y Cd en el patrón, el tallo y hojas de la copa. Las muestras de tejido se secaron (70°C, 72 h), molieron y tamizaron a través de un tamiz de nilón (0.2 mm) para realizar las determinaciones químicas. El tejido molido se calcinó a 650°C y se digirió en HCl para la determinación de Zn o en HCl:HNO₃ para determinación de Cd (Carrillo *et al.*, 1994). Las concentraciones de elementos se determinaron usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK) en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL).

3.3.7 Parámetros de crecimiento

Se realizó un muestreo destructivo a los 154 DDT, el material vegetal obtenido en campo se llevó al laboratorio de fisiología vegetal de la UNAL para realizar las determinaciones de crecimiento. El tejido vegetal total se deshidrató en un horno (70°C, 72 h) hasta alcanzar masa constante y se pesó en balanza analítica para determinar la biomasa total de la planta. El área foliar se determinó mediante análisis de fotografías con el software imageJ®. La longitud aérea y número de hojas se midieron a lo largo del experimento (0, 28, 62, 88, 119 y 154 DDT).

3.3.8 Fluorescencia de la clorofila a y verdor de las hojas

Mediciones del máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m) y verdor se realizaron en la segunda hoja totalmente expandida y fotosintéticamente activa a los 0, 28, 62, 88, 119 y 154 DDT. El verdor se determinó mediante un clorofilómetro (atLEAF+, FT Green LLC, USA) y el F_v/F_m se determinó mediante un fluorómetro modulado (MINI-PAM, Walz, Effeltrich, Germany), adaptando las hojas a la oscuridad durante 20 minutos y luego exponiéndolas a un pulso de luz con densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Jaimez *et al.*, 2018).

3.3.9 Análisis químicos de suelo

Se realizaron los análisis de propiedades fisicoquímicas (textura, pH, CICE, y contenido de CO, nitrógeno total (NT), P, K, Ca, Mg, Na, Acidez intercambiable, Cu, Fe, Mn Cd, y Zn) de las muestras de suelo para CS y ES a los 0 DDT y determinaciones de Zn, pH, Cd total (Cd-t) y Cd disponible (Cd-d) en cada unidad experimental a los 154 DDT. La textura se determinó por el método de Bouyoucus mediante dispersión en $(\text{NaPO}_3)_6$. El pH se determinó en suspensión suelo agua p:v (1:1). La capacidad de intercambio catiónica efectiva (CICE) se realizó por suma de cationes intercambiables. El Carbono orgánico (CO) por el método de analizador elemental. El contenido de P disponible se determinó por el método de Bray II. El contenido de K, Ca, Mg y Na intercambiables se extrajo con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M pH 7. La acidez intercambiable (AI) con KCl 1M, el contenido de Cu, Fe, Mn Cd-d, Zn disponibles con DTPA y el Cd-t se determinó por extracción ácida con HCl:HNO₃. La cuantificación de elementos se determinó usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK). Los análisis físico-químicos se realizaron en el Laboratorio de Aguas y de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNAL.

3.3.10 Factor traslocación y extracción de Cd y Zn

El factor de traslocación (TF) indica la eficiencia de una planta para translocar el metal desde su raíz hacia la parte aérea (Padmavathiamma & Li, 2007), este fue calculado mediante la fórmula $TF = C_{\text{shoot}}/C_{\text{root}}$, donde C_{shoot} y C_{root} son las concentraciones de metal pesado en la parte aérea y su raíz, respectivamente. La cantidad de metal extraído por la

totalidad de la planta (E) fue determinado mediante la sumatoria de la concentración de metal de cada órgano por su peso seco (Lin *et al.*, 2016).

3.3.11 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha < 0.05$), posterior a la revisión de supuestos de normalidad (Lilliefors: $p > 0.05$) y homogeneidad de varianzas (Fligner-Killeen: $p > 0.05$). Los datos se analizaron mediante el programa estadístico R 3.4.0.

3.4 Resultados

3.4.1 Colonización de la raíz

La colonización de la raíz por HFMA presentó diferencias significativas por la inoculación con los tratamientos de HFMA (Fig. 13). La inoculación con HFMA en IMC67 incrementó significativamente la colonización de la raíz en ML (57%), MH (52%) y MC (73%) con respecto a su control; en CAU43 la colonización se incrementó significativamente únicamente en MH (58%) y MC (72%) con respecto a su control. Los tratamientos ML, MH, MC no presentaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Estos resultados indican que la inoculación con los diferentes tratamientos de HFMA incrementaron la colonización de la raíz en los dos genotipos de cacao crecidos en ES.

3.4.2 Concentración de Cd y Zn en tejidos

La concentración de Cd y Zn presentó diferencias significativas por el tipo de tejido de la planta (Fig. 14). En general, la acumulación de Cd se encontró en mayor proporción en los tejidos de las hojas (85%) y del tallo de la copa (78%) con respecto a la encontrada en el patrón (Fig. 14b). De igual forma, la acumulación de Zn se presentó en mayor proporción en hojas (93%) y tallo (64%) con respecto al encontrado en los tejidos del patrón (Fig. 14d). Estos resultados indican que el Cd y el Zn se acumularon en mayor proporción en los tejidos de la copa, pero se pueden observar reducciones en la acumulación de Cd y Zn en hojas de CAU43 inoculadas con ML, MH y MC con respecto a su control (Fig. 14a y 14c).

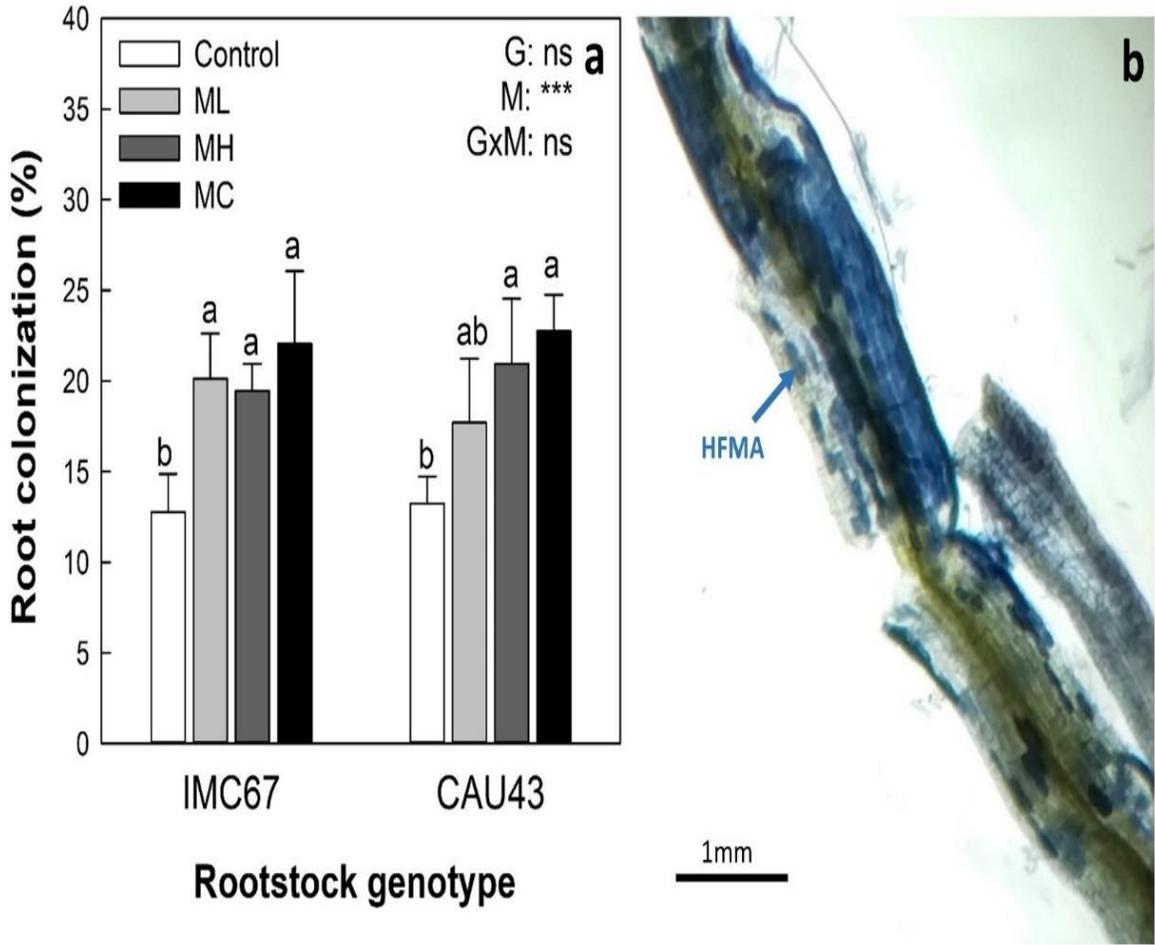


Figura 13. Colonización de la raíz en plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertadas con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT (a) y fotografía de raíz de cacao del genotipo CAU43 colonizada por HFMA a los 154 DDT (b). *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media ± SD (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a *p*<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

La inoculación con HFMA generó un efecto significativo sobre la acumulación de Cd y de Zn dependiendo de la parte de la planta evaluada y del genotipo de la planta (Fig. 15). En hojas de CAU43, solamente las plantas inoculadas con MC presentaron una acumulación de Cd significativamente menor (32%) con respecto a su control (Fig. 15a). En contraste, IMC67 no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con HFMA. En los tejidos del patrón de IMC67 se encontró una acumulación de Zn significativamente mayor en ML (37%) con respecto a su control (Fig. 15d); mientras que en CAU43 la inoculación con MH disminuyó (26%) la acumulación de Zn con respecto a su control.

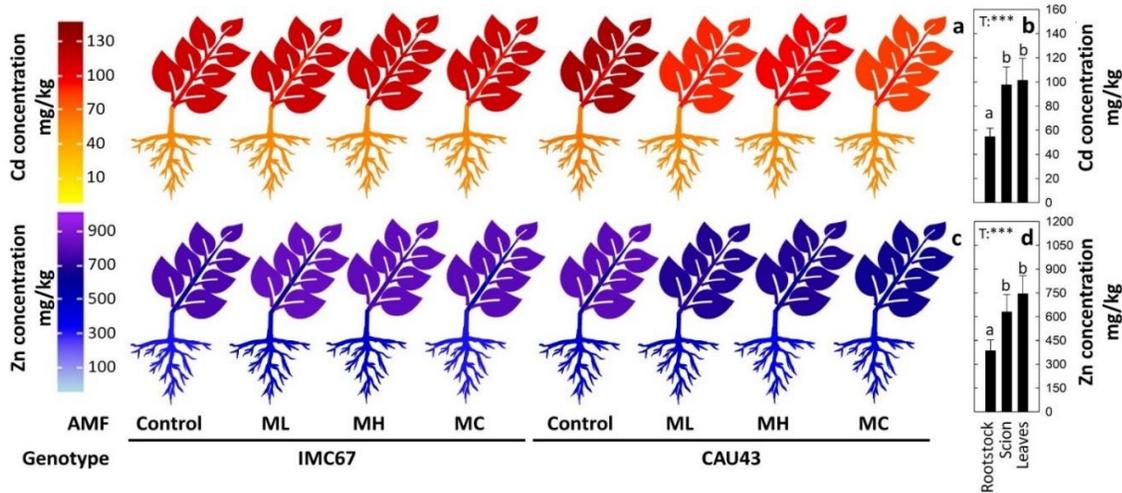


Figura 14. Acumulación de Cd (a,b) y Zn (c,d) en los diferentes partes de las plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg^{-1} Cd y 218 mg kg^{-1} Zn a los 154 DDT. Color en patrón, tallo de copa y hojas corresponde a la media de cuatro repeticiones. *P* valores del análisis de varianza son descritos por tipo de tejido (T). Las barras indican la media \pm SD ($n=4$). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p<0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

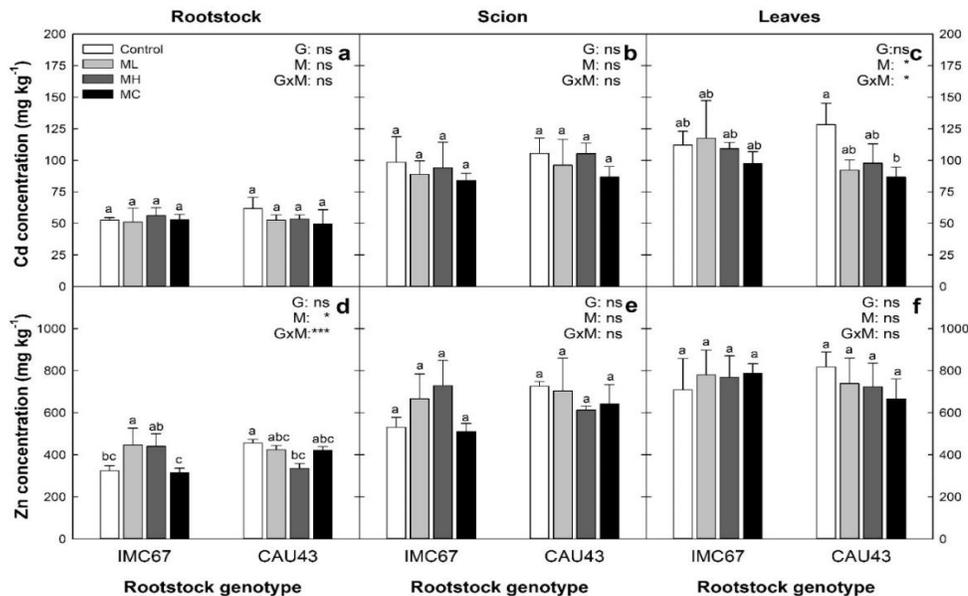


Figura 15. Acumulación de Zn (a, c, e) y Cd (b, d, f) en el patrón (a,d), tallo de copa (b, e) y las hojas (c,f) de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg^{-1} Cd y 218 mg kg^{-1} Zn a los 154 DDT. *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media \pm SD ($n=7$). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p<0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

3.4.3 Crecimiento, fluorescencia de la chl a y verdor

La acumulación de biomasa y el área foliar presentaron diferencias significativas por la interacción genotipo con los tratamientos de HFMA (Fig. 16). En IMC67 inoculado con MC se incrementó significativamente la biomasa total (31%) con respecto a su control (Fig. 16a), mientras que en CAU43 no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de HFMA. Con respecto al área foliar se encontró que en IMC67 se incrementó significativamente en ML (48%), MH (67%), y MC (66%) con respecto a su control, mientras que en CAU43 no se presentaron diferencias significativas en el área foliar para ninguno de los tratamientos de HFMA. Estos resultados indican que la inoculación HFMA generó un efecto dependiente del genotipo incrementando en IMC67 la biomasa con MC y el área foliar con ML, MH y MC.

Otros parámetros de crecimiento medidos a lo largo del experimento como la longitud aérea y número de hojas únicamente presentaron diferencias significativas por genotipo a los 154DDT, donde independiente del tratamiento con HFMA, IMC67 presentó mayor número de hojas (31%) y altura (17%) que CAU43 (Fig. S5). El verdor y máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F_v/F_m) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos y genotipos a lo largo del experimento (Fig. S6), y presentaron valores promedio de verdor y F_v/F_m de $42,0 \pm 7.4$ atLEAF units y $0,74 \pm 0,05$, respectivamente.

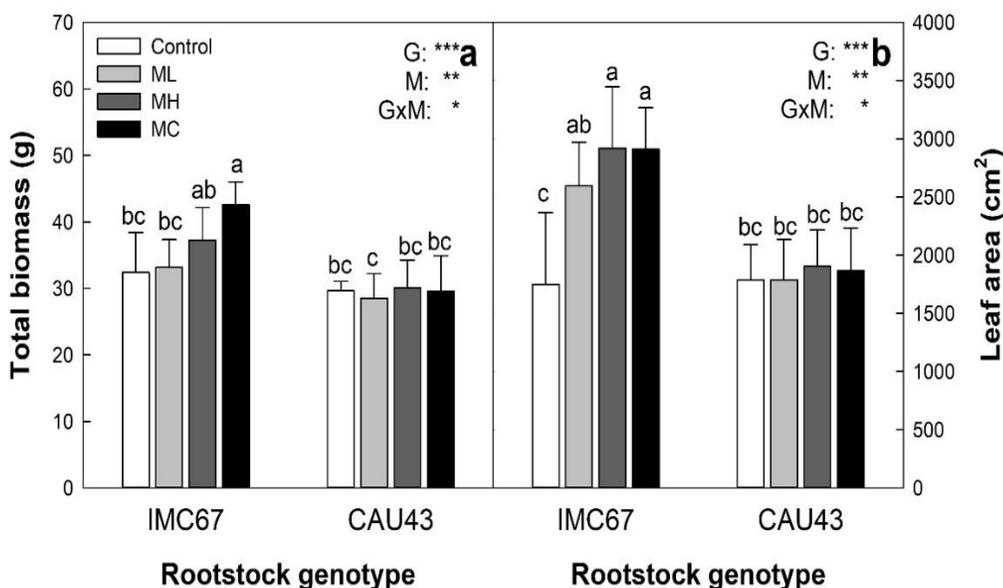


Figura 16. Biomasa total y área foliar de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un

suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media ± SE (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

3.4.4 Contenido de metales foliares con respecto a su biomasa

El contenido de Cd y Zn se correlacionó con la biomasa seca acumulada en las hojas en mayor o menor proporción dependiendo del genotipo (Fig. 17). En IMC67 la biomasa seca de la hoja se correlacionó negativamente con su concentración de Cd (-0.72**) y de Zn (-0.63**), mientras que en CAU43 esta correlación fue baja y no significativa para Cd (-0.40) y Zn (0.01). Mediante un análisis de regresión se encontró que para IMC67 un modelo lineal se ajustó en mejor proporción los contenidos de Cd ($R^2=0.51$) y Zn ($R^2=0.39$) con respecto a su biomasa foliar, mientras que en CAU43 el ajuste de este modelo fue menor para Cd ($R^2=0.15$) o casi nulo para Zn ($R^2=0.01$). Estos resultados sugieren la existencia de una relación inversa en el genotipo IMC67 entre la biomasa foliar y el contenido de Cd y Zn.

