



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Respuesta fisiológica y acumulación de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo déficit hídrico

Antonio Ortiz Álvarez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2023

Respuesta fisiológica y acumulación de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo déficit hídrico

Antonio Ortiz Álvarez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D. Ángela María Castaño Marín

Codirector (a):

Ph.D. Stanislav Magnitskiy

Línea de Investigación:

Fisiología de cultivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2023

“Gota a gota el agua es capaz de abrir la piedra, y no es por su fuerza sino por la constancia” Proverbio chino, autor desconocido.

Dedicado especialmente a mis hermanos Nicolás, Santiago y Esteban, así como a mis padres, Betty y Antonio. También quiero rendir un homenaje a mi nona Argelia, mi tía Rebeca y a mi segunda mamá “Iya” en el cielo.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Antonio Ortiz Álvarez

Fecha 01/08/2023

Agradecimientos

A Ángela Castaño, mi directora de tesis, por su apoyo, dirección y orientación a lo largo de la fase práctica y escrita de la investigación. Agradezco su paciencia y dedicación.

Al profesor Stanislav Magnitskiy, mi codirector, por su disposición para sugerir, revisar y acompañar el proyecto de tesis. Aprecio enormemente la prontitud de sus comentarios y sugerencias.

A Elías Alexander Silva, profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA, por su valioso apoyo tanto en la parte práctica como en la fase escrita de la tesis. Su dirección, paciencia y entrega fueron fundamentales para el éxito del proyecto.

A Isidro Beltrán, Investigador Máster en AGROSAVIA, por su diligencia y gestión en la sede Nataima, lo que permitió llevar a cabo todas las tareas de campo.

A Eduardo y Pablo Edgar Jiménez, operarios de vivero y laboratorio de Nataima y Tibaitatá, por su apoyo en el mantenimiento de las plantas del cultivo y su acompañamiento en el procesamiento de muestras.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA por permitirme llevar a cabo mi tesis de maestría en este gran proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, a todos los profesores y personas que contribuyeron en mi formación especializada sobre fisiología de cultivos.

A mis padres, mis hermanos y mi novia por su apoyo incondicional a lo largo de todo el camino de la maestría, especialmente en los momentos más difíciles. Su apoyo ha sido invaluable y un pilar fundamental para conseguir este importante logro en mi vida.

Resumen

Evaluación de la respuesta fisiológica y acumulación de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de déficit hídrico

El riesgo de sequía debido a la variabilidad climática y la presencia de cadmio (Cd) en el suelo es común en zonas cacaoteras alrededor del mundo. Hasta el momento no se encuentran estudios publicados sobre la acumulación de Cd en condiciones de déficit hídrico. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la respuesta fisiológica y la acumulación de cadmio en plantas de cacao bajo déficit hídrico. El estudio se realizó en casa de mallas en el Centro de Investigación Nataima de AGROSAVIA, municipio El Espinal, Tolima. Se utilizaron materiales con potencial como portainjertos de cacao, dos progenies (A2 y 1233) de hermanos completos obtenidas mediante cruzamiento dirigido, y un genotipo ampliamente utilizado como patrón en Colombia (IMC 67). Se analizaron diversos parámetros, incluyendo aspectos hídricos, de crecimiento, fisiológicos, bioquímicos y la acumulación de Cd en plantas de 7 meses de edad. Estas plantas crecieron en un suelo contaminado con Cd, sin añadir fuentes externas del metal, con una concentración inicial de Cd soluble de $0,356 \text{ mg kg}^{-1}$. Se sometieron a déficit hídrico mediante la suspensión de riego durante períodos consecutivos de 19 y 27 días (D19 y D27), y luego se rehidrataron para evaluar su potencial de recuperación al estrés hídrico. El estrés hídrico redujo el potencial hídrico de las hojas (Ψ_{hoja}) con valores entre -1,51 y -2,09 MPa, siendo la progenie 1233 la más tolerante. Sin embargo, la recuperación de variables de intercambio gaseoso, el potencial hídrico y los pigmentos fotosintéticos tras la rehidratación, sugiere que las tres progenies poseen la capacidad de tolerar los niveles de estrés evaluados. La acumulación de Cd varió entre progenies, no entre niveles de estrés. La concentración de Cd se vio influenciada por la reducción de la biomasa (A2 y 1233) y la tasa de transpiración (IMC 67) causada por el déficit hídrico. La combinación de estrés hídrico y Cd estuvo relacionada con el contenido de clorofilas, el estrés oxidativo y acumulación de prolina en las hojas. Las progenies A2 y 1233 acumularon más Cd en la planta que IMC 67, con mayor concentración en las hojas. El factor translocación (FT) mostró que los órganos aéreos de las tres progenies estaban enriquecidos con Cd ($\text{FT} > 4$). El déficit hídrico incrementó la translocación de Cd desde las raíces en A2 e IMC 67, a pesar de que este último acumuló menos Cd, mientras que en 1233 no hubo cambios significativos. La progenie 1233 se destacó como el portainjerto más prometedor debido a su tolerancia al estrés hídrico y estabilidad en la acumulación de Cd.