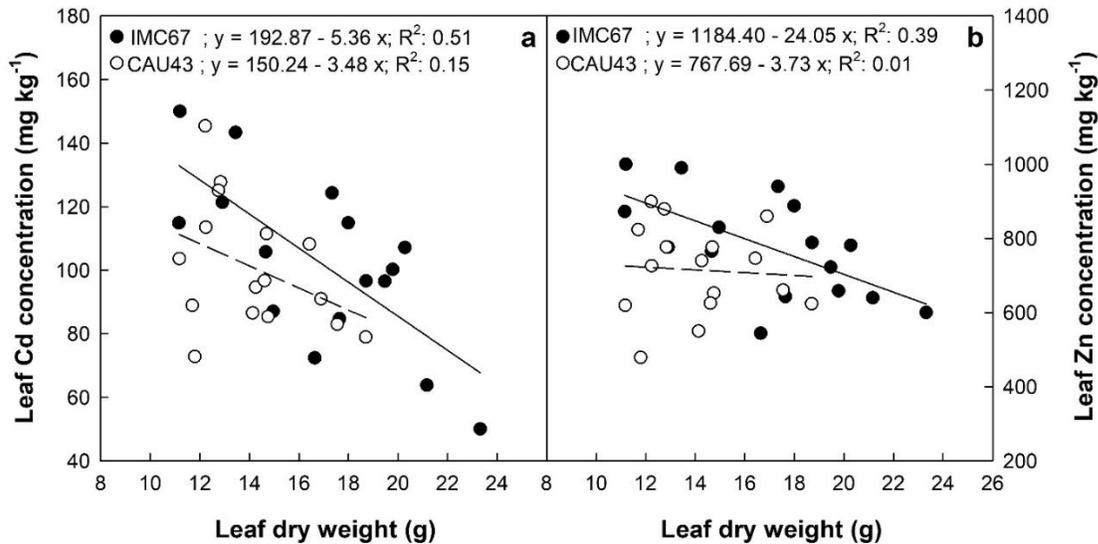


Figura 17. Relación entre el peso seco de las hojas con su concentración de Cd (a) y Zn (b) de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) crecidas en suelo enriquecido con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT.

3.4.5 Concentración de Cd y Zn en el suelo

La concentración de Cd y Zn disponible en el suelo a los 154 DDT presentó diferencias por la interacción genotipo con tratamientos de HFMA (Fig. 18). En IMC67 inoculado con MC

se presentó una menor concentración de Cd disponible (15%) con respecto a su control (Fig. 18a); mientras que en CAU43, bajo ML se detectó mayor concentración de Cd (10%) con respecto a su control. Con respecto a la concentración de Zn, en IMC67 inoculado con MC presentó una menor concentración (15%) con respecto a su control (Fig. 18b). Estos resultados indican que la concentración de Cd y Zn disponible en el suelo a los 154DDT fue menor en IMC67 con el tratamiento MC, mientras que en el genotipo CAU43 con ML presentó mayor concentración de Cd disponible en el suelo.

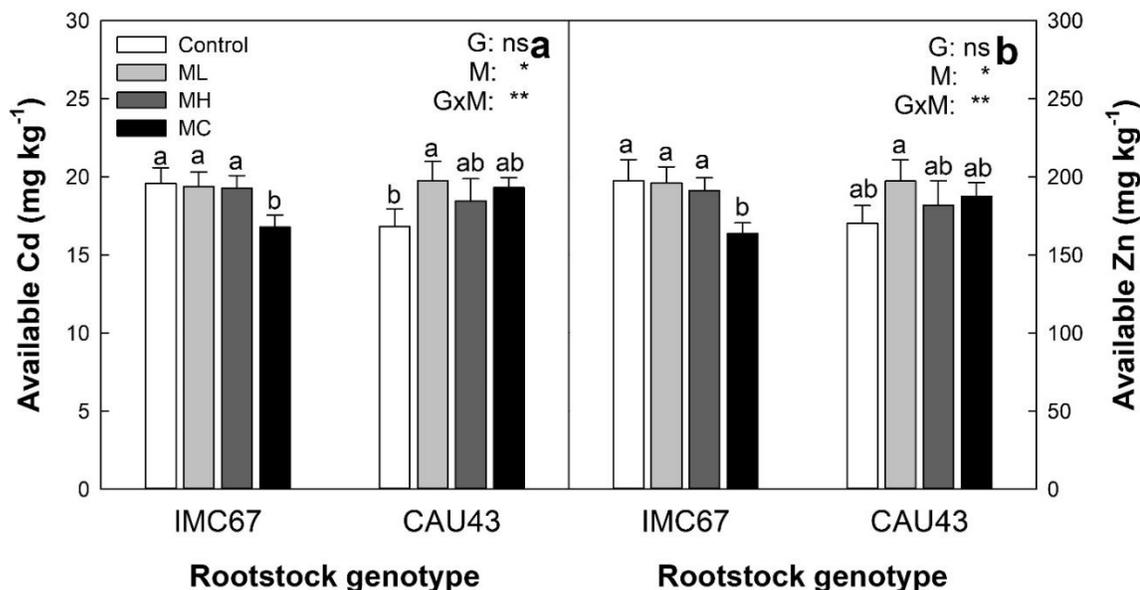


Figura 18. Disponibilidad de Cd (a) y Zn (b) en el suelo con plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media \pm SE ($n=4$). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p<0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

3.4.6 Factor de traslocación y extracción de Cd y Zn

El TF de Zn presentó diferencias significativas únicamente por el tratamiento con HFMA (Tabla S8), encontrando que MC presentó mayor TF (31%) que el ML (1.69), mientras que el TF de Cd no presentó diferencias significativas entre tratamientos con valores promedio de 1.8 ± 0.27 . Por otra parte, la extracción de Cd y Zn por planta presentó diferencias significativas únicamente por genotipo, donde IMC67 presentó mayor extracción de Cd (17%) y Zn (18%) con respecto a CAU43 (2.63 mg Cd planta⁻¹ y 18.59 mg Zn planta⁻¹, respectivamente).

Estos resultados indican que MC incremento el TF de Zn y que IMC67 extrajo mayor cantidad de Cd y Zn por planta.

3.5 Discusión

El presente estudio evaluó por primera vez el efecto de comunidades locales de HFMA provenientes de ambientes con alta y baja concentración de Cd sobre la fisiología de dos genotipos de patronaje para cacao bajo estrés por Cd y Zn. A diferencia de otros estudios donde se esteriliza el sustrato y se adicionan de manera artificial los MPs a evaluar, en esta investigación se utilizó como sustrato un suelo naturalmente enriquecido con los MPs sin remover la comunidad local de HFMA presente para determinar la respuesta de plantas adultas en etapa post-vivero.

3.5.1 Presencia de suelos enriquecidos con Cd y Zn

Las altas concentraciones de MPs en el suelo como las encontradas en este estudio (26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn) pueden estar asociadas con las rocas sedimentarias tipo *black shales* de la región de Yacopí (IGAC, 2000). Se ha reportado que estas pueden contener hasta 200 mg kg⁻¹ Cd (He *et al.*, 2005) y 1500 mg kg⁻¹ Zn (Edelstein & Ben-Hur, 2018), por lo que suelos desarrollados a partir de este tipo de materiales pueden presentar un alto contenido de estos MPs. Otros elementos como Cu, Fe y Mn presentaron una concentración alta (Tabla S7); sin embargo, solo el Cd y el Zn se detectaron por encima de la concentración crítica tóxica (CTC) en suelos reportada para cacao (>6 mg kg⁻¹Cd y >33mg kg⁻¹Zn) (Cruz *et al.*, 2015; Jacome & Rodriguez, 2017). De acuerdo a la clasificación de umbrales para metales pesados en el suelo por Siebielec *et al.*, (2012), el ES presentó concentraciones de Cd correspondientes al nivel V (*very strong contamination*) y de Zn al nivel I (*elevated content*) los cuales puede conllevar a efectos nocivos en la fisiología de las plantas.

3.5.2 Colonización de la raíz

El cacao es considerado una planta altamente dependiente de la asociación con HFMA (Laycock, 1945), con porcentajes de colonización de raíz reportados entre 44-66% para plantas jóvenes bajo condiciones de vivero (Droh *et al.*, 2016). No obstante, en este estudio

se encontraron valores de colonización de raíz bajos para ambos genotipos (12-22%) tanto para los tratamientos evaluados (Fig. 13a) como lo encontrado en plantas adultas en etapa de producción (15-18%) (Fig. S7). Estos resultados coinciden con lo reportado por Jacome & Rodriguez (2017) y Pérez *et al.*, (2019) donde plantas de cacao IMC67 crecidas en suelos con concentraciones superiores a 12 mg kg^{-1} Cd presentaron baja colonización de la raíz (<20%). La colonización de la raíz es un parámetro que depende tanto de la especie de HFMA (Maherali & Klironomos, 2007), como de la estrategia de vida que esta posea (Chagnon *et al.*, 2013). En este caso, el bajo porcentaje de colonización encontrado en este estudio puede ser explicado por la simbiosis de las raíces de cacao con posibles HFMA “estrés-tolerantes” presentes en las comunidades inoculadas, ya que estas se caracterizan por presentar bajas tasas de producción de biomasa extra e intra radical, que les permite tener un mejor uso eficiente de carbono y favorecer la simbiosis en hospederos sometidos a un estrés abiótico (Chagnon *et al.*, 2013).

3.5.3 Distribucion y acumulación de metales en la planta

El cacao ha sido descrito como una especie con alta capacidad de acumular Cd (Rodríguez *et al.*, 2019) y Zn (Sandoval *et al.*, en prensa). En este estudio se encontró que estos MPs se acumularon en mayor concentración en los tejidos de la copa (Fig. 14) y presentaron factor de traslocación (TF) superior a 1 (Tabla S8), independiente del genotipo y tratamiento empleado con HFMA. Este patrón de distribución de metales y TF coincide con lo reportado para otras especies hiperacumuladoras de metales (Lin & Aarts, 2012; Luo *et al.*, 2016; Garg *et al.*, 2018). Interesantemente, a pesar de que la concentración de ambos metales en los tejidos de la planta fueron altas (Fig. 14 y 15), únicamente el Zn se encontró en concentraciones hasta 2.4 veces más altas que la CTC reportada para tejido foliar ($>360 \text{ mg kg}^{-1}$ Zn; Cruz Neto *et al.*, 2015), mientras que el Cd estuvo hasta 0,4 veces por debajo de su CTC ($>300 \text{ mg kg}^{-1}$ Cd; Jacome & Rodriguez, 2017). La reducida toma de Cd por la planta a pesar de su alta disponibilidad en el suelo puede ser producto de la competencia iónica entre ambos metales (Rizwan *et al.*, 2019), ya que el Cd ingresa principalmente por medio de los transportadores de Zn (Song *et al.*, 2017a; Kaur & Garg, 2018), los cuales tienen una mayor afinidad por el Zn cuando la relación Zn/Cd en el suelo es alta (Papoyan *et al.*, 2007; Topperwien *et al.*, 2007).

Varios autores indican que la inoculación con comunidades de HFMA extraídas de suelos con altas concentraciones de MPs podrían conferir una mayor tolerancia a sus plantas hospedero (Hildebrandt *et al.*, 2007; Millar & Bennett, 2016; Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, en este estudio la comunidad de HFMA proveniente de suelos enriquecidos con Cd-Zn (MH) no generó un efecto significativo sobre la acumulación de Cd en los tejidos de ambos genotipos (Fig. 15). Estos resultados indican que los posibles efectos benéficos de los HFMA sobre la toma de Cd de las plantas de cacao no son dependientes del origen de la comunidad de HFMA, sino de otros aspectos del hongo como su capacidad de aclimatación como lo demostró Bui & Franken, (2018) en un sistema de maíz bajo estrés por zinc.

Por otra parte, se encontraron interacciones entre el tipo de inóculo de HFMA y el genotipo del hospedero sobre la acumulación de Zn en los tejidos del patrón (Figura 15d), donde la inoculación con MH redujo la acumulación de Zn en CAU43 (26%), mientras que ML la incremento en IMC67 (37%). Estos resultados indican que independiente de si los hongos han sido expuestos anteriormente a altas concentraciones de los MPs, algunos miembros de la comunidad pueden aclimatarse y generar una respuesta diferencial en la planta (Bui & Franken, 2018). Se ha reportado que los HFMA contribuyen sustancialmente en la toma de Zn por las plantas cuando éste se encuentra en exceso, reduciendo (Kaur & Garg, 2018) o incrementando (Coccina *et al.*, 2019) su acumulación dependiendo de la especie de estudio. Estos resultados podrían indicar que MH y ML generaron respuestas dependientes del genotipo sobre la acumulación de Zn del patrón. Sin embargo, debido a la metodología utilizada no es posible discriminar si estas diferencias son debidas a mayor acumulación de Zn en los tejidos de la raíz o en el HFMA que colonizó la raíz.

El efecto de la inoculación con HFMA sobre la toma de MPs por las plantas ha sido controversial por la diversidad del tipo de respuesta (Meier *et al.*, 2012). En este estudio, se encontró que inoculación con HFMA generó efectos sobre la acumulación de Cd dependiendo de la parte de la planta analizada y del genotipo (Fig. 14), encontrando que en las hojas de CAU43 la inoculación con MC redujo significativamente (32%) la acumulación de Cd (Fig. 15c). El establecimiento de una comunidad de HFMA con el sistema radicular es mediado por la identidad genética del hospedero (Sýkorová *et al.*,

2007; Turrini *et al.*, 2018) y éste puede establecer asociaciones preferenciales con algunos miembros de la comunidad de HFMA inoculada dependiendo de la reciprocidad cooperativa, brindando más fuentes de carbono a HFMA que le brinden más beneficios como tolerancia a un estrés (Kiers *et al.*, 2011). En este caso, algunos miembros de la comunidad de MC pudieron tener mayor afinidad con CAU43 confiriendo una reducción en la acumulación de Cd de la planta mediante diferentes mecanismos que aún se desconocen en cacao. Estos resultados sugieren que en cacao el genotipo del hospedero es un factor importante que determina el efecto de las HFMA sobre la acumulación de Cd en los tejidos.

3.5.4 Crecimiento

El crecimiento de las plantas es afectado generalmente durante un estrés por Cd y Zn (Hasanuzzaman *et al.*, 2018), no obstante la inoculación con HFMA puede reducir la fitotoxicidad de estos MPs (Kaur & Garg, 2018). En este estudio se encontró que el genotipo IMC67 al ser inoculado con MC incrementó significativamente la biomasa total (31%) y el área foliar (66%) cuando creció en ES (Fig. 16). Interesantemente, en estos tratamientos no se presentaron diferencias en la acumulación de Cd y Zn en sus tejidos (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la inoculación con MC en IMC67 indujo un mayor crecimiento de la planta para de esta forma redistribuir la alta concentración de Cd y Zn en una mayor cantidad biomasa. Evidencia de ello es la existencia de una alta correlación negativa y significativa entre la biomasa seca de las hojas con su concentración de Cd (-0.72**) y de Zn (-0.63**) en IMC67 (Fig. 17). Este mecanismo de detoxificación por “dilución” ha sido reportado previamente en plantas inoculadas con HFMA (Cabral *et al.*, 2015; Kaur & Garg, 2018).

Contrario a lo ocurrido en IMC67, en CAU43 no se presentaron diferencias significativas en la biomasa total y el área foliar al inocularlos con los diferentes tratamientos de HFMA en ES (Fig. 16), sin embargo, la inoculación con HFMA incidió en reducciones de hasta un 32% en la acumulación de Cd en los tejidos foliares (Fig. 15a), estos resultados indican que las HFMA beneficiaron a este genotipo reduciendo la acumulación de Cd. Se ha reportado que los HFMA pueden disminuir la toma de MPs por las plantas mediante diferentes mecanismos como la secreción de agentes quelantes (Meier *et al.*, 2012), la producción de glomalina (Garg & Bhandari, 2014; Lopes *et al.*, 2016) y la retención de MPs

en su pared celular (Bui & Franken, 2018), entre otros (Ferrol *et al.*, 2016); sin embargo, ninguno de estos mecanismos de los HFMA aún han sido descrito en plantas de cacao. Estos resultados sugieren que los HFMA no solo generan un efecto benéfico sobre el cacao bajo estrés por Cd y Zn, sino también que los mecanismos de detoxificación difieren entre los genotipos del hospedero, en IMC67 mediante incrementos en el crecimiento y en CAU43 mediante reducciones en la toma de Cd.

3.5.5 Verdor y fluorescencia de la clorofila a

Síntomas visuales como clorosis y reducción en la eficiencia fotosintética de las plantas (F_v/F_m) son generalmente el resultado del estrés oxidativo (Küpper *et al.*, 1996; Hossain *et al.*, 2012) y la sustitución de iones metal en proteínas de la fotosíntesis (Viehweger, 2014). En este estudio se encontró que a pesar de las altas concentraciones de Cd y Zn encontradas en la planta (Fig. 15), ambos genotipos de cacao presentaron valores de verdor (42.0 atLEAF units) y F_v/F_m (0.72) (Fig. S6), iguales o incluso superiores al reportado por plantas de cacao en condiciones óptimas (verdor > 30 atLEAF units: Sandoval *et al.*, En prensa; $F_v/F_m > 0.7$: Jaimez *et al.*, 2018). Estos resultados difieren a lo reportado por Sandoval *et al.*, (En prensa), donde plantas de cacao IMC67 germinadas en suelo enriquecido con 24 mg kg⁻¹ Cd y 123 mg kg⁻¹ Zn presentaron disminuciones en el verdor (78%) y del F_v/F_m (13%) a los cuatro meses después de siembra. Varios autores reportan que la tolerancia a MPs puede diferir dependiendo del estado de desarrollo de las plantas, donde plantas adultas son más eficientes excluyendo y detoxificando los MPs (Lefèvre *et al.*, 2009; Tkalec *et al.*, 2014; Meter *et al.*, 2019). Estos resultados indican que el estado desarrollo es un factor importante que influye en la capacidad del cacao para tolerar el estrés por Cd y Zn.

3.5.6 Extracción de Cd y Zn

El Cd y el Zn son elementos dinámicos en el sistema suelo-planta (Page & Feller, 2015), por lo que una manera de analizar la absorción, transporte y acumulación de estos metales es comparando la cantidad de Cd y Zn disponible en el suelo antes y después del proceso de extracción de metales por las plantas, en este caso asumiendo que las pérdidas por lixiviación en las bolsas son mínimas y similares entre ellas. A los 0 DDT, ES presentó una

concentración de 25.7 mg kg⁻¹ Cd y 217.8 mg kg⁻¹ Zn (Tabla S7) y a los 154 DDT las concentraciones de estos metales disminuyeron considerablemente (17-20 mg kg⁻¹Cd y 167-197 mg kg⁻¹Zn) (Fig. S18). Estos resultados son consistentes con el crecimiento y acumulación de estos metales en los tejidos de las plantas; en IMC67 con MC se presentó la menor concentración de Cd y Zn en el suelo debido probablemente a que su crecimiento fue mayor (31% más biomasa total) a pesar de que la acumulación de Cd y Zn en sus tejidos no mostró diferencias significativas (Fig. 15). En contraste, la inoculación con HFMA en CAU43 generó una mayor concentración de Cd en el suelo posiblemente a una menor acumulación de Cd en las hojas (Fig. 15c), las cuales equivalen al ~45% de la biomasa seca total (Fig. S9). Estos resultados sugieren que la inoculación con MC influyó en la extracción de Cd y Zn del suelo, incrementándola en IMC67 y reduciéndola en CAU43.

3.6 Conclusiones

La inoculación con HFMA genera un efecto benéfico sobre la fisiología de plantas de cacao bajo estrés por Cd y Zn, sin embargo su efecto no está ligado con la procedencia de los HFMA sino de su capacidad de aclimatación y el ensamblaje de su comunidad. En este caso un inóculo comercial de HFMA, que no había sido expuesto anteriormente a estrés por Cd y Zn, generó reducciones en la acumulación de Cd o incrementos en el crecimiento de las plantas de cacao dependiendo del genotipo. Los resultados de este trabajo también confirman la alta capacidad del cacao para tolerar la acumulación de altas concentraciones de Cd y Zn principalmente en los tejidos de la copa sin presentar síntomas como clorosis o reducciones en la eficiencia fotosintética, destacando que en suelos donde la relación Zn/Cd es alta las plantas poseen una mayor afinidad por la toma de Zn que por la de Cd. Este estudio destaca la necesidad de profundizar en las interacciones entre el genotipo del hospedero y la comunidad de HFMA para diseñar planes de mitigación de la toma de Cd por las plantas cacao crecidas en suelos enriquecidos con Cd y Zn.

3.7 Bibliografía

- Abd-Allah, E. F., Abeer, H., & Alqarawi, A. A. (2016). Mitigation of cadmium induced stress in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) by selenium. *Pakistan Journal of Botany*, 48(3), 953–961.
- Aghababaei, F., & Raiesi, F. (2015). Mycorrhizal fungi and earthworms reduce antioxidant enzyme activities in maize and sunflower plants grown in Cd-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 86, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.009>

- Aguirre, W., Fischer, G., & Miranda, D. (2011). Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 141–153.
- Aloui, A., Dumas-gaudot, E., Daher, Z., Tuinen, D. Van, Aschi-smit, S., & Morandi, D. (2012). Plant Physiology and Biochemistry Influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on cadmium induced *Medicago truncatula* root isoflavonoid accumulation. *Plant Physiology et Biochemistry*, 60, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.014>
- Antonioli, Z. I., Facelli, E., Miller, D., & Smith, S. E. (2002). Spore communities of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal association in different ecosystems, South Australia. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 26(1), 627–635.
- Arévalo-gardini, E., Arévalo-hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 606, 792–800.
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Audet, P., & Charest, C. (2007). Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution*, 147, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.006>
- Barea, J., Gryndler, M., Lemanceau, P., Schuepp, H., & Azcon, R. (2002). The rhizosphere of mycorrhizal plants. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, 1–19.
- Barraza, F., Schreck, E., Leveque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., ... Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950–963.
- Benavides, M., Gallego, S., & Tomaro, M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazi. J. Plant Physiol.*, 17(1), 21–34. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- Bhalerao, S. A. (2013). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: a potential biotechnological tool for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *International Journal of Science and Nature*, 4(1), 1–15.
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Eraza, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1175–1194. <https://doi.org/10.1111/jam.13698>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Brundrett, M., Piche, Y., & Peterson, R. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 62, 2128–2134.
- Bui, V. C., & Franken, P. (2018). Acclimatization of *Rhizophagus irregularis* Enhances Zn Tolerance of the Fungus and the Mycorrhizal Plant Partner. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03156>
- Cabral, L., Soares, C. R. F. S., Giachini, A. J., & Siqueira, J. O. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1918-y>
- Carrillo, I., Mejia, B., & Franco, H. (1994). *Manual de laboratorio para análisis foliares*. Chinchiná, Colombia: CENICAFE.
- Carvalho, L. M., Casador, I., & Martins-Lousao, M. A. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant and Soil*, 285(1–2), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9001-y>

- Chagnon, P., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science*, 18(9), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.001>
- Chanda, D., Sharma, G. D., & Jha, D. K. (2014). Isolation and identification of some Arbuscular Mycorrhiza (AM) fungi for phytoremediation in soil contaminated with paper mill effluent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 527–539.
- Chaux, M. A., & Pérez, M. A. (2017). *¿Nuevos caminos para los cacao especiales de Colombia? Una experiencia desde el proyecto Coexca 2012 - 2017*. Bogotá, Colombia: Fundación Swisscontact Colombia.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Choi, Y. E., & Harada, E. (2005). Roles of calcium and cadmium on Cd-containing intra- and extracellular formation of Ca crystals in tobacco. *Journal of Plant Biology*, 48(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/BF03030570>
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., ... Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(5), 374–391. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.903747>
- Clough, Y., Faust, H., & Tscharntke, T. (2009). Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conservation Letters*, 2(5), 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2009.00072.x>
- Coccina, A., Cavagnaro, T. R., Pellegrino, E., Ercoli, L., & Mclaughlin, M. J. (2019). The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain. *BCM Plant Biology*, 19, 133. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1741-y>
- Cornejo, P., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2013). Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 925–928. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.031>
- Crespo, del C. E., & Crespo, A. (1997). *Cultivo y Beneficio del cacao CCN51*. Quito: El Conejo.
- Cruz Neto, R. de O., Souza Júnior, J. O., Sodr e, G. A., & Baligar, V. C. (2015). Growth and Nutrition of Cacao Seedlings Influenced By Zinc Application in Soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4), 1053–1064. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-238/14>
- Dalcorso, G., Manara, A., & Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. *Metallomics*, 5(June), 1117–1132. <https://doi.org/10.1039/c3mt00038a>
- Davison, J., Ainsaar, L., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., ... Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251), 970–973. <https://doi.org/10.5061/dryad.2m15n>
- Del Val, C., Barea, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (1999). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 718–723.
- Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonzalves, B., & Santos, C. (2014). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologia Plantarum*, (June), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1167-8>
- Droh, G., Kouassi, A. B., Kouadjo, C., Zeze, A., Nguetta, A. S., & Sanders, I. R. (2016). Effect of two AMF on growth of cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) in greenhouses. *Global Journal of Advanced Research*, 3(3), 157–164. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/301614323_Effect_of_two_AMF_on_growth_of_

cocoa_seedlings_Theobroma_cacao_L_in_greenhouses

- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., & Chakrabarty, D. (2018). Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1169–1192. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0741-8>
- Edelstein, M., & Ben-Hur, M. (2018). Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 234(June 2017), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- Egas, J. J., & De Salvo, C. P. (2018). *Agricultural Support Policies in Latin America and the Caribbean: 2018 Review*. Washington, DC, United States. <https://doi.org/10.18235/0001191>
- El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Tropical Agriculture Research*, 25(4), 27–54. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*, 678, 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- Ezedom, T., & Asagba, S. O. (2016). Effect of a controlled food-chain mediated exposure to cadmium and arsenic on oxidative enzymes in the tissues of rats. *Toxicology Reports*, 3, 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.07.002>
- FAO, & OMS. (2014). Proposed draft maximum levels for cadmium in chocolate and cocoa-derived products. *Programa Conjunto Fao/Oms Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Contaminantes De Los Alimentos, Item 6(2014)*, 20.
- Fedecacao. (2015). *Guía técnica para el cultivo del Cacao* (Sexta edic, Vol. 6). Bogotá, Colombia.
- Ferrol, N., Tamayo, E., & Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6253–6565. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw403>
- FHIA. (2005). Guía práctica. PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CACAO POR INJERTO / Proyecto Control de la Moniliasis. *Fundación Hondureña De Investigación Agrícola*.
- FINAGRO. (2018). *Inteligencia de mercado: Cacao*. Retrieved from https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_cacao_version_ii.pdf
- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10, 48–60. <https://doi.org/10.1520/C0033-03>
- Garg, N., & Bhandari, P. (2014). Cadmium toxicity in crop plants and its alleviation by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi: An overview. *Plant Biosystems*, 148(4), 609–621. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.788096>
- Garg, N., Singh, S., & Kashyap, L. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal tolerance in plants: An insight into physiological and molecular mechanisms. In *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration: Fourth Edition* (pp. 75–97). https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_4
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Girma, G. (2015). Microbial Bioremediation of Some Heavy Metals in Soils : an Updated

- Review. *Indian J.Sci.Res.*, 6(1), 147–161.
- Gómez, J., Nivia, Á., Montes, N. E., Almanza, M. F., Alcárcel, F. A., & Madrid, C. A. (2015). *Compilando la geología de Colombia: Una visión a 2015*. Imprenta Nacional de Colombia.
 - González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>
 - Goto, B. T., & Jobim, K. (2019). Laboratório de Biologia de Micorrizas. Retrieved from <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas>
 - Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Paniagua, J. C., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2016). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, 580, 677–686.
 - Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
 - Gransee, A., & Führs, H. (2013). Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant and Soil*, 368(1–2), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1567-y>
 - Hafeez, B., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2), 374–391. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2013/2746>
 - Hancock, L. M. S., Ernst, C. L., Charneskie, R., & Ruane, L. G. (2012). Effects of cadmium and mycorrhizal fungi on growth, fitness, and cadmium accumulation in flax (*Linum usitatissimum*; Linaceae). *American Journal of Botany*, 99(9), 1445–1452. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100497>
 - Hart, M. M., Reader, R. J., & Klironomos, J. N. (2001). Life-History Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Their Successional Dynamics. *Mycological Society of America*, 93(6), 1186. <https://doi.org/10.2307/3761678>
 - Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X.-Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z.-Y. (2017). Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress—A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
 - Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2018). *Plants under metal and metalloids stress: Responses, tolerance and remediation*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2242-6>
 - Hassan, S., Boon, E., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology*, 20, 3469–3483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x>
 - Hassan, S., Hijri, M., & St-Arnaud, M. (2013). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *J Environ Radioact*, 115(6), 151–156. [https://doi.org/S0265-931X\(12\)00203-2](https://doi.org/S0265-931X(12)00203-2)
 - Hazard, C., Gosling, P., Gast, C. J. Van Der, Mitchell, D. T., Doohan, F. M., & Bending, G. D. (2012). The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal*, 7(3), 498–508. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.127>
 - He, L., Yang, H., Yu, Z., Tang, J., Xu, L., & Chen, X. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungal phylogenetic groups differ in affecting host plants along heavy metal levels. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(10), 2034–2040. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.013>
 - He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., & Baligar, V. C. (2015). *Soil Biogeochemistry, Plant Physiology, and Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils. Advances in Agronomy* (Vol. 134). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
 - He, S., Yang, X., Zhenli, H., & Virupax, B. (2017). Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review. *Pedosphere*, 27(3), 421–438.

[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)

- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, *19*, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hermes-Lima, M. (2005). *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism*. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
- Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, *68*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.023>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, *2012*(Cd), 1–37. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Huamaní, H., Huauya, M., Mansilla, M., Florida, N., & Neira, G. (2012). Presence of heavy metals in organic cacao (*Theobroma cacao* L.) crop. *Acta Agronómica*, *61*(4), 339–344.
- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., Lai, C., Bashir, H., ... Wan, J. (2017). Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta*, *245*(5), 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2664-1>
- ICCO. (2016). *What makes Europe an interesting market for fine flavour cocoa?*
- ICCO. (2019). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Production of cocoa* (Vol. XLV). <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>
- IGAC. (2000). *Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca*. Bogotá, Colombia: CARTOPRINT Ltda.
- Jacome, D., & Rodriguez, A. (2017). *EFFECTO DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HFMA) SOBRE UN SISTEMA SUELO- PLANTA EN SUELOS CONTAMINADOS CON CADMIO EN ETAPA DE VIVERO*.
- Jaimez, R. E., Puyutaxi, F. A., Vasco, A., Loor, R. G., Tarqui, O., Quijano, G., ... Tezara, W. (2018). Photosynthetic response to low and high light of cacao growing without shade in an area of low evaporative demand. *Acta Biol. Colomb*, *23*(11), 95–103. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.64962>
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., & Tayyeba, S. (2018). Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling, *9*(February), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Janoušková, M., Pavlíková, D., & Vosátka, M. (2006). Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere*, *65*(11), 1959–1965. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.007>
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, *68*, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jentschke, G., Susanne, W., & Godbold, D. L. (1999). Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedling. *Tree Physiology*, (1993), 23–30. Retrieved from [papers3://publication/uuid/6B7665B0-F91B-4BE1-8DD8-15A0B7A51EBD](https://doi.org/10.1007/s11098-000-0000-0)
- Jiang, Q.-Y., Zhuo, F., Long, S.-H., Zhao, H.-D., Yang, D.-J., Ye, Z.-H., ... Jing, Y.-X. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Scientific Reports*, *6*(February), 21805. <https://doi.org/10.1038/srep21805>
- Jiménez Tobón, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+Limpia*, *10*(1), 89–104.
- Kabata-Pendias, A., & Barbara, S. (2015). *Trace elements in abiotic and biotic environments*. 感染症誌 (Vol. 91).
- Kassambara, A. (2017). *Practical Guide to Principal Component Methods in R. Principal component methods in R: Practical guide*. STHDA. Retrieved from <http://www.analyticsvidhya.com/blog/2016/03/practical-guide-principal-component->

- analysis-python/
- Kaur, H., & Garg, N. (2018). Recent Perspectives on Cross Talk Between Cadmium, Zinc, and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 680–693. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9750-2>
 - Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182(November 2017), 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>
 - Khan, A. G. (2006). Mycorrhizoremediation--an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 7(7), 503–514. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0503>
 - Khan, A. G., Kuek, C., Chaudhry, T. M., Khoo, C. S., & Hayes, W. J. (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41(1–2), 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00412-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00412-9)
 - Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13772–13799. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>
 - Khan, K., Lu, Y., Khan, H., Ishtiaq, M., Khan, S., Waqas, M., ... Wang, T. (2013). Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.014>
 - Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., & Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
 - Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., ... Bücking, H. (2011). Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, 333(6044), 880–883. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283097d0f>
 - Kramer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
 - Krishnamoorthy, R., Kim, C.-G., Subramanian, P., Kim, K.-Y., Selvakumar, G., & Sa, T.-M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *PloS One*, 10(6), e0128784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128784>
 - Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research*, 207(October 2017), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
 - Kumar, P., Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Kalunke, R. M., & Colla, G. (2015). Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), 477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00477>
 - Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., ... Dikshit, A. (2015). Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques* (pp. 335–359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>
 - Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 4(8), 269–285. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
 - Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 259–266. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.259>
 - Lanza, J., Churion, P., Liendo, N., & López, V. (2016). Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Santa Bárbara de Zulia, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente*, 28(1), 106–115.
 - Lasat, M. M., Baker, A. J. M., & Kochian, L. V. (1998). Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 118(3), 875–883. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.875>

- Laycock, D. H. (1945). Preliminary investigations into the functions of the endotrophic mycorrhiza of *Theobroma cacao* L. *Tropical Agriculture, Trinidad*, 22, 77–80.
- Lefèvre, I., Marchal, G., Corréal, E., Zanuzzi, A., & Lutts, S. (2009). Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation*, 59(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9382-z>
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Li, H., Luo, N., Zhang, L. J., Zhao, H. M., Li, Y. W., Cai, Q. Y., ... Mo, C. H. (2016). Do arbuscular mycorrhizal fungi affect cadmium uptake kinetics, subcellular distribution and chemical forms in rice? *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.124>
- Lin, L., Yang, D., Wang, X., Liao, M., & Wang, Z. (2016). Effects of grafting on the cadmium accumulation characteristics of the potential Cd-hyperaccumulator *Solanum photeinocarpum*. *EnvironMonit Assess*, 188(82), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-5084-3>
- Lin, Y. F., & Aarts, M. G. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3187–3206. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1089-z>
- Liu, L., Gong, Z., Zhang, Y., & Li, P. (2014). Growth, cadmium uptake and accumulation of maize (*Zea mays* L.) under the effects of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology*, 23(10), 1979–1986. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1331-6>
- Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018). Science of the Total Environment Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils : Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>
- Liu, L. Z., Gong, Z. Q., Zhang, Y. L., & Li, P. J. (2011). Growth, Cadmium Accumulation and Physiology of Marigold (*Tagetes erecta* L.) as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere*, 21(3), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60132-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60132-X)
- Lopes Leal, P., Varón-López, M., Gonçalves de Oliveira Prado, I., Valentim dos Santos, J., Fonsêca Sousa Soares, C. R., Siqueira, J. O., & de Souza Moreira, F. M. (2016). Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.001>
- López de Andrade, S., Jorge, R., & Dias da Silveira, A. (2005). Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola*, 62(4), 389–394. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400013>
- Lora Silva, R., & Bonilla Gutiérrez, H. (2010). Remediation of a Soil Contaminated With the Heavy Metals Cadmium and Chromium on the High Basin of the Bogota River. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 61–70. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Luo, Z. Bin, He, J., Polle, A., & Rennenberg, H. (2016). Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1131–1148. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.07.003>
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., & White, P. J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Kumar, M., Hussain, A., Wang, Q., ... Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils : A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>

- Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316(5832), 1746–1748. <https://doi.org/10.1126/science.1143082>
- Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.002>
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., & Cornejo, P. (2012). Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(7), 741–775. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.528518>
- Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). *Cadmium and cacao : a review of research and recommendations for minimising cadmium in cacao produced in Latin America*.
- Millaleo, R., Reyes- Diaz, M., Ivanov, A. ., Mora, M. ., & Alberdi, M. (2010). Manganese As Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 470–481. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
- Millar, N. S., & Bennett, A. E. (2016). Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 182(3), 625–641. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3673-7>
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
- Mobin, M., & Khan, N. A. (2007). Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164(5), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.003>
- Molina, E. (1999). *Acidez y encalado de los suelos*.
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P., & Bever, J. D. (1995). Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 25–32. <https://doi.org/10.1139/b95-221>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Murtaza, G., Javed, W., Hussain, A., Qadir, M., & Aslam, M. (2017). Soil-applied zinc and copper suppress cadmium uptake and improve the performance of cereals and legumes. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 199–206. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207605>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10–25. <https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00>
- Nayuki, K., Chen, B., Ohtomo, R., & Kuga, Y. (2014). Cellular Imaging of Cadmium in Resin Sections of Arbuscular Mycorrhizas Using Synchrotron Micro X-ray Fluorescence. *Microbes and Environments*, 29(1), 60–66. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13093>
- Nazar, R., Iqbal, N., Massod, A., Iqbal, M., Khan, R., Syeed, S., & Khan, N. (2012). Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 03(10), 1476–1489. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178>
- Obata, H., & Umebayashi, M. (1997). Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 20(1), 97–105. <https://doi.org/10.1080/01904169709365236>
- Oehl, F., Laczko, E., Oberholzer, H.-R., Jansa, J., & Egli, S. (2017). Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Biology and Fertility of*

- Soils*, (July). <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1217-x>
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., & Alves da Silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2(2), 191–199. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10>
 - Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
 - Olade, M. A. (1987). Dispersion of Cadmium, Lead and Zinc in Soils and Sediments of a Humid Tropical Ecosystem in Nigeria. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment* (pp. 303–313). John Wiley and Sons Ltd.
 - Padmavathamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut*, 184, 105–126. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
 - Pagano, M. C., Persiano, A. I. C., Cabello, M. N., & Scotti, M. R. (2010). Elements sequestered by arbuscular mycorrhizal spores in riverine soils: A preliminary assessment. *Journal of Biophysics and Structural Biology*, 2(2), 16–21.
 - Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy*, 5(3), 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
 - Papoyan, A., Piñeros, M., & Kochian, L. V. (2007). Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02073.x>
 - Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. (2018). Effects of different metals on photosynthesis: Cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
 - Pawlowska, T. E., & Charvat, I. (2004). Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6643–6649. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6643-6649.2004>
 - Pereira de Araújo, R., Furtado de Almeida, A. A., Silva Pereira, L., Mangabeira, P. A. O., Olimpio Souza, J., Pirovani, C. P., ... Baligar, V. C. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144(January), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
 - Pérez Moncada, A. U., Gómez Ramírez, M., Ordoñez Serralde, D. P., Peñaranda Rolón, M. A., Wilches Ortiz, A. W., Ramírez, L., & Rengifo Estrada, A. G. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as a strategy to reduce the absorption of cadmium in cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *Terra Latinoamericana*, 37, 121–130. <https://doi.org/10.28940/tl.v37i2.479>
 - Puentes-Páramo, Y. ., Menjivar-Flores, J. C., & Aranzazy-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnóstico nutricional en cacao. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 329–336.
 - Puentes-Páramo, Y., Menjivar-Flores, J., & Aranzazu-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnóstico nutricional en cacao. *Mesoamerican Agronomy*, 27(2), 329–336.
 - Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S., & Abidin, M. Z. (2004). Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress. *Plant Science*, (167), 1171–1181.
 - Ramtahal, G., Chang, I., Seegobi, D., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., & Harrynanan, L. (2015). Investigation of the Effects of Mycorrhizal Fungi on Cadmium Accumulation in Cacao. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society*, 48, 147–152.