Palabras clave: cacao, déficit hídrico, estrés hídrico, genotipo, tolerancia, acumulación de Cd, translocación de Cd.

Abstract

Evaluation of Physiological Response and Cadmium Accumulation in Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) under Water Deficit Conditions

The risk of drought due to climate variability and the presence of cadmium (Cd) in the soil is common in cocoa-producing areas worldwide. Currently, there are no published studies on Cd accumulation under water deficit conditions. This research aimed to evaluate the physiological response and cadmium accumulation in cocoa plants under water deficit. The study was conducted in a nursery at the Nataima Research Center of AGROSAVIA, in El Espinal municipality, Tolima. Two potential cocoa rootstock materials, progenies A2 and 1233 from controlled crosses, and a commercially used rootstock genotype in Colombia (IMC 67), were used. Various parameters, including water-related aspects, growth, physiological, biochemical, and Cd accumulation in 7-month-old plants, were analyzed. The plants were grown in Cd-contaminated soil without the addition of external sources of the metal, with an initial soluble Cd concentration of 0.356 mg kg^{-1} . They were subjected to water deficit by suspending irrigation for consecutive periods of 19 and 27 days (D19 and D27) and then rehydrated to assess their potential for water stress recovery. Water deficit reduced leaf water potential (Ψ_{leaf}) with values between -1.51 and -2.09 MPa, with progeny 1233 being the most tolerant. However, the recovery of gas exchange variables, water potential, and photosynthetic pigments after rehydration suggests that all three genotypes have the capacity to tolerate the stress levels evaluated. Cd accumulation varied among progenies, not among stress levels. The Cd concentration was influenced by biomass reduction (A2 and 1233) and transpiration rate (IMC 67) caused by water deficit. The combination of water deficit and Cd was associated with chlorophyll content, oxidative stress, and proline accumulation in the leaves. Progenies A2 and 1233 accumulated more Cd in the plant than IMC 67, with higher concentration in the leaves. The translocation factor (TF) indicated that the above-ground organs of all three progenies were enriched with Cd ($\text{TF} > 4$). Water deficit increased Cd translocation from the roots in A2 and IMC 67, despite the latter accumulating less Cd, while 1233 showed no significant changes. Progeny 1233 stood out as the most promising rootstock due to its water stress tolerance and stable Cd accumulation.

Keywords: cocoa, drought stress, genotype, tolerance, Cd accumulation, Cd translocation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	XX
Objetivos	XXII
Marco teórico	1
1. Respuesta fisiológica y bioquímica a la interacción del estrés hídrico y la acumulación de cadmio en cacao	11
1.1 Introducción.....	11
1.2 Materiales y métodos	14
1.2.1 Localización del experimento.....	14
1.2.2 Material vegetal	14
1.2.3 Establecimiento del experimento	15
1.2.4 Tratamientos de estrés hídrico.....	16
1.2.5 Condiciones ambientales durante el experimento.....	17
1.2.6 Potencial hídrico de la hoja.....	18
1.2.7 Intercambio de gases.....	18
1.2.8 Acumulación de biomasa	18
1.2.9 Pigmentos fotosintéticos	18
1.2.10 Prolina	19
1.2.11 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	19
1.2.12 Malondialdehído (MDA)	20
1.2.13 Contenido de cadmio en hojas.....	20
1.2.14 Análisis estadístico	20
1.3 Consideraciones éticas	21
1.3.1 Reutilización y reciclaje de materiales	21
1.4 Resultados	21
1.4.1 Potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja})	21
1.4.2 Intercambio de gases.....	22
1.4.3 Acumulación de biomasa	23