- Reichman, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc*. *Environment*. Retrieved from http://www.plantstress.com/articles/toxicity_i/Metal_toxicity.pdf
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., ... Gianinazzi-Pearson, V. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1177–1185. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1177>
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Ibrahim, M., Tsang, D. C. W., Zia-ur-Rehman, M., ... Ok, Y. S. (2017). A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*, 182, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.013>
- Rizwan, M., Ali, S., Zia, M., & Maqbool, A. (2019). A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-019-04174-6>
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2014). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME Journal*, 9(5), 1053–1061. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.207>
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME Journal*, 9(5), 1053–1061. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.207>
- Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>
- Rodriguez, C. A., Chagas, E. A., Felipe, L., Almeida, P. De, Paul, J., Delgado, M., ... Sanchez, C. (2015). Genotype and Grafting Techniques Effects on Survival and Growth of Camu Camu Plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), 1–11. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n6pxx>
- Rodríguez, S., & Henao, M. C. (2017). *Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca*.
- Römheld, V. (2011). Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Nutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 299–312). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00011-X>
- Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2277-5>
- Sanders, I. R., & Rodriguez, A. (2016). Aligning molecular studies of mycorrhizal fungal diversity with ecologically important levels of diversity in ecosystems. *ISME Journal*, 10(12), 2780–2786. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.73>
- Sandoval, J. F., Pérez, A. U., Rodriguez, A., & Torres Rojas, E. (2019). Natural high cadmium concentration in soil result in low local arbuscular mycorrhizal fungi AMF community diversity associated to cocoa crops (*Thebroma cacao* L.).
- Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S. S., Zia, M. H., Naeem, A., Bibia, S., & Farida, G. (2010). Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(6), 925–937. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3916>
- Schenk, N., & Perez, Y. (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi* (3th Editio). Sinergistic Publications.
- Schneider, J., Bundschuh, J., & do Nascimento, C. W. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of the Total Environment*, 572, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.185>
- Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2000). Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4), 523–544. <https://doi.org/10.1023/A>
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2008). Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11183-008-1001-8>

- Shabala, S. (2017). *Plant stress physiology*. (S. Shabala, Ed.) (2nd Editio). London, UK: CPI Group (UK) Ltd. <https://doi.org/10.1079/9781780647296.0253>
- Sharma, S. S., Dietz, K. J., & Mimura, T. (2016). Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell and Environment*, 39(5), 1112–1126. <https://doi.org/10.1111/pce.12706>
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2016). Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere*, 26(2), 148–166. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60032-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60032-7)
- Siebielec, G., Smreczak, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Maliszewska-kordybach, B., Terelak, H., Koza, P., ... Suszek, B. (2012). *Monitoring of soil chemistry in Poland 2010-2012*. Pulawy: IUNG PIB. <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.4.455>
- Sierra, D. (2016). *El cacao como producto lider en la sustitucion de cultivos ilicitos en proceso posconflicto*. Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Militar Nueva Granada.
- Soler, F., & Henao, M. (2017). *Diagnóstico de los niveles de cadmio en el suelo y su distribución en hojas y frutos de cacao Cultivado en Nilo y Yacopí, Cundinamarca*. Universidad Nacional de Colombia.
- Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017a). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017b). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Souza, F. A., Dalpé, Y., Declerck, S., Providencia, I. E., & Séjalon-Delmas, N. (2005). Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. *In Vitro Culture of Mycorrhizas*, 4(September 2015), 73–91. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_5
- Souza, J., Oehl, F., Donizete, C., Torres, C., Coyne, D., Karla, D., & Costa, L. (2017). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Applied Soil Ecology*, 117–118(April), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.023>
- Souza, V. L., de Almeida, A. A. F., de S. Souza, J., Mangabeira, P. A. O., de Jesus, R. M., Pirovani, C. P., ... Loguercio, L. L. (2014). Altered physiology, cell structure, and gene expression of Theobroma cacao seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1217–1230. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1983-4>
- Sun, H., Xie, Y., Zheng, Y., Lin, Y., & Yang, F. (2018). The enhancement by arbuscular mycorrhizal fungi of the Cd remediation ability and bioenergy quality-related factors of five switchgrass cultivars in Cd-contaminated soil. *PeerJ*, 6, e4425. <https://doi.org/10.7717/peerj.4425>
- Suresh, S. (2005). Characteristics of Soils Prone To Iron Toxicity and Management - a Review, 26(1), 50–58.
- Suzuki, R., & Shimodaira, H. (2006). Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12), 1540–1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>
- Svenningsen, N. B., Watts-Williams, S. J., Joner, E. J., Battini, F., Efthymiou, A., Cruz-Paredes, C., ... Jakobsen, I. (2018). Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0059-3>
- Sýkorová, Z., Wiemken, A., & Redecker, D. (2007). Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5426–5434. <https://doi.org/10.1128/AEM.00987-07>
- Tamayo, E., Gómez-Gallego, T., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2014). Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus

- Rhizophagus irregularis. *Frontiers in Plant Science*, 5(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00547>
- Tan, S. Y., Jiang, Q. Y., Zhuo, F., Liu, H., Wang, Y. T., Li, S. S., ... Jing, Y. X. (2015). Effect of inoculation with *Glomus versiforme* on cadmium accumulation, antioxidant activities and phytochelatin of *Solanum photeinocarpum*. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132347>
 - Tang, X., Li, Q., Wu, M., Lin, L., & Scholz, M. (2016). Review of remediation practices regarding cadmium-enriched farmland soil with particular reference to China. *Journal of Environmental Management*, 181, 646–662. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.043>
 - Teige, M., Huchzermeyer, B., & Schultz, G. (1990). Inhibition of Chloroplast ATPsynthase/ATPase Is a Primary Effect of Heavy Metal Toxicity in Spinach Plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186(3), 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(96\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(96)80003-5)
 - Tkalec, M., Štefanić, P. P., Cvjetko, P., Šikić, S., Pavlica, M., & Balen, B. (2014). The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087582>
 - Topperwien, S., Behra, R., & Sigg, L. (2007). Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(3), 483–490. [https://doi.org/10.1016/0010-4361\(88\)90728-8](https://doi.org/10.1016/0010-4361(88)90728-8)
 - Turrini, A., Bedini, A., Loor, M. B., Santini, G., Sbrana, C., Giovannetti, M., & Avio, L. (2018). Local diversity of native arbuscular mycorrhizal symbionts differentially affects growth and nutrition of three crop plant species. *Biology and Fertility of Soils*, 54, 203–217. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1254-5>
 - USDA. (2014). *Claves para la Taxonomía de Suelos* (Décima seg). Montecillo, Texcoco, Estado de México.
 - Viashaly, A. G., Blessy, B. M., Krishnamurthy, N. B., & Krishnamurthy, T. . (2015). Bioaccumulation of heavy metals by fungi. *International Journal of Environmental Chemistry & Chromatography*, 1(1), 23–28.
 - Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
 - Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. R. S., & Recherche, C. De. (1998). Ink and Vinegar , a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004–5007.
 - Vijayarengan, P., & Mahalakshmi, G. (2013). Zinc toxicity in tomato plants. *World Applied Sciences Journal*, 24(5), 649–653. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.24.05.2249>
 - Villarreal, H., Álvarez, S., Córdoba, F., Escobar, G., Fagua, F., Gast, H., ... Ospina, A. (2004). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. In *Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad* (pp. 187–225). Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos S.A. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
 - Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., & Regvar, M. (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.021>
 - Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, 10(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
 - Wang, Y., Huang, J., & Gao, Y. (2012). Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLoS One*, 7(11), e48669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048669> [pii]
 - Wei, Y., Chen, Z., Wu, F., Hou, H., Li, J., Shangguan, Y., ... Zeng, Q. (2015). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi at a large-scale antimony mining area in southern China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 29, 18–26.

<https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.10.002>

- Weissenhorn, I., Leyval, C., & Berthelin, J. (1993). Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil*, 157(2), 247–256. <https://doi.org/10.1007/BF00011053>
- Wu, Z., Wu, W., Zhou, S., & Wu, S. (2016). Mycorrhizal Inoculation Affects Pb and Cd Accumulation and Translocation in Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere*, 26(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60018-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60018-2)
- Xu, X., Chen, C., Zhang, Z., Sun, Z., Chen, Y., Jiang, J., & Shen, Z. (2017). The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45134>
- XU, Y., LIANG, X., XU, Y., QIN, X., HUANG, Q., WANG, L., & SUN, Y. (2017). Remediation of Heavy Metal-Polluted Agricultural Soils Using Clay Minerals: A Review. *Pedosphere*, 27(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60310-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60310-2)
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yu, X., Cheng, J., & Wong, M. H. (2005). Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.029>
- Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schäfer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G. S., ... Buscot, F. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 158(8), 2757–2765. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.04.017>
- Zarei, M., König, S., Hempel, S., Nekouei, M. K., Savaghebi, G., & Buscot, F. (2008). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution*, 156(3), 1277–1283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.006>
- Zhang, X., Chen, B., & Ohtomo, R. (2015). Mycorrhizal effects on growth, P uptake and Cd tolerance of the host plant vary among different AM fungal species. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(2), 359–368. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.985578>
- Zug, K. L. M., Huamaní Yupanqui, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3), 72. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>

4. Discusión general

El Cd y el Zn son MPs cuya presencia y altas concentraciones en el ambiente pueden ser nocivos para diferentes organismos como plantas (Küpper & Andresen, 2016) y los HFMA (Pawlowska & Charvat, 2004). Sin embargo, diferencias en la susceptibilidad entre especies incluso entre genotipos de plantas y aislados de HFMA, sugieren ventajas competitivas relacionadas con diferentes mecanismos de tolerancia al estrés (Lin & Aarts, 2012; Ferrol *et al.*, 2016). En este estudio se evaluaron tres hipótesis relacionadas con estos aspectos: (1) la existencia de diferencias en la estructura de la comunidad de HFMA en suelos con baja y alta concentración de Cd y Zn (capítulo I), (2) un suelo enriquecido naturalmente con altos niveles de Cd y Zn afecta la acumulación de elementos bivalentes en el tejido foliar y la fisiología de dos genotipos de cacao (capítulo II), y finalmente (3) una comunidad de HFMA proveniente de suelos enriquecidos con MPs afectaran la acumulación de Cd y Zn y la fisiología de dos genotipos de cacao sometidos a estrés por estos MPs (capítulo III).

En el capítulo I de este estudio se propuso que existen diferencias en la estructura de la comunidad de HFMA presentes en la rizósfera de cacao de dos suelos con concentraciones altas (A-Cd-Zn) y bajas (B-Cd-Zn) de Cd y Zn (hipótesis #1), ya que estos MPs en altas concentraciones pueden generar condiciones de estrés que pueden remover las poblaciones más sensibles y favorecer aquellas con mejor capacidad de adaptación (Millar & Bennett, 2016; Schneider *et al.*, 2016). Los resultados de esta investigación indican que las dos comunidades estudiadas son diferentes, donde HFMA provenientes de A-Cd-Zn presentaron menor abundancia, riqueza y diversidad de HFMA con respecto a comunidades provenientes de B-Cd-Zn (Fig. 6). Adicionalmente, las comunidades de HFMA de A-Cd-Zn presentaron menor uniformidad y dominancia de tres morfoespecies altamente frecuentes (*Diversispora spurca*, *Rhizogloium* sp. y *Claroideogloium etunicatum*) que reunieron el 60% de toda la comunidad (Fig. 7a). Estos resultados indican que la hipótesis #1 es acertada encontrando un alto índice de disimilaridad entre las

comunidades estudiadas (Bray-curtis > 0.5; Tabla 4 y Fig. 8). La persistencia y dominancia de los morfoespecies de HFMA en A-Cd-Zn puede estar asociada con su estrategia de historia de vida como HFMA “estrés tolerante”, ya que estos poseen una alta capacidad de tolerar y colonizar ambientes limitantes como la alta concentración de los MPs (Chagnon *et al.*, 2013).

Posteriormente en el capítulo II se propuso que un suelo enriquecido naturalmente con altos niveles de Cd y Zn afectaría la acumulación de elementos bivalentes en el tejido foliar y la fisiología de dos genotipos de cacao (hipótesis #2), ya que a pesar de que algunos estudios han evaluado los efectos nocivos de estos metales en plantas de cacao (Cruz *et al.*, 2015; Pereira de Araújo *et al.*, 2017), estos se han realizado adicionando los MPs artificialmente y de manera independiente. Los resultados de esta investigación indican que altas concentraciones de Cd y Zn en el suelo si influyen la dinámica de los elementos divalentes en los tejidos de las plantas y su fisiología, encontrando particularmente que una alta relación Zn/Cd en el suelo puede generar restricciones parciales sobre la acumulación de Cd e incrementos en la toma de Zn de plantas de cacao (Tabla 6). No obstante, únicamente el Zn alcanzó concentraciones en sus tejidos foliares hasta 2.2 veces más altas que su CTC (Fig. 9), generando diferentes efectos tóxicos sobre la fisiología de las plantas como: una aparente competencia por la toma de Mg (Tabla 6), reducción del contenido de pigmentos (Fig. 10), disminución en la eficiencia fotosintética (Fig. 11) y en general en el restringido crecimiento de las plantas (Fig. 12).

En este experimento también se postuló que existen diferencias en la respuesta fisiológica entre genotipos de cacao bajo estrés por Cd y Zn (hipótesis #2), ya que varios estudios indican que además de la alta capacidad que tiene el cacao para acumular Cd y Zn (Arévalo-gardini *et al.*, 2017), se ha encontrado que esta habilidad difiere entre grupos genéticos de esta especie (Lewis *et al.*, 2018; Engbersen *et al.*, 2019). En este estudio se encontró que dos genotipos ampliamente utilizados en viveros de Colombia (IMC67 y PA121) presentaron reducciones drásticas en el crecimiento (~50%) (Fig. 12); sin embargo, ligeras diferencias en el Fv/Fm (Fig. 11a) y el verdor de las hojas (Fig. 10a), estos resultados sugieren que IMC67 es menos susceptible que PA121 a esta condición de estrés, probablemente por una mayor capacidad de mantener la disipación del exceso de energía mediante NPQ (Fig. 11d). No obstante, el establecimiento de cacao a partir de

semillas en un suelo con altas concentraciones de Cd y Zn genero toxicidad en ambos genotipos.

Finalmente, en el capítulo III se propuso que una comunidad de HFMA proveniente de A-Cd-Zn (MH) generaría un efecto sobre la acumulación de Cd y Zn y la fisiología de dos genotipos de cacao sometidos a estrés por estos MPs (Hipótesis #3), ya que varios autores señalan que MH puede poseer adaptaciones que no solo les permite persistir en estas condiciones ambientales limitantes, sino que también le pueden conferir tolerancia sus plantas hospedero (Bhalerao, 2013; Bui & Franken, 2018). No obstante, los dos genotipos de cacao evaluados con MH no presentaron mejoras significativas en la toma de Cd (Fig. 14 y Fig. 15) o en el crecimiento (Fig. 16), pero se encontró que MH si redujo en un 26% la acumulación de Zn únicamente en los tejidos del patrón de CAU (Fig. 15d).

Interesantemente, en este experimento se encontró que un inoculo comercial de HFMA (MC: *G. mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. manihotis*, *Scutellospora heterogama*, *Acaulospora rugosa* y *Enthrophospora colombiana*) que no había sido expuesto antes a la condición de estrés por MPs, generó efectos significativos sobre la respuesta fisiológica de plantas de cacao sometidas al estrés por Cd y Zn dependiendo del genotipo del hospedero. La inoculación con MC redujo en CAU la acumulación de Cd en hojas (32%) (Fig. 15c), mientras que en IMC67 este inoculo incrementó su biomasa total (31%) y el área foliar (66%) (Fig. 16). Estos resultados destacan la alta capacidad de aclimatación de algunas de las especies de MC a la condición de estrés, lo cual ha sido demostrado en una sepa *Rhizophagus irregularis* sometida a altas concentración de Zn en una condiciones *in vitro* (Bui & Franken, 2018).

Los resultados de este experimento indican: (1) que los HFMA pueden generar efectos benéficos sobre la toma de MPs y fisiología de las plantas de cacao independiente de su origen (rechazo de la hipótesis #3), (2) que algunos HFMA miembros de MC tienen una alta capacidad de aclimatarse a una condición de estrés por MPs y generar un efecto benéfico en sus plantas hospederos, (3) que la interacción genotipo del hospedero-inoculo de HFMA es uno de los principales factores que define el tipo de respuesta benéfica en plantas de cacao bajo estrés por Cd y Zn y (4) que los mecanismos por los cuales lo HFMA detoxifican los MPs en las plantas de cacao difieren dependiendo del genotipo del del hospedero.

Esta es la primera vez que se reporta que los HFMA provocan efectos benéficos para las plantas de cacao en condiciones de suelos enriquecidos naturalmente por MPs, e interesantemente los resultados sugieren que estos hongos lo hacen mediante diferentes mecanismos de detoxificación dependiendo del genotipo del hospedero. No obstante, debido a la metodología utilizada, no se logró establecer mediante qué mecanismo específico de detoxificación los HFMA indujeron las respuestas observadas en las plantas, por esta razón futuras investigaciones deberán identificar si las respuestas observadas en las plantas son debidas a la secreción de agentes quelantes (Meier et al., 2012), la producción de glomalina (Garg & Bhandari, 2014; Lopes *et al.*, 2016), la retención de MPs en su pared celular del hongo (Bui & Franken, 2018), u otros posibles mecanismos (Ferrol *et al.*, 2016).

Por otra parte, las plantas de cacao en los dos experimentos (capítulo II y III) acumularon el Cd y el Zn en mayor proporción en los tejidos aéreos que en los tejidos de la raíz (Fig. 9 y Fig. 14). Este patrón de distribución de MPs en los tejidos de la planta coincide con el utilizado por plantas hiperacumuladoras (Lin & Aarts, 2012), las cuales poseen una mayor habilidad de transportar, acumular y redistribuir los MPs en los tejidos aéreos para así reducir la toxicidad en sus tejidos de raíz (Kramer, 2010; Luo *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio se encontró tanto susceptibilidad como tolerancia al estrés por estos MPs dependiendo de la etapa de crecimiento del cultivo, en el primer experimento (Capítulo II) las plantas sembradas en el suelo enriquecido con los MPs (ES) evidenciaron síntomas de toxicidad como clorosis (Fig. 10), reducción en la eficiencia fotosintética (Fig. 11) y disminución en el crecimiento (Fig. 12); mientras que en el último experimento (capítulo III) donde se partió de plantas injertadas de cinco meses esta sintomatología no se presentó al trasplantarlas a ES (Fig. S6). Meter *et al.*, (2019) indican que la tolerancia de plantas de cacao de mayor edad está asociada con una mayor cantidad biomasa en la cual pueden redistribuir el exceso de metal. Estos resultados indican que el estado desarrollo es un factor importante que influye en la capacidad del cacao para tolerar el estrés por Cd y Zn.

Los resultados de esta investigación revelaron los efectos positivos de la inoculación con HFMA como herramienta biotecnológica en cacao para la mitigación de zonas enriquecidas con altas concentraciones de Cd y Zn. No obstante, este estudio se destaca la estrecha relación existente entre el genotipo del patrón y la comunidad de HFMA sobre el tipo de

respuesta generado en las plantas, dependiendo de esta interacción, por ejemplo MC incrementó la biomasa total (31%), disminuyó la acumulación de Cd en hojas (32%) o no tuvo efecto sobre su planta hospedero (Fig. 15c y Fig. 16a). Por lo tanto futuras investigaciones deberán enfocarse en: (1) la identificación de otras posibles interacciones benéficas con genotipos de patrón usados en diferentes partes de Colombia y/o (2) en potenciar el efecto observado en este estudio con el fin de generar mayores reducciones en la toma de Cd por plantas de cacao con por ejemplo mayores concentraciones del inoculo comercial de HFMA (MC).

Por otra parte, en este trabajo se destaca la aparente habilidad “hiperacumuladora de Cd-Zn” del cacao, así como los efectos benéficos de la inoculación de HFMA sobre plantas sometidas a estrés por Cd y Zn. Sin embargo, debido a la metodología utilizada en este estudio, no fue posible determinar los mecanismos específicos por los cuales el cacao logra transportar y almacenar altas concentraciones de estos MPs, así como tampoco se logró determinar mediante cuales mecanismos los HFMA en este caso lograron reducir la toma de Cd en CAU43 e incrementar el crecimiento en IMC67. Por estas razones, futuras investigaciones deberán hacer uso de otro tipo metodologías como RNAseq o determinaciones bioquímicas que evalúen los mecanismos moleculares, enzimáticos o metabólicos que generaron las respuestas observadas en las plantas de este estudio.

Finalmente, se recomienda a los productores de cacao particularmente la inoculación con MC en regiones con enriquecimiento de estos metales, ya que fue el tratamiento que genero mejores resultados en ambos genotipos utilizados en este estudio. No obstante, futuras investigaciones deberán corroborar su efecto a largo plazo, en otras concentraciones de MPs, propiedades físico-químicas y condiciones ambientales, ya que estos factores pueden ser estar involucrados en el tipo de respuesta que se genere en las plantas sometidas a estrés por estos MPs.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Suelos enriquecidos naturalmente con Cd y Zn condicionan la estructura de la comunidad de HFMA presente, encontrándose menor abundancia, riqueza y diversidad de morfoespecies de HFMA con respecto a una zona con bajas concentraciones de los metales.
- Comunidades de HFMA provenientes de suelos enriquecidos con Cd y Zn presentaron menor uniformidad, mayor dominancia y baja similaridad con respecto a una comunidad de HFMA proveniente de un suelo con baja concentración de estos metales.
- La alta abundancia de *Diversispora spurca*, *Rhizogloium* sp. y *Claroideogloium etunicatum* en suelos enriquecidos con Cd y Zn sugiere que estas morfoespecies son predominantes y poseen una alta capacidad para tolerar esta condición de estrés.
- Plantas de cacao sembradas en suelos enriquecidos con altas concentraciones de Cd y el Zn presentaron disminuciones en la toma de Mg, la eficiencia fotosintética, el contenido de pigmentos y su crecimiento.
- Plantas de cacao crecidas en un suelo con alta relación Zn/Cd tienen mayor afinidad por la toma de Zn que por la de Cd, encontrando en los tejidos foliares concentraciones de Cd por debajo y de Zn por encima de su umbral de toxicidad.
- Existen ligeras diferencias en la susceptibilidad ante el estrés por Cd y Zn entre los genotipos de patrón, encontrando que IMC67 evidenció menor afectación en su eficiencia fotosintética y el verdor de las hojas con respecto a PA121, sin embargo ambos genotipos presentaron drásticas disminuciones en su crecimiento.
- El cacao demostró la habilidad de tomar y acumular altas concentraciones de Cd y Zn principalmente en hojas como ocurre en otras especies hiperacumuladoras,

siendo susceptible en estadios tempranos de crecimiento (siembra) pero tolerante en etapas más avanzadas (trasplante).

- La inoculación con comunidades locales de HFMA no generó un efecto significativo sobre parámetros fisiológicos y acumulación de Cd de plantas de cacao sometidas a estrés por Cd y Zn.
- La inoculación de un consorcio comercial de HFMA generó disminuciones en la acumulación de Cd e incrementos en el crecimiento dependiendo del genotipo de patrón en plantas de cacao sometidas a estrés por Cd y Zn.
- La interacción entre el genotipo del hospedero y la comunidad de HFMA es un factor importante que se debe considerar al usar los HFMA como alternativa de manejo de suelos enriquecidos con Cd y Zn.

5.2 Recomendaciones

- En este estudio se encontró diferencias marcadas en la estructura de la comunidad de HFMA presente en suelos con alta y baja concentración de Cd y Zn. Sin embargo estos resultados fueron obtenidos mediante caracterizaciones morfológicas de esporas, las cuales pueden excluir HFMA que no se detectaron por limitaciones de la metodología utilizada, futuras investigaciones podrían emplear enfoques como metagenómica y análisis de polimorfismos alélicos para brindar una mejor resolución y entendimiento de la diversidad de HFMA presentes en los suelos estudiados.
- Una alta relación de Zn/Cd en el suelo (5.1) influyó la toma y acumulación de estos metales en las plantas de cacao, incrementando la de Zn y restringiendo la de Cd, sin embargo en este caso la alta concentración de Zn conllevó a efectos tóxicos sobre las plantas. Por esta razón, podría evaluarse el efecto de diferentes relaciones Zn/Cd del suelo en la toma de estos MPs por plantas de cacao.
- Incrementos en la toma de calcio por plantas de PA121 en presencia de altas concentraciones de Cd y Zn sugieren que este puede ser un mecanismo de tolerancia dependiente de genotipo, por lo que en próximos estudios se podría evaluar la presencia de oxalatos de calcio en PA121 para identificar si esta respuesta está asociada al mecanismo de tolerancia a este estrés.

- En este estudio se utilizaron genotipos pertenecientes a grupos genéticos cercanos de cacao los cuales presentaron ligeras diferencias en la susceptibilidad al estrés por Cd y Zn. Futuros experimentos podrían evaluar genotipos pertenecientes a grupos genéticos más distantes para identificar variabilidad en la respuesta de las plantas y el desarrollo de programas de fitomejoramiento.
- Los resultados de esta investigación postulan al cacao como una posible planta hiperacumuladora de Cd y Zn. Sin embargo, aún se desconoce mediante cuales mecanismos esta especie puede ingresar, transportar, quelar, almacenar y detoxificar estos MPs y sus efectos nocivos sobre la fisiología de la planta, por lo tanto se recomienda continuar investigaciones básicas que establezcan los mecanismos de detoxificación involucrados que confieren tolerancia a esta especie.
- En este estudio se encontró reducciones en la toma de Cd por las plantas de cacao en etapa vegetativa cuando se inocularon con un producto comercial de HFMA. Futuros experimentos deberían evaluar periodos de exposición más extensos hasta la etapa reproductiva para identificar si estas reducciones en la toma de Cd también ocurren en los frutos.
- La existencia de interacciones específicas entre el genotipo del hospedero e integrantes de la comunidad de HFMA sobre la fisiología de plantas de cacao sugieren que, no necesariamente todos los miembros de la comunidad de HFMA son los que están interactúan y generan los efectos en la planta, por lo que futuras investigaciones deberían realizar caracterizaciones moleculares en las raíces de las plantas para identificar los HFMA de la comunidad que están realizando la asociación.
- Los efectos benéficos de la inoculación con el consorcio comercial de HFMA sobre la fisiología de las plantas de cacao bajo estrés con Cd-Zn, indican la alta capacidad de aclimatación de algunos miembros de esta comunidad de HFMA, por lo que futuros estudios podrían evaluar en condiciones in vitro esta característica de aclimatación de hongos de MC e identificar qué aspectos fisiológicos, bioquímicos o moleculares son los que se ven afectados al someterse a una condición de estrés por Cd y Zn.
- Futuros trabajos también deberían evaluar otras estrategias de mitigación como la aplicación de enmiendas u otros microorganismos que inmovilicen el Cd y el Zn en el suelo.

6. Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Caracterización de perfiles de los suelos con alto y bajo contenido de Cd.

| Type | Perfil | Profundidad | Descripción |
|----------------------------|---|------------------|--|
| B-Cd-Zn: Typic dystrodepts |  | Ap (0-20 cm) | Color en húmedo pardo oscuro (2.5 YR 4/2); textura franco arcillosa; estructura en bloques subangulares, fina y media, moderada; consistencia en húmedo friable, en mojado no pegajosa, plástica, frecuentes poros muy finos y finos, pocos medianos; frecuentes raíces finas y medianas; frecuente actividad de macroorganismos; limite difuso; pH: 7.1. |
| | | Bw (20-53 cm) | Color en húmedo pardo oscuro (2.5 YR 5/2); textura franco arcillosa; estructura en bloques subangulares, media, moderada; consistencia en húmedo friable, en mojado no pegajosa, plástica, frecuentes poros finos; frecuentes raíces muy finas y finas; no actividad de macroorganismos; limite abrupto, ondulado; pH: 7.0 |
| | | C (53-72 cm) | Color en húmedo amarillo oscuro (10 YR 5/2); textura franco arcillosa; estructura en bloques subangulares, media, moderada; consistencia en húmedo friable, en mojado no pegajosa, plástica, pocos poros finos; frecuentes raíces muy finas y finas; no actividad de macroorganismos; pH: 6.5 |
| A-Cd-Zn: Typic udorthents |  | Ap (0-20 cm) | Color en húmedo pardo grisáceo muy oscuro (10 YR 3/2); textura franco arcillosa; frecuente gravilla y cascajo (30%). Irregular, sin alteración; estructura granular muy fina, moderada; consistencia en húmedo muy friable, en mojado pegajosa, plástica; muchos poros medianos y gruesos; frecuentes raíces finas y medianas y pocas raíces gruesas, vivas; baja actividad de macroorganismos; pH: 5.9 |
| | | C (20-50 cm) | Color en húmedo pardo grisáceo muy oscuro (10 YR 2/2); textura franco arcillo arenosa; mucha gravilla (40%) y pedregón (40%), irregular, sin alteración; sin estructura (suelta), consistencia en húmedo muy friable, en mojado ligeramente pegajosa, ligeramente plástica; pocos poros finos y medianos; pocas raíces medias, vivas y muertas; poca actividad de macroorganismos; limite claro e irregular; pH: 5.6 |

Tabla suplementaria 2. Correlación de Pearson de los morfoespecies encontrados con las dimensiones del ACP. En negrilla se destacan los que se vieron representados en mayor proporción en cada dimensión ($R^2 > 0,5$).

| Morfoespecie | Dim,1 | Dim,2 | Dim,3 |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------|
| <i>Glomus microcarpum</i> | 0,10 | 0,51 | 0,01 |
| <i>Glomus atrouva</i> | 0,31 | 0,10 | 0,34 |
| <i>Glomus Sinuosum</i> | 0,61 | 0,07 | 0,01 |
| <i>Rhizoglofus fasciculatum</i> | 0,67 | 0,01 | 0,08 |
| <i>Rhizoglofus sp.</i> | 0,60 | 0,02 | 0,01 |
| <i>Glomus microaggregatum</i> | 0,09 | 0,45 | 0,37 |
| <i>Claroideoglofus sp. 1</i> | 0,72 | 0,01 | 0,01 |
| <i>Claroideoglofus etunicatum</i> | 0,71 | 0,01 | 0,02 |
| <i>Funneliformis mosseae</i> | 0,44 | 0,02 | 0,04 |
| <i>Acaulospora sp. 1</i> | 0,42 | 0,06 | 0,05 |
| <i>Acaulospora sp. 2</i> | 0,42 | 0,07 | 0,08 |
| <i>Diversispora spurca</i> | 0,62 | 0,09 | 0,02 |
| <i>Glomus aureum</i> | 0,83 | 0,01 | 0,01 |
| <i>Glomus sp.1</i> | 0,78 | 0,02 | 0,01 |
| <i>Glomus sp.2</i> | 0,81 | 0,01 | 0,04 |
| <i>Glomus sp.3</i> | 0,71 | 0,01 | 0,06 |
| <i>Claroideoglofus sp.2</i> | 0,76 | 0,01 | 0,01 |
| <i>Claroideoglofus drumondii</i> | 0,60 | 0,02 | 0,02 |
| <i>Funneliformis verriculosos</i> | 0,20 | 0,10 | 0,25 |
| <i>Acaulospora colombiana</i> | 0,77 | 0,01 | 0,01 |
| <i>Acaulospora mellea</i> | 0,80 | 0,02 | 0,01 |
| <i>Ambispora sp.</i> | 0,69 | 0,03 | 0,01 |
| <i>Acaulospora foveata</i> | 0,18 | 0,25 | 0,36 |

Tabla suplementaria 3. Caracterización fisicoquímica de suelos usados para crecer los dos genotipos de cacao. Suelo con contenidos bajos Cd y Zn o suelo control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Cd y Zn (ES), antes de realizar el manejo agronómico y a los 90 días después de siembra (DAS).

| Time | Soil type | CO | NT | K | Ca | Mg | Na | Al | CICE | P | B | Cu | Fe | Mn | Zn | Cd-d | Cd-t | pH | Texture |
|-------------------|-----------|------|------|----------|------|------|------|------|------|---|-----|------|------|------|------|-------|-------|-----|---------|
| | | % | | meq/100g | | | | | | mg/kg | | | | | | 1:1 | | | |
| Before management | CS | 5.77 | 0.5 | 0.39 | 1.32 | 0.21 | 0.06 | 4.13 | 6.1 | 18 | 0.3 | 0.71 | 132 | 0.39 | 5.57 | <0.1 | 0.8 | 4.8 | FAr |
| | ES | 6.98 | 0.6 | 0.31 | 28.2 | 2.19 | 0.04 | 0 | 30.7 | 108 | 0.4 | 4.08 | 244 | 31.7 | 78.9 | 20.9 | 27.3 | 6.1 | FAr |
| P-value | | ND | | *** | | | | | | | | | | | | | | | |
| 90 DAS | CS | 8.4 | 0.73 | 1.22 | 14.2 | 3.88 | 0.2 | 0.3 | 19.5 | >116 | 0.4 | 0.74 | 62.4 | 6.44 | 9.1 | <0.10 | 1.5 | 6.4 | FAr |
| | ES | 12.5 | 1.08 | 1.02 | 17.2 | 1.75 | 0.06 | 0.7 | 21.3 | >116 | 0.4 | 5.43 | 180 | 19.5 | 123 | 24.0 | 30.85 | 5 | FAr |
| P-value | | *** | ns | ns | ns | *** | ns | *** | ns | ND | ns | *** | *** | *** | *** | ND | *** | *** | |
| CTC | | | | | | | | | | >8 ^a >300 ^b >50 ^c >33 ^d >6 ^e | | | | | | | | | |

CO: Carbono orgánico; NT: Nitrógeno total; Al: Acidez intercambiable; CICE: Capacidad de intercambio catiónico efectiva; Cd-t: Cadmio total; Cd-d: Cadmio disponible; FAr: Franco-arcillosa. CTC: Concentración crítica toxica en suelo reportado para: ^a cacao (V. L. Souza et al., 2014); ^b especies anuales y perennes (Suresh, 2005); ^c revisión de varias especies (El-Jaoual & Cox, 1998; Millaleo et al., 2010); ^d cacao (Cruz et al., 2015); ^e cacao (Jacome & Rodríguez, 2017). Asteriscos indican p-values (***: <0.001; ns, >0.05; ND, no determinado) del análisis de variancia correspondientes a las diferencias entre tipos de suelo (n=4). El manejo agronómico consistió en la fertilización edáfica con 80 g por planta de 16-6-18-2 (Remital®) en CS y ES. Únicamente CS fue encalado con 6.8 ton Ha⁻¹ de cal dolomítica para corregir la toxicidad por aluminio.

Tabla suplementaria 4. Correlación de Pearson en el contenido de nutrientes bivalentes de hojas en plantas de cacao de los genotipos IMC67 y PA121 a los 133 días después de siembra crecidas en suelo con concentración baja de Zn y Ca o suelo control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Cd y Zn (ES).

| Element | Cd | Ca | Mg | Cu | Fe | Mn | Zn |
|-----------|-----------------|----------------|-----------------|--------------|------|----------------|----|
| Cd | 1 | | | | | | |
| Ca | 0.7** | 1 | | | | | |
| Mg | -0.96*** | -0.65** | 1 | | | | |
| Cu | 0.01 | 0.01 | 0.07 | 1 | | | |
| Fe | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.7** | 1 | | |
| Mn | 0.82*** | 0.44* | -0.8*** | 0.727 | 0.27 | 1 | |
| Zn | 0.84*** | 0.5* | -0.79*** | 0.33 | 0.3 | 0.98*** | 1 |

Asteriscos indican el nivel de significancia de la correlación (p-valores: *, <0.05; **, <0.01; ***, <0.001)

Tabla suplementaria 5. Análisis de varianza del verdor de hojas en unidades según su posición en la planta (1; hoja más joven a 7: hoja más antigua) a los 133 días después de siembra (DAS).

| Figure | Leaf position | Factor | DAS |
|--------------|---------------|--------|-----|
| | | | 133 |
| 2. Greenness | 1 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | *** |
| | 2 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | *** |
| | 3 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | ns |
| | 4 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | *** |
| | 5 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | ns |
| | 6 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | ns |
| | 7 | S | *** |
| | | G | *** |
| | | SxG | ns |

P-valores son generados por tipo de suelo (S), genotipo (G) e interacción de los factores (SxG) en cada hoja según su posición en la planta. Asteriscos indican el nivel de significancia (p-valores: ***, <0.001; ns, >0.05).