1.4.4	Pigmentos fotosintéticos.....	26
1.4.5	Prolina.....	27
1.4.6	Peroxidación lipídica	28
1.4.7	Contenido de cadmio en hojas	30
1.4.8	Respuestas a la fase de rehidratación.....	31
1.5	Discusión	34
1.5.1	Comportamiento fisiológico del cacao al déficit hídrico.....	34
1.5.2	Respuesta fisiológica a la interacción entre el déficit hídrico y la acumulación de cadmio en hojas.....	39
1.6	Conclusiones	46
2.	Acumulación de cadmio en plantas de cacao sometidas a déficit hídrico	49
2.1	Introducción	49
2.2	Materiales y métodos.....	51
2.2.1	Contenido de cadmio en el suelo	51
2.2.2	Contenido de Cd en la planta	53
2.2.3	Factor de translocación de Cd (FT)	53
2.2.4	Análisis estadístico.....	53
2.3	Consideraciones éticas.....	54
2.3.1	Disposición de suelo con altos contenidos de cadmio	54
2.4	Resultados.....	54
2.4.1	Contenido de Cd en la planta	54
2.4.2	Factor de translocación de Cd (FT)	58
2.5	Discusión	59
2.6	Conclusiones	66
3.	Conclusiones y recomendaciones	69
3.1	Conclusiones	69
3.2	Recomendaciones	70
A.	Figuras anexas.....	71
B.	Información anexa	75
	Bibliografía	83

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Comportamiento del CVA (%) del suelo bajo dos niveles de déficit hídrico y rehidratación del mismo. Círculo abierto: CVA (%) del suelo cuando las plantas tenían un Ψ_{hoja} entre -1 y -1,8 MPa; Círculo cerrado: CVA (%) del suelo cuando las plantas de cacao tenían un Ψ_{hoja} menor a -1,8 MPa. <i>BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; DRH, rehidratación de plantas sometidas a ES durante tres días consecutivos.</i>	16
Figura 2. Condiciones de temperatura promedio (Temp), temperatura máxima (Temp máx.), temperatura mínima (Temp mín.), humedad relativa (HR) y radiación solar (Rad solar) diaria, a la que fueron expuestas las plantas de cacao durante el tiempo del experimento.	17
Figura 3. Potencial hídrico de la hoja Ψ_{hoja} (MPa) de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico (D19 y D27, respectivamente). <i>BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico. Valores promedio (n = 9). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.</i> ..	22
Figura 4. Acumulación de biomasa en (A) hojas, (B) tallo, (C) raíces, (D) total y (E) relación raíz / parte aérea de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. <i>BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio (n = 6). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.</i>	26
Figura 5. Contenido de prolina (mg g^{-1}) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. <i>BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio (n = 9). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.</i>	28
Figura 6. Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (ppb) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. <i>BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio (n = 9). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.</i>	29
Figura 7. Contenido de malondialdehído (MDA) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. <i>BR, bien regado;</i>	

ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 9$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey..... 30

Figura 8. Concentración de Cd (mg kg^{-1}) en hojas de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey..... 31

Figura 9. Concentración de Cd en (A) raíz, (B) tallo, (C) hojas y (D) total de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey. 56

Figura 10. Acumulación de Cd en (A) raíz, (B) tallo, (C) hojas y (D) total de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey. 58

Figura 11. Factor de translocación (FT) del Cd tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey..... 59

Figura anexa 1. Déficit de presión de vapor (DPV) durante el experimento. Valores promedio ($n=12$). Letras diferentes reflejan diferencias significativas ($p<0,05$) de acuerdo con la prueba HSD de Tukey 71