Tabla suplementaria 6. Análisis de varianza de variables asociadas a la fluorescencia de la clorofila a (Máximo rendimiento cuántico del fotosistema II: F_v/F_m ; Tasa de transporte de electrones: ETR; *quenching* fotoquímico: qP; y *quenching* no fotoquímico: NPQ) y parámetros de crecimiento (Masa total de la planta: TMP; área foliar: LA; y número de hojas: LN) en cada tiempo de muestreo (días después de siembra: DAS).

| Figure | Variable | Facto r | DAS | | |
|-------------------------------|----------|------------|-----|-----|-----|
| | | | 60 | 98 | 133 |
| 3. Chlorophyll a fluorescence | Fv/Fm | S | ns | *** | *** |
| | | G | ns | Ns | *** |
| | | SxG | ns | Ns | *** |
| | ETR | S | *** | *** | *** |
| | | G | ns | Ns | *** |
| | | SxG | ns | Ns | ns |
| | qP | S | *** | ** | *** |
| | | G | ns | Ns | ns |
| | | SxG | ns | * | ns |
| NPQ | S | *** | *** | * | |
| | G | ns | Ns | ns | |
| | SxG | ns | Ns | ns | |
| 4. Plant growth | TMP | S | *** | *** | *** |
| | | G | ns | Ns | ns |
| | | SxG | ns | Ns | ns |
| | LA | S | *** | Ns | *** |
| | | G | ns | Ns | ns |
| | | SxG | ns | Ns | ns |
| | LN | S | *** | *** | * |
| | | G | ns | *** | *** |
| | | SxG | *** | Ns | ** |

P-valores son generados por tipo de suelo (S), genotipo (G) e interacción de los factores (SxG) en cada tiempo de muestreo. Asteriscos indican el nivel de significancia (*p*-valores: ***, <0.001; **, <0.01; *, <0.001; ns, >0.05).

Tabla suplementaria 7. Caracterización fisicoquímica de suelos usados para crecer las plantas de cacao. Suelo control con altos contenidos de Cd y Zn (ES) antes de realizar el manejo agronómico mediante fertilización química.

| Soil | CO | NT | K | Ca | Mg | Na | Al | CICE | P | B | Cu | Fe | Mn | Zn | Cd-d | Cd-t | pH | Zn/Cd | Texture |
|------|-----|-----|----------|----|-----|-----|-----|------|-------------------------|-----|-----|-------|------|-----|------|------|-----|-------|---------|
| | % | | meq/100g | | | | | | mg/kg | | | | | | 1:01 | | | | |
| ES | 5.7 | 0.5 | 7 | 25 | 2.5 | 0.5 | 0.7 | 23.8 | >116 | 8.1 | 4.9 | 154.8 | 35.6 | 218 | 25.7 | 27.3 | 4.7 | 8.5 | FAr |
| CTC | | | | | | | | | >8a >300b >50c >33d >6e | | | | | | | | | | |

Carbono orgánico; NT: Nitrógeno total; CICE: Capacidad de intercambio catiónico efectiva; Cd-t: Cadmio total; Cd-d: Cadmio disponible; FAr: Franco-arcillosa. CTC: Concentración crítica toxica en suelo reportado para: ^a cacao (V. L. Souza et al., 2014); ^b especies anuales y perennes (Suresh, 2005); ^c revisión de varias especies (El-Jaoual & Cox, 1998; Millaleo et al., 2010); ^d cacao (Cruz et al., 2015); ^e cacao (Jacome & Rodríguez, 2017).

Tabla suplementaria 8. Factor de transferencia (TF) y extracción total de metales (E) por plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (C: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: producto comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT.

| Factor | Level | Cd | | Zn | |
|----------|-------|---------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| | | TF | E (mg plant ⁻¹) | TF | E (mg plant ⁻¹) |
| Genotype | IMC67 | 1,81 ± 0,28 a | 3,08 ± 0,68 a | 2,06 ± 0,38 a | 21,87 ± 5,24 a |
| | CAU43 | 1,91 ± 0,31 a | 2,63 ± 0,40 b | 1,81 ± 0,37 a | 18,59 ± 2,66 b |
| HFMA | C | 1,98 ± 0,32 a | 2,70 ± 0,61 a | 1,90 ± 0,48 ab | 17,34 ± 3,30 a |
| | ML | 1,76 ± 0,17 a | 2,66 ± 0,55 a | 1,69 ± 0,30 b | 20,39 ± 3,76 a |
| | MH | 1,80 ± 0,43 a | 3,03 ± 0,61 a | 1,99 ± 0,27 ab | 21,32 ± 5,84 a |
| | MC | 1,87 ± 0,17 a | 3,04 ± 0,62 a | 2,23 ± 0,36 a | 21,87 ± 3,61 a |
| G | | ns | * | ns | * |
| M | | ns | ns | * | ns |
| GxM | | ns | ns | ns | ns |

Asteriscos indican *P*-values (***, <0.001; ns, >0.05; ND, no determinado) del análisis de variancia descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Valores indican la media ± SE (n=7) y letras iguales no son significativamente diferentes a *p*<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

7. Figuras suplementarias

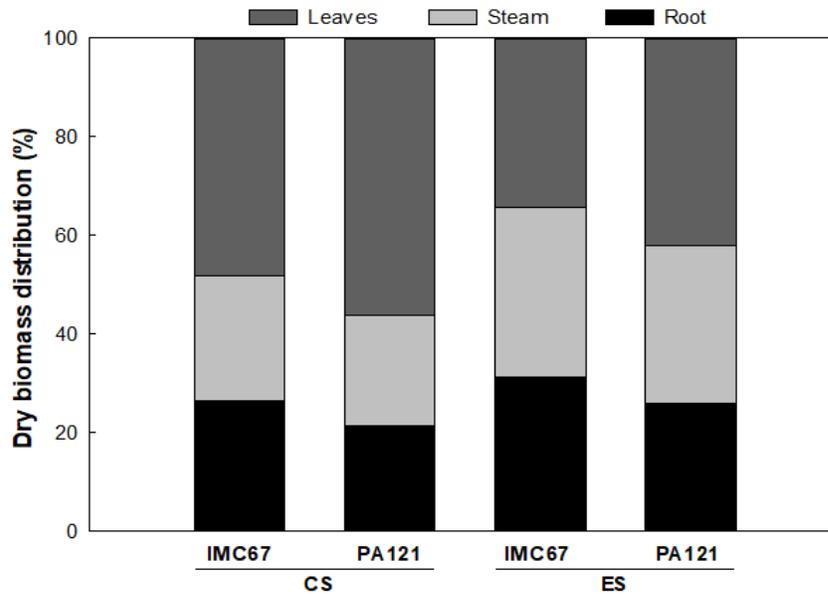


Figura suplementaria 1. Distribución de masa seca de dos genotipos de cacao (IMC67 y PA121) crecidos en suelo con concentraciones bajas de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES) a los 133 días después de siembra (n=16).

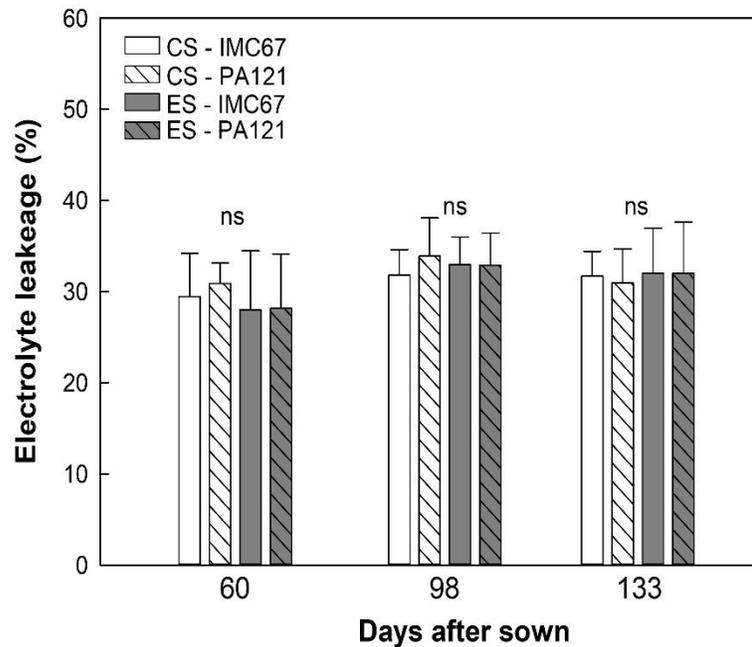


Figura suplementaria 2. Perdida de electrolitos en hojas de dos genotipos de cacao (IMC67 y PA121) crecidos en suelos con contenidos bajos de Zn y Cd o control (CS) y suelo naturalmente enriquecido con Zn y Cd (ES). Barras representan la media \pm SD (n=16). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

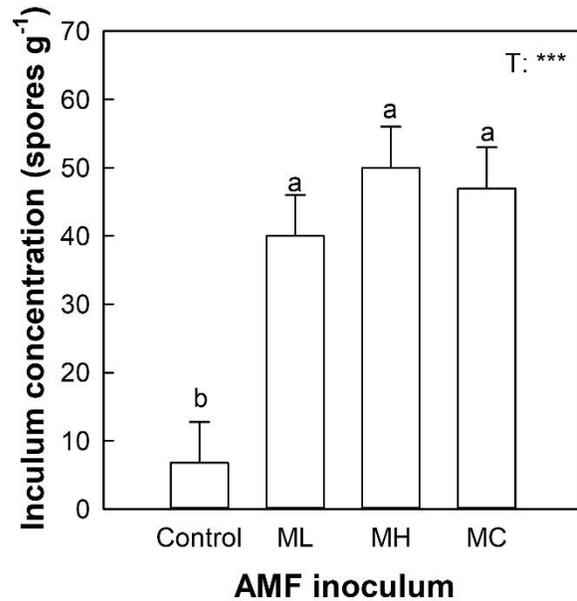


Figura suplementaria 3. Concentración de los inóculos de HFMA utilizados (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA). P valores del análisis de varianza son descritos por: tratamiento (T). Las barras indican la media \pm SD (n=10). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

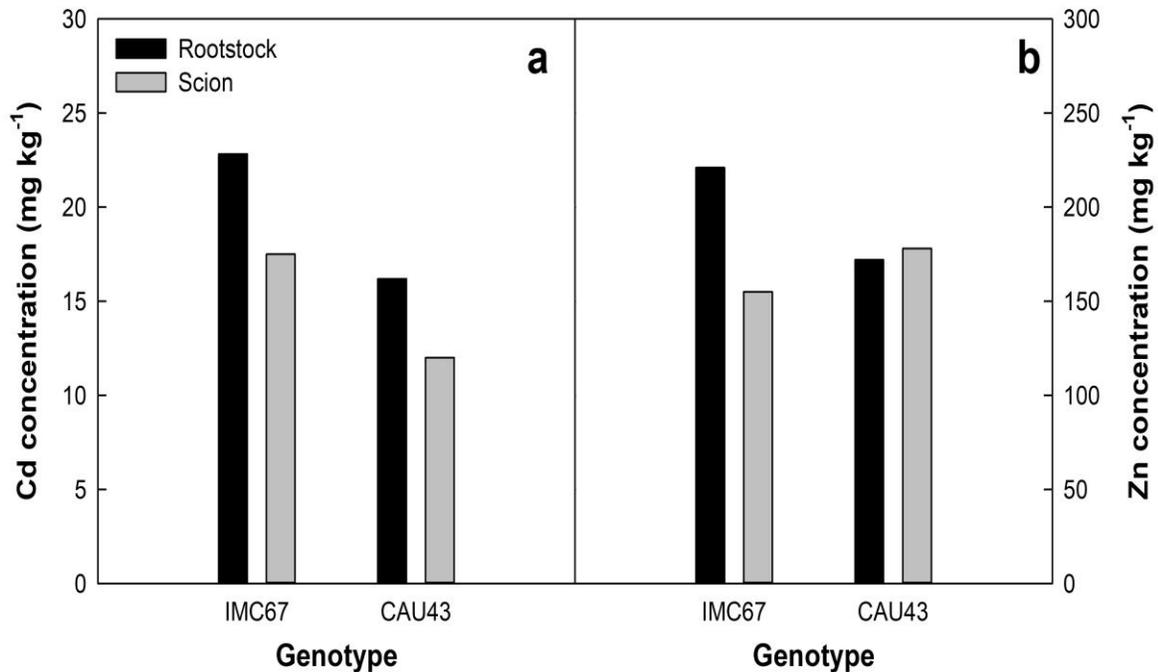


Figura suplementaria 4. Concentración de Cd (a) y Zn (b) en los tejidos de copa y patrón de plantas de cacao (IMC67 y CAU43, ambas injertadas con FSV41 a los 164 días después de siembra) antes de trasplantar a los diferentes tratamientos con HFMA y Cd (ODDT), n=1.

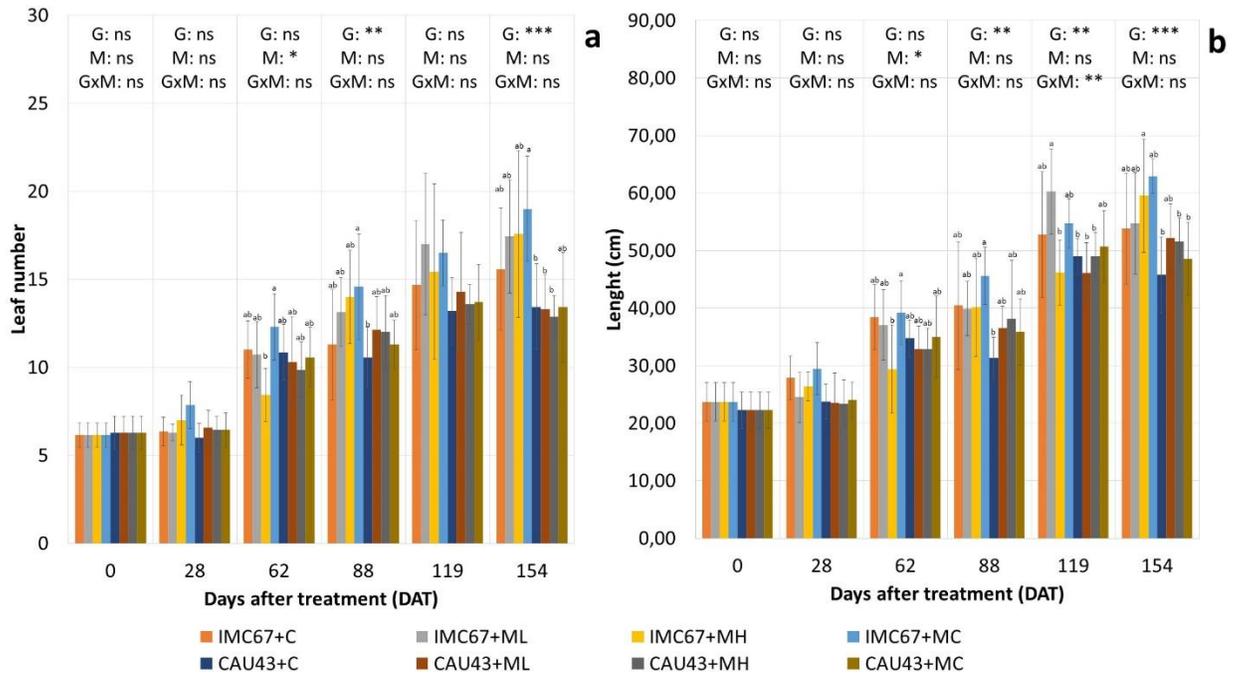


Figura suplementaria 5. Numero de hojas (a) y longitud aérea (b) de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. P valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media ± SE (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a p<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

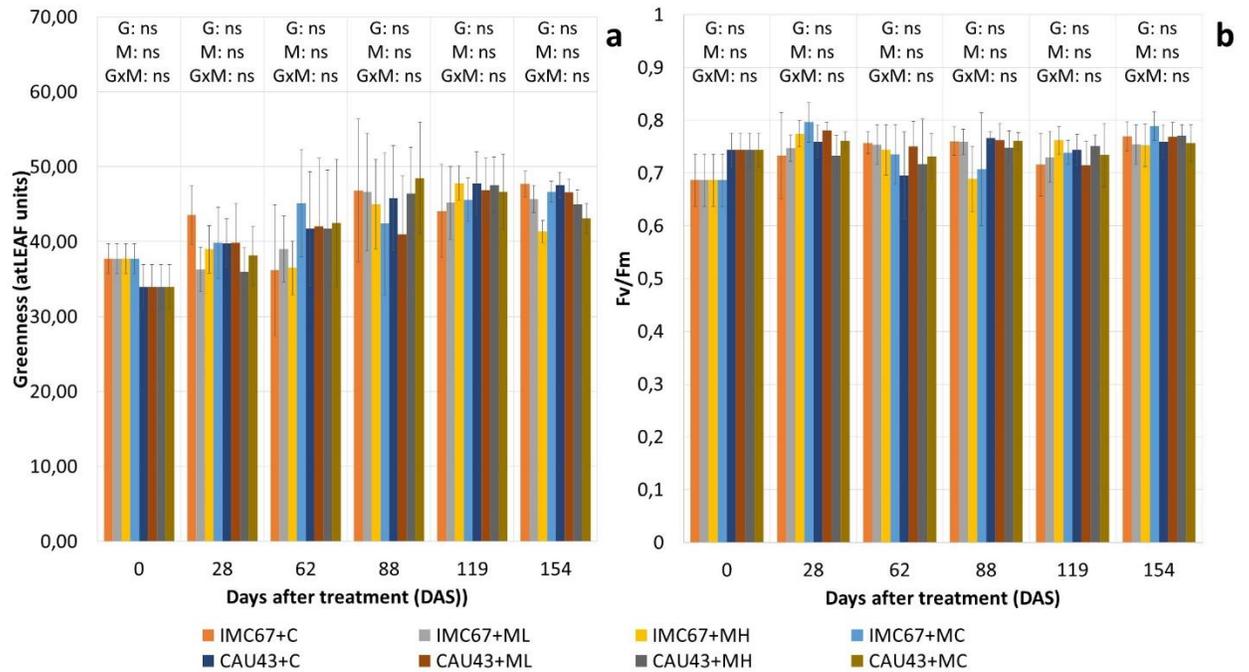


Figura suplementaria 6. Verdor (a) y máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (Fv / Fm) (b) en la segunda hoja totalmente expandida de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (Control: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo con bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. P valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media ± SE (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a p<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

concentraciones de Cd; MC: inóculo comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media ± SE (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a *p*<0.05 de acuerdo a la prueba de Tukey.

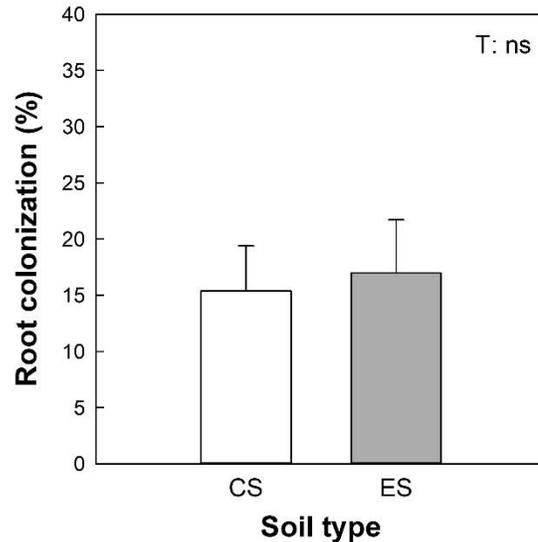


Figura suplementaria 7. Colonización de la raíz por HFMA en plantas de cacao de cinco años en condiciones naturales establecidas en un suelo sin (CS) enriquecimiento de metales (0,8 mg kg⁻¹ Cd y 17 mg kg⁻¹ Zn); y enriquecido (ES) con Cd y Zn (26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn). *P* valores del análisis de varianza son descritos por: tratamiento (T). Las barras indican la media ± SE (n=16).

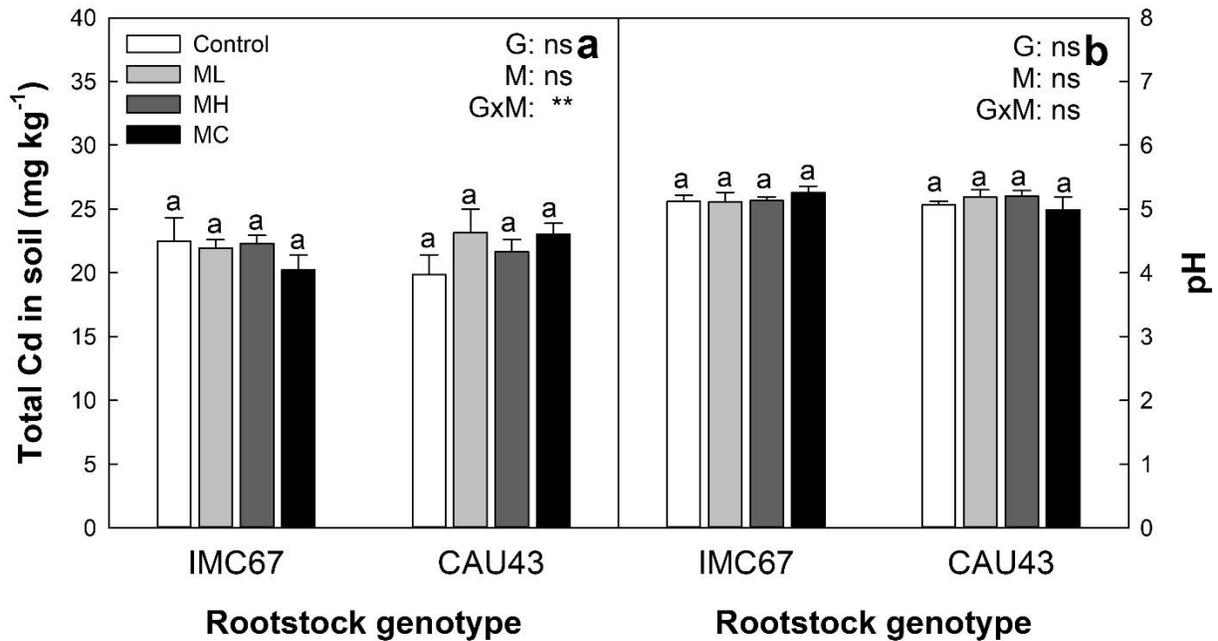


Figura suplementaria 8. Contenido total de Cd (a) y pH del suelo en el que fueron crecidas plantas de cacao (IMC67 y CAU43) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (C: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: producto comercial de HFMA). *P* valores del análisis de

varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media \pm SE (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

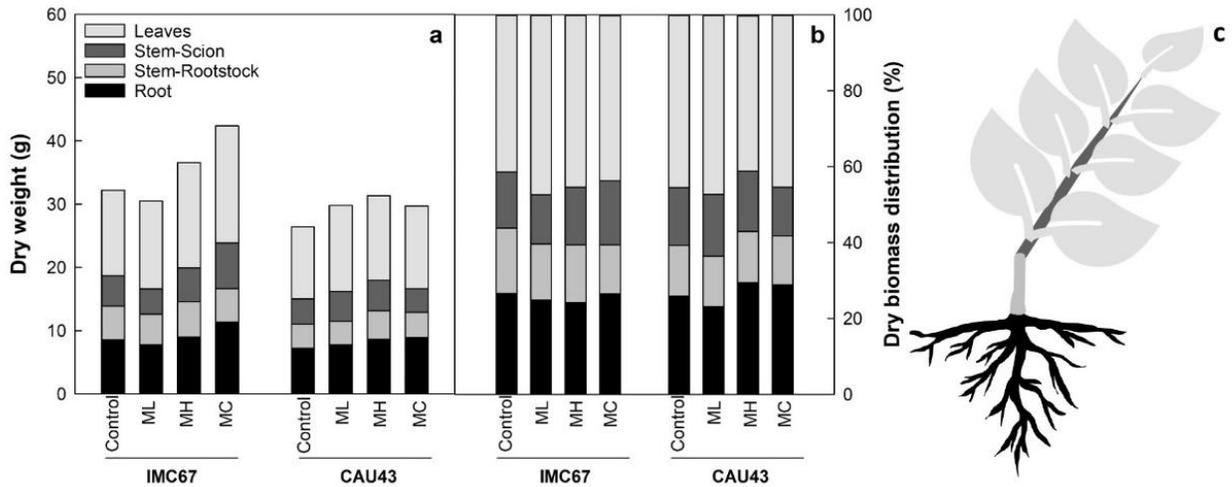


Figura suplementaria 9. Peso seco por órgano (a) y distribución de materia seca total (b) de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (C: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: producto comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. Representación gráfica de los diferentes tejidos analizados (c). Las barras indican la media (n=7). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

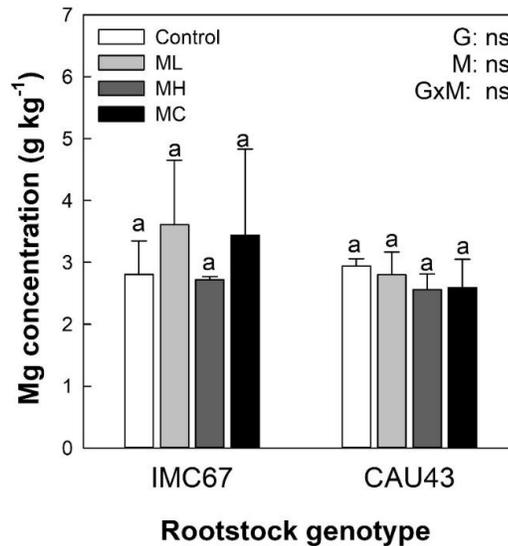


Figura suplementaria 10. Contenido de Mg en hojas de plantas de cacao (IMC67 y CAU43 injertados con FSV41) inoculadas con diferentes tratamientos de HFMA (C: sustrato estéril; ML: HFMA de suelo bajas concentraciones de Cd; MH: HFMA de suelo con altas concentraciones de Cd; MC: producto comercial de HFMA) y crecidas en un suelo enriquecido naturalmente con 26 mg kg⁻¹ Cd y 218 mg kg⁻¹ Zn a los 154 DDT. *P* valores del análisis de varianza son descritos por: Genotipo (G), Inoculación con HFMA (M) e interacción (GxM). Las barras indican la media \pm SD (n=4). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey

8. Bibliografía

- Abd-Allah, E. F., Abeer, H., & Alqarawi, A. A. (2016). Mitigation of cadmium induced stress in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) by selenium. *Pakistan Journal of Botany*, 48(3), 953–961.
- Aghababaei, F., & Raiesi, F. (2015). Mycorrhizal fungi and earthworms reduce antioxidant enzyme activities in maize and sunflower plants grown in Cd-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 86, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.009>
- Aguirre, W., Fischer, G., & Miranda, D. (2011). Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 141–153.
- Aloui, A., Dumas-gaudot, E., Daher, Z., Tuinen, D. Van, Aschi-smit, S., & Morandi, D. (2012). Plant Physiology and Biochemistry Influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on cadmium induced *Medicago truncatula* root isoflavonoid accumulation. *Plant Physiology et Biochemistry*, 60, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.014>
- Antonioli, Z. I., Facelli, E., Miller, D., & Smith, S. E. (2002). Spore communities of arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhizal association in different ecosystems, South Australia. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 26(1), 627–635.
- Arévalo-gardini, E., Arévalo-hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 606, 792–800.
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Audet, P., & Charest, C. (2007). Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: Meta-analytical and conceptual perspectives. *Environmental Pollution*, 147, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.006>
- Barea, J., Gryndler, M., Lemanceau, P., Schuepp, H., & Azcon, R. (2002). The rhizosphere of mycorrhizal plants. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, 1–19.
- Barraza, F., Schreck, E., Leveque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., ... Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950–963.
- Benavides, M., Gallego, S., & Tomaro, M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazi. J. Plant Physiol.*, 17(1), 21–34. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- Bhalerao, S. A. (2013). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: a potential biotechnological tool for phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *International Journal of Science and Nature*, 4(1), 1–15.
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1175–1194. <https://doi.org/10.1111/jam.13698>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115.

<https://doi.org/10.1111/nph.14976>

- Brundrett, M., Piche, Y., & Peterson, R. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 62, 2128–2134.
- Bui, V. C., & Franken, P. (2018). Acclimatization of Rhizophagus irregularis Enhances Zn Tolerance of the Fungus and the Mycorrhizal Plant Partner. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03156>
- Cabral, L., Soares, C. R. F. S., Giachini, A. J., & Siqueira, J. O. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1918-y>
- Carrillo, I., Mejía, B., & Franco, H. (1994). *Manual de laboratorio para análisis foliares*. Chinchiná, Colombia: CENICAFE.
- Carvalho, L. M., Casador, I., & Martins-Lousao, M. A. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant and Soil*, 285(1–2), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9001-y>
- Chagnon, P., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science*, 18(9), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.001>
- Chanda, D., Sharma, G. D., & Jha, D. K. (2014). Isolation and identification of some Arbuscular Mycorrhiza (AM) fungi for phytoremediation in soil contaminated with paper mill effluent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 527–539.
- Chaux, M. A., & Pérez, M. A. (2017). *¿Nuevos caminos para los cacaos especiales de Colombia? Una experiencia desde el proyecto Coexca 2012 - 2017*. Bogotá, Colombia: Fundación Swisscontact Colombia.
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Choi, Y. E., & Harada, E. (2005). Roles of calcium and cadmium on Cd-containing intra- and extracellular formation of Ca crystals in tobacco. *Journal of Plant Biology*, 48(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/BF03030570>
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., ... Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(5), 374–391. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.903747>
- Clough, Y., Faust, H., & Tschardtke, T. (2009). Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conservation Letters*, 2(5), 197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2009.00072.x>
- Coccina, A., Cavagnaro, T. R., Pellegrino, E., Ercoli, L., & McLaughlin, M. J. (2019). The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain. *BCM Plant Biology*, 19, 133. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1741-y>
- Cornejo, P., Pérez-Tienda, J., Meier, S., Valderas, A., Borie, F., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2013). Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 925–928. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.031>
- Crespo, del C. E., & Crespo, A. (1997). *Cultivo y Beneficio del cacao CCN51*. Quito: El Conejo.

- Cruz Neto, R. de O., Souza Júnior, J. O., Sodré, G. A., & Baligar, V. C. (2015). Growth and Nutrition of Cacao Seedlings Influenced By Zinc Application in Soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4), 1053–1064. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-238/14>
- Dalcorso, G., Manara, A., & Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: From roots to shoots. *Metallomics*, 5(June), 1117–1132. <https://doi.org/10.1039/c3mt00038a>
- Davison, J., Ainsaar, L., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., ... Zobel, M. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251), 970–973. <https://doi.org/10.5061/dryad.2m15n>
- Del Val, C., Barea, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (1999). Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 718–723.
- Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonzalves, B., & Santos, C. (2014). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologia Plantarum*, (June), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1167-8>
- Droh, G., Kouassi, A. B., Kouadjo, C., Zeze, A., Nguetta, A. S., & Sanders, I. R. (2016). Effect of two AMF on growth of cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) in greenhouses. *Global Journal of Advanced Research*, 3(3), 157–164. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/301614323_Effect_of_two_AMF_on_growth_of_cocoa_seedlings_Theobroma_cacao_L_in_greenhouses
- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., & Chakrabarty, D. (2018). Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1169–1192. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0741-8>
- Edelstein, M., & Ben-Hur, M. (2018). Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 234(June 2017), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- Egas, J. J., & De Salvo, C. P. (2018). *Agricultural Support Policies in Latin America and the Caribbean: 2018 Review*. Washington, DC, United States. <https://doi.org/10.18235/0001191>
- El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Emamveridian, A., Ding, Y., Mokhberdorran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Tropical Agriculture Research*, 25(4), 27–54. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*, 678, 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- Ezedom, T., & Asagba, S. O. (2016). Effect of a controlled food-chain mediated exposure to cadmium and arsenic on oxidative enzymes in the tissues of rats. *Toxicology Reports*, 3, 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.07.002>
- FAO, & OMS. (2014). Proposed draft maximum levels for cadmium in chocolate and cocoa-derived products. *Programa Conjunto Fao/Oms Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Contaminantes De Los Alimentos, Item 6(2014)*, 20.
- Fedecacao. (2015). *Guía técnica para el cultivo del Cacao* (Sexta edic, Vol. 6). Bogotá, Colombia.
- Ferrol, N., Tamayo, E., & Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6253–6565. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw403>
- FHIA. (2005). Guía práctica. PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CACAO POR INJERTO / Proyecto Control de la Moniliasis. *Fundación Hondureña De Investigación Agrícola*.
- FINAGRO. (2018). *Inteligencia de mercado: Cacao*. Retrieved from

https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_cacao_version_ii.pdf

- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Galán Huertos, E., & Romero Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10, 48–60. <https://doi.org/10.1520/C0033-03>
- Garg, N., & Bhandari, P. (2014). Cadmium toxicity in crop plants and its alleviation by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi: An overview. *Plant Biosystems*, 148(4), 609–621. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.788096>
- Garg, N., Singh, S., & Kashyap, L. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal tolerance in plants: An insight into physiological and molecular mechanisms. In *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration: Fourth Edition* (pp. 75–97). https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_4
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Girma, G. (2015). Microbial Bioremediation of Some Heavy Metals in Soils: an Updated Review. *Indian J.Sci.Res.*, 6(1), 147–161.
- Gómez, J., Nivia, Á., Montes, N. E., Almanza, M. F., Alcárcel, F. A., & Madrid, C. A. (2015). *Compilando la geología de Colombia: Una visión a 2015*. Imprenta Nacional de Colombia.
- González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., Wright, S. F., & Nichols, K. A. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>
- Goto, B. T., & Jobim, K. (2019). Laboratório de Biologia de Micorrizas. Retrieved from <http://glomeromycota.wixsite.com/lbmicorrizas>
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Paniagua, J. C., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2016). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, 580, 677–686.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Gransee, A., & Führs, H. (2013). Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant and Soil*, 368(1–2), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1567-y>
- Hafeez, B., Khanif, Y. M., & Saleem, M. (2013). Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2), 374–391. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2013/2746>
- Hancock, L. M. S., Ernst, C. L., Charneskie, R., & Ruane, L. G. (2012). Effects of cadmium and mycorrhizal fungi on growth, fitness, and cadmium accumulation in flax (*Linum usitatissimum*; Linaceae). *American Journal of Botany*, 99(9), 1445–1452. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100497>
- Hart, M. M., Reader, R. J., & Klironomos, J. N. (2001). Life-History Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Relation to Their Successional Dynamics. *Mycological Society of America*, 93(6), 1186. <https://doi.org/10.2307/3761678>
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X.-Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z.-Y. (2017). Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress—A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2018). *Plants under metal and metalloids stress:*

Responses, tolerance and remediation. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2242-6>

- Hassan, S., Boon, E., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology*, 20, 3469–3483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x>
- Hassan, S., Hijri, M., & St-Arnaud, M. (2013). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *J Environ Radioact*, 115(6), 151–156. [https://doi.org/S0265-931X\(12\)00203-2](https://doi.org/S0265-931X(12)00203-2) [pii]n10.1016/j.jenvrad.2012.08.004
- Hazard, C., Gosling, P., Gast, C. J. Van Der, Mitchell, D. T., Doohan, F. M., & Bending, G. D. (2012). The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal*, 7(3), 498–508. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.127>
- He, L., Yang, H., Yu, Z., Tang, J., Xu, L., & Chen, X. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungal phylogenetic groups differ in affecting host plants along heavy metal levels. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(10), 2034–2040. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.013>
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., & Baligar, V. C. (2015). *Soil Biogeochemistry, Plant Physiology, and Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils*. *Advances in Agronomy* (Vol. 134). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
- He, S., Yang, X., Zhenli, H., & Virupax, B. (2017). Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity: A Review. *Pedosphere*, 27(3), 421–438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- He, Z. L., Yang, X. E., & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, 19, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hermes-Lima, M. (2005). *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism*. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
- Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.023>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, 2012(Cd), 1–37. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Huamaní, H., Huauya, M., Mansilla, M., Florida, N., & Neira, G. (2012). Presence of heavy metals in organic cacao (*Theobroma cacao* L.) crop. *Acta Agronómica*, 61(4), 339–344.
- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., Lai, C., Bashir, H., ... Wan, J. (2017). Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta*, 245(5), 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2664-1>
- ICCO. (2016). *What makes Europe an interesting market for fine flavour cocoa?*
- ICCO. (2019). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Production of cocoa* (Vol. XLV). <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>
- IGAC. (2000). *Estudio general de suelos y zonificación de tierras del departamento de Cundinamarca*. Bogotá, Colombia: CARTOPRINT Ltda.
- Jacome, D., & Rodriguez, A. (2017). *EFEECTO DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (HFMA) SOBRE UN SISTEMA SUELO- PLANTA EN SUELOS CONTAMINADOS CON CADMIO EN ETAPA DE VIVERO*.
- Jaimez, R. E., Puyutaxi, F. A., Vasco, A., Loor, R. G., Tarqui, O., Quijano, G., ... Tezara, W. (2018). Photosynthetic response to low and high light of cacao growing without shade in an area of low evaporative demand. *Acta Biol. Colomb*, 2323(11), 95–103. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.64962>
- Jalmi, S. K., Bhagat, P. K., Verma, D., Noryang, S., & Tayyeba, S. (2018). Traversing the

Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling, 9(February), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>

- Janoušková, M., Pavlíková, D., & Vosátka, M. (2006). Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere*, 65(11), 1959–1965. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.007>
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jentschke, G., Susanne, W., & Godbold, D. L. (1999). Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedling. *Tree Physiology*, (1993), 23–30. Retrieved from papers3://publication/uuid/6B7665B0-F91B-4BE1-8DD8-15A0B7A51EBD
- Jiang, Q.-Y., Zhuo, F., Long, S.-H., Zhao, H.-D., Yang, D.-J., Ye, Z.-H., ... Jing, Y.-X. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Scientific Reports*, 6(February), 21805. <https://doi.org/10.1038/srep21805>
- Jiménez Tobón, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+Limpia*, 10(1), 89–104.
- Kabata-Pendias, A., & Barbara, S. (2015). *Trace elements in abiotic and biotic environments*. 感染症誌 (Vol. 91).
- Kassambara, A. (2017). *Practical Guide to Principal Component Methods in R. Principal component methods in R: Practical guide*. STHDA. Retrieved from <http://www.analyticsvidhya.com/blog/2016/03/practical-guide-principal-component-analysis-python/>
- Kaur, H., & Garg, N. (2018). Recent Perspectives on Cross Talk Between Cadmium, Zinc, and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 680–693. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9750-2>
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182(November 2017), 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>
- Khan, A. G. (2006). Mycorrhizoremediation--an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 7(7), 503–514. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0503>
- Khan, A. G., Kuek, C., Chaudhry, T. M., Khoo, C. S., & Hayes, W. J. (2000). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41(1–2), 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00412-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00412-9)
- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13772–13799. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>
- Khan, K., Lu, Y., Khan, H., Ishtiaq, M., Khan, S., Waqas, M., ... Wang, T. (2013). Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.014>
- Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., & Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., ... Bücking, H. (2011). Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, 333(6044), 880–883. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283097d0f>
- Kramer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Krishnamoorthy, R., Kim, C.-G., Subramanian, P., Kim, K.-Y., Selvakumar, G., & Sa, T.-M.

- (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *PLoS One*, 10(6), e0128784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128784>
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiological Research*, 207(October 2017), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
 - Kumar, P., Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Kalunke, R. M., & Colla, G. (2015). Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), 477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00477>
 - Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., ... Dikshit, A. (2015). Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques* (pp. 335–359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>
 - Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 4(8), 269–285. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
 - Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 259–266. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.259>
 - Lanza, J., Churion, P., Liendo, N., & López, V. (2016). Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Santa Bárbara de Zulia, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente*, 28(1), 106–115.
 - Lasat, M. M., Baker, A. J. M., & Kochian, L. V. (1998). Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 118(3), 875–883. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.875>
 - Laycock, D. H. (1945). Preliminary investigations into the functions of the endotrophic mycorrhiza of *Theobroma cacao* L. *Tropical Agriculture, Trinidad*, 22, 77–80.
 - Lefèvre, I., Marchal, G., Corréal, E., Zanuzzi, A., & Lutts, S. (2009). Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation*, 59(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9382-z>
 - Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
 - Li, H., Luo, N., Zhang, L. J., Zhao, H. M., Li, Y. W., Cai, Q. Y., ... Mo, C. H. (2016). Do arbuscular mycorrhizal fungi affect cadmium uptake kinetics, subcellular distribution and chemical forms in rice? *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.124>
 - Lin, L., Yang, D., Wang, X., Liao, M., & Wang, Z. (2016). Effects of grafting on the cadmium accumulation characteristics of the potential Cd-hyperaccumulator *Solanum photeinocarpum*. *EnvironMonit Assess*, 188(82), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-5084-3>
 - Lin, Y. F., & Aarts, M. G. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3187–3206. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1089-z>
 - Liu, L., Gong, Z., Zhang, Y., & Li, P. (2014). Growth, cadmium uptake and accumulation of maize (*Zea mays* L.) under the effects of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology*, 23(10), 1979–1986. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1331-6>
 - Liu, L., Li, W., Song, W., & Guo, M. (2018). Science of the Total Environment Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils : Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, 633, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>
 - Liu, L. Z., Gong, Z. Q., Zhang, Y. L., & Li, P. J. (2011). Growth, Cadmium Accumulation and Physiology of Marigold (*Tagetes erecta* L.) as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere*, 21(3), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60132-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60132-X)

-
- Lopes Leal, P., Varón-López, M., Gonçalves de Oliveira Prado, I., Valentim dos Santos, J., Fonsêca Sousa Soares, C. R., Siqueira, J. O., & de Souza Moreira, F. M. (2016). Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.001>
 - López de Andrade, S., Jorge, R., & Dias da Silveira, A. (2005). Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola*, 62(4), 389–394. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400013>
 - Lora Silva, R., & Bonilla Gutiérrez, H. (2010). Remediation of a Soil Contaminated With the Heavy Metals Cadmium and Chromium on the High Basin of the Bogota River. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 61–70. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 - Luo, Z. Bin, He, J., Polle, A., & Rennenberg, H. (2016). Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: Paving the way for enhancing phytoremediation efficiency. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1131–1148. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.07.003>
 - Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., & White, P. J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
 - Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Kumar, M., Hussain, A., Wang, Q., ... Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>
 - Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316(5832), 1746–1748. <https://doi.org/10.1126/science.1143082>
 - Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., & Carvajal, M. (2010). Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.002>
 - Meier, S., Borie, F., Bolan, N., & Cornejo, P. (2012). Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(7), 741–775. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.528518>
 - Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). *Cadmium and cacao: a review of research and recommendations for minimising cadmium in cacao produced in Latin America*.
 - Millaleo, R., Reyes- Diaz, M., Ivanov, A. ., Mora, M. ., & Alberdi, M. (2010). Manganese As Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 470–481. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
 - Millar, N. S., & Bennett, A. E. (2016). Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 182(3), 625–641. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3673-7>
 - Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
 - Mobin, M., & Khan, N. A. (2007). Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164(5), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.003>
 - Molina, E. (1999). *Acidez y encalado de los suelos*.
 - Morton, J. B., Bentivenga, S. P., & Bever, J. D. (1995). Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes).

- Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 25–32. <https://doi.org/10.1139/b95-221>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
 - Murtaza, G., Javed, W., Hussain, A., Qadir, M., & Aslam, M. (2017). Soil-applied zinc and copper suppress cadmium uptake and improve the performance of cereals and legumes. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 199–206. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207605>
 - Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
 - Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10–25. <https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00>
 - Nayuki, K., Chen, B., Ohtomo, R., & Kuga, Y. (2014). Cellular Imaging of Cadmium in Resin Sections of Arbuscular Mycorrhizas Using Synchrotron Micro X-ray Fluorescence. *Microbes and Environments*, 29(1), 60–66. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13093>
 - Nazar, R., Iqbal, N., Massod, A., Iqbal, M., Khan, R., Syeed, S., & Khan, N. (2012). Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 03(10), 1476–1489. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178>
 - Obata, H., & Umebayashi, M. (1997). Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 20(1), 97–105. <https://doi.org/10.1080/01904169709365236>
 - Oehl, F., Laczko, E., Oberholzer, H.-R., Jansa, J., & Egli, S. (2017). Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils*, (July). <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1217-x>
 - Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., & Alves da Silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2(2), 191–199. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10>
 - Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
 - Olade, M. A. (1987). Dispersion of Cadmium, Lead and Zinc in Soils and Sediments of a Humid Tropical Ecosystem in Nigeria. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment* (pp. 303–313). John Wiley and Sons Ltd.
 - Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut*, 184, 105–126. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
 - Pagano, M. C., Persiano, A. I. C., Cabello, M. N., & Scotti, M. R. (2010). Elements sequestered by arbuscular mycorrhizal spores in riverine soils: A preliminary assessment. *Journal of Biophysics and Structural Biology*, 2(2), 16–21.
 - Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy*, 5(3), 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
 - Papoyan, A., Piñeros, M., & Kochian, L. V. (2007). Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02073.x>
 - Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. (2018). Effects of different metals on photosynthesis: Cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030787>

- Pawlowska, T. E., & Charvat, I. (2004). Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6643–6649. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6643-6649.2004>
- Pereira de Araújo, R., Furtado de Almeida, A. A., Silva Pereira, L., Mangabeira, P. A. O., Olimpio Souza, J., Pirovani, C. P., ... Baligar, V. C. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144(January), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
- Pérez Moncada, A. U., Gómez Ramírez, M., Ordoñez Serralde, D. P., Peñaranda Rolón, M. A., Wilches Ortiz, A. W., Ramírez, L., & Rengifo Estrada, A. G. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as a strategy to reduce the absorption of cadmium in cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *Terra Latinoamericana*, 37, 121–130. <https://doi.org/10.28940/tl.v37i2.479>
- Puentes-Páramo, Y. ., Menjivar-Flores, J. C., & Aranzazy-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnostico nutricional en cacao. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 329–336.
- Puentes-Páramo, Y., Menjivar-Flores, J., & Aranzazu-Hernández, F. (2016). Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnóstico nutricional en cacao. *Mesoamerican Agronomy*, 27(2), 329–336.
- Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S., & Abdin, M. Z. (2004). Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress. *Plant Science*, (167), 1171–1181.
- Ramtahal, G., Chang, I., Seegobi, D., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., & Harrynanan, L. (2015). Investigation of the Effects of Mycorrhizal Fungi on Cadmium Accumulation in Cacao. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society*, 48, 147–152.
- Reichman, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Environment*. Retrieved from http://www.plantstress.com/articles/toxicity_i/Metal_toxicity.pdf
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., ... Gianinazzi-Pearson, V. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1177–1185. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1177>
- Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Ibrahim, M., Tsang, D. C. W., Zia-ur-Rehman, M., ... Ok, Y. S. (2017). A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*, 182, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.013>
- Rizwan, M., Ali, S., Zia, M., & Maqbool, A. (2019). A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-019-04174-6>
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2014). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME Journal*, 9(5), 1053–1061. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.207>
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME Journal*, 9(5), 1053–1061. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.207>
- Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>
- Rodriguez, C. A., Chagas, E. A., Felipe, L., Almeida, P. De, Paul, J., Delgado, M., ... Sanchez, C. (2015). Genotype and Grafting Techniques Effects on Survival and Growth of Camu Camu Plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), 1–11.

- <https://doi.org/10.5539/jas.v7n6pxx>
- Rodríguez, S., & Henao, M. C. (2017). *Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca*.
 - Römheld, V. (2011). Diagnosis of Deficiency and Toxicity of Nutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (pp. 299–312). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00011-X>
 - Rucińska-Sobkowiak, R. (2016). Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2277-5>
 - Sanders, I. R., & Rodriguez, A. (2016). Aligning molecular studies of mycorrhizal fungal diversity with ecologically important levels of diversity in ecosystems. *ISME Journal*, 10(12), 2780–2786. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.73>
 - Sandoval, J. F., Pérez, A. U., Rodríguez, A., & Torres Rojas, E. (2019). Natural high cadmium concentration in soil result in low local arbuscular mycorrhizal fungi AMF community diversity associated to cocoa crops (*Thebroma cacao* L.).
 - Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S. S., Zia, M. H., Naeem, A., Bibia, S., & Farida, G. (2010). Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(6), 925–937. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3916>
 - Schenk, N., & Perez, Y. (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi* (3th Editio). Sinergistic Publications.
 - Schneider, J., Bundschuh, J., & do Nascimento, C. W. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of the Total Environment*, 572, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.185>
 - Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2000). Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4), 523–544. <https://doi.org/10.1023/A>
 - Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2008). Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11183-008-1001-8>
 - Shabala, S. (2017). *Plant stress physiology*. (S. Shabala, Ed.) (2nd Editio). London, UK: CPI Group (UK) Ltd. <https://doi.org/10.1079/9781780647296.0253>
 - Sharma, S. S., Dietz, K. J., & Mimura, T. (2016). Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell and Environment*, 39(5), 1112–1126. <https://doi.org/10.1111/pce.12706>
 - Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2016). Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere*, 26(2), 148–166. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60032-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60032-7)
 - Siebielec, G., Smreczak, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Maliszewska-kordybach, B., Terelak, H., Koza, P., ... Suszek, B. (2012). *Monitoring of soil chemistry in Poland 2010-2012*. Pulawy: IUNG PIB. <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.4.455>
 - Sierra, D. (2016). *El cacao como producto líder en la sustitucion de cultivos ilicitos en proceso posconflicto*. Universidad Militar Nueva Granada. Universidad Militar Nueva Granada.
 - Soler, F., & Henao, M. (2017). *Diagnóstico de los niveles de cadmio en el suelo y su distribución en hojas y frutos de cacao Cultivado en Nilo y Yacopí, Cundinamarca*. Universidad Nacional de Colombia.
 - Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017a). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
 - Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017b). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133–141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
 - Souza, F. A., Dalpé, Y., Declerck, S., Providencia, I. E., & Séjalon-Delmas, N. (2005). Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. *In Vitro Culture of*

- Mycorrhizas*, 4(September 2015), 73–91. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-X_5
- Souza, J., Oehl, F., Donizete, C., Torres, C., Coyne, D., Karla, D., & Costa, L. (2017). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Applied Soil Ecology*, 117–118(April), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.023>
 - Souza, V. L., de Almeida, A. A. F., de S. Souza, J., Mangabeira, P. A. O., de Jesus, R. M., Pirovani, C. P., ... Loguercio, L. L. (2014). Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1217–1230. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1983-4>
 - Sun, H., Xie, Y., Zheng, Y., Lin, Y., & Yang, F. (2018). The enhancement by arbuscular mycorrhizal fungi of the Cd remediation ability and bioenergy quality-related factors of five switchgrass cultivars in Cd-contaminated soil. *PeerJ*, 6, e4425. <https://doi.org/10.7717/peerj.4425>
 - Suresh, S. (2005). Characteristics of Soils Prone To Iron Toxicity and Management - a Review, 26(1), 50–58.
 - Suzuki, R., & Shimodaira, H. (2006). Pvcust: An R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12), 1540–1542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>
 - Svenningsen, N. B., Watts-Williams, S. J., Joner, E. J., Battini, F., Efthymiou, A., Cruz-Paredes, C., ... Jakobsen, I. (2018). Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0059-3>
 - Sýkorová, Z., Wiemken, A., & Redecker, D. (2007). Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5426–5434. <https://doi.org/10.1128/AEM.00987-07>
 - Tamayo, E., Gómez-Gallego, T., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2014). Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in Plant Science*, 5(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00547>
 - Tan, S. Y., Jiang, Q. Y., Zhuo, F., Liu, H., Wang, Y. T., Li, S. S., ... Jing, Y. X. (2015). Effect of inoculation with *Glomus versiforme* on cadmium accumulation, antioxidant activities and phytochelatins of *Solanum photeinocarpum*. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132347>
 - Tang, X., Li, Q., Wu, M., Lin, L., & Scholz, M. (2016). Review of remediation practices regarding cadmium-enriched farmland soil with particular reference to China. *Journal of Environmental Management*, 181, 646–662. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.043>
 - Teige, M., Huchzermeyer, B., & Schultz, G. (1990). Inhibition of Chloroplast ATPsynthase/ATPase Is a Primary Effect of Heavy Metal Toxicity in Spinach Plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186(3), 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(96\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(96)80003-5)
 - Tkalec, M., Štefanić, P. P., Cvjetko, P., Šikić, S., Pavlica, M., & Balen, B. (2014). The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087582>
 - Topperwien, S., Behra, R., & Sigg, L. (2007). Competition among zinc, manganese, and cadmium uptake in the freshwater alga *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(3), 483–490. [https://doi.org/10.1016/0010-4361\(88\)90728-8](https://doi.org/10.1016/0010-4361(88)90728-8)
 - Turrini, A., Bedini, A., Loor, M. B., Santini, G., Sbrana, C., Giovannetti, M., & Avio, L. (2018). Local diversity of native arbuscular mycorrhizal symbionts differentially affects growth and nutrition of three crop plant species. *Biology and Fertility of Soils*, 54, 203–217. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1254-5>
 - USDA. (2014). *Claves para la Taxonomía de Suelos* (Décima seg). Montecillo, Texcoco,

Estado de México.

- Viashaly, A. G., Blessy, B. M., Krishnamurthy, N. B., & Krishnamurthy, T. . (2015). Bioaccumulation of heavy metals by fungi. *International Journal of Environmental Chemistry & Chromatography*, 1(1), 23–28.
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. R. S., & Recherche, C. De. (1998). Ink and Vinegar , a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004–5007.
- Vijayarangan, P., & Mahalakshmi, G. (2013). Zinc toxicity in tomato plants. *World Applied Sciences Journal*, 24(5), 649–653. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.24.05.2249>
- Villarreal, H., Álvarez, S., Córdoba, F., Escobar, G., Fagua, F., Gast, H., ... Ospina, A. (2004). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. In *Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad* (pp. 187–225). Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e Impresos S.A. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., & Regvar, M. (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.021>
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, 10(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Wang, Y., Huang, J., & Gao, Y. (2012). Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLoS One*, 7(11), e48669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048669> [pii]
- Wei, Y., Chen, Z., Wu, F., Hou, H., Li, J., Shangguan, Y., ... Zeng, Q. (2015). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi at a large-scale antimony mining area in southern China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 29, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.10.002>
- Weissenhorn, I., Leyval, C., & Berthelin, J. (1993). Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil*, 157(2), 247–256. <https://doi.org/10.1007/BF00011053>
- Wu, Z., Wu, W., Zhou, S., & Wu, S. (2016). Mycorrhizal Inoculation Affects Pb and Cd Accumulation and Translocation in Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere*, 26(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60018-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60018-2)
- Xu, X., Chen, C., Zhang, Z., Sun, Z., Chen, Y., Jiang, J., & Shen, Z. (2017). The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45134>
- XU, Y., LIANG, X., XU, Y., QIN, X., HUANG, Q., WANG, L., & SUN, Y. (2017). Remediation of Heavy Metal-Polluted Agricultural Soils Using Clay Minerals: A Review. *Pedosphere*, 27(2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60310-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60310-2)
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yu, X., Cheng, J., & Wong, M. H. (2005). Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.029>
- Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schäfer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G. S., ... Buscot, F. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, 158(8), 2757–2765.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.04.017>

- Zarei, M., König, S., Hempel, S., Nekouei, M. K., Savaghebi, G., & Buscot, F. (2008). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution*, 156(3), 1277–1283. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.03.006>
- Zhang, X., Chen, B., & Ohtomo, R. (2015). Mycorrhizal effects on growth, P uptake and Cd tolerance of the host plant vary among different AM fungal species. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(2), 359–368. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.985578>
- Zug, K. L. M., Huamaní Yupanqui, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(3), 72. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>