Figura anexa 2. Correlaciones de Pearson entre las variables fisiológicas y bioquímicas, determinadas en plantas jóvenes de cacao pertenecientes tres progenies: (A) A2, (B) IMC 67 y (C) 1233, sometidas a déficit hídrico y Cd en el suelo. PH, potencial hídrico de la hoja Ψ_{hoja} ; Cd_R, concentración de Cd en raíces; Cd_T, concentración de Cd en tallo; Cd_H, concentración de Cd en hojas; Cd_TOT, concentración de Cd total; ACU_R, acumulación de Cd en raíces; ACU_T, acumulación de Cd en tallo; ACU_H, acumulación de Cd en hojas; ACU_TOT, acumulación de Cd total; MS_H, masa seca de las hojas; MS_T, masa seca del tallo; MS_R, masa seca de la raíz; MS_TOT, masa seca total; R_S, relación raíz / parte aérea; A, tasa fotosintética; GS, conductancia estomática; E, transpiración; Ci, carbono interno, Chla, clorofila a; Chlb, clorofila b; ChIT, clorofila total; Car, carotenoides; Chla_Chlb, relación clorofila a/b; ChIT_Car, relación de clorofilas totales / carotenoides; MDA, malondialdehído, PEROX, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)..... 74

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Parámetros de intercambio gaseoso de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico.....	23
Tabla 2. Pigmentos fotosintéticos en hojas de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico.....	27
Tabla 3. Comportamiento de variables fisiológicas y bioquímicas de tres progenies de cacao sometidos a rehidratación (DRH) durante tres días consecutivos, después de un déficit hídrico de 19 y 27 días (D19 y D27, respectivamente).	32

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo con letras latinas

Símbolo	Término
<i>Cd</i>	Cadmio
<i>Fe</i>	Hierro
<i>Fe (II)</i>	Hierro valencia 2
<i>Fe (III)</i>	Hierro valencia 3
<i>Zn</i>	Zinc
<i>Mn</i>	Manganeso
<i>Cu</i>	Cobre
<i>Ni</i>	Níquel
<i>N</i>	Nitrógeno
<i>Ca</i>	Calcio
<i>Mg</i>	Magnesio
<i>K</i>	Potasio
<i>P</i>	Fósforo
<i>S</i>	Azufre
<i>Cl</i>	Cloro
<i>B</i>	Boro
<i>H</i>	Hidrógeno
<i>KI</i>	Yoduro de potasio
<i>A</i>	Tasa fotosintética
<i>gs, GS</i>	Conductancia estomática
<i>E</i>	Transpiración
<i>Ci</i>	Carbono interno
<i>Car</i>	Carotenoides
<i>Chla</i>	Clorofila a
<i>Chlb</i>	Clorofila b
<i>Chla_Chlb</i>	Relación clorofila a/b
<i>ChIT</i>	Clorofila total
<i>ChIT_Car</i>	Relación de clorofilas totales / carotenoides
<i>H₂O</i>	Agua
<i>H₂O₂</i>	Peróxido de hidrógeno
<i>O²⁻</i>	Ion superóxido
<i>¹O₂</i>	Oxígeno singlente
<i>OH</i>	Hidroxilo
<i>min</i>	Minuto
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>ppb</i>	Partes por billón
<i>mg</i>	Miligramo
<i>g</i>	Gramo

Símbolo	Término
<i>kg</i>	Kilogramo
<i>ton</i>	Toneladas
<i>cm</i>	Centímetros
<i>s</i>	Segundo
<i>cc</i>	Centímetros cúbicos
<i>m²</i>	Metro cuadrado
<i>mm</i>	Milímetros de precipitación
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>msnm</i>	Metros sobre el nivel del mar
<i>MPa</i>	Megapascales
<i>W m⁻²</i>	Watts por metro cuadrado
<i>μM</i>	Micro molar
<i>μmol</i>	Micro moles
<i>mol</i>	moles
<i>air</i>	aire
<i>p/v</i>	Relación peso volumen
<i>ml</i>	Mililitro
<i>L</i>	Litro
<i>Temp</i>	Temperatura
<i>°C</i>	Grados Celsius
<i>HR</i>	Humedad relativa del aire
<i>DPV</i>	Déficit de presión de vapor
<i>pH</i>	Potencial de hidrógeno
<i>sp.</i>	especie
<i>CO₂</i>	Dióxido de carbono
<i>O₂</i>	Oxígeno molecular
<i>r</i>	correlación
<i>n</i>	número
<i>PSII</i>	Fotosistema 2
<i>qP</i>	Quenching fotoquímico
<i>ICP-OES</i>	Plasma de acoplamiento inductivo - espectrometría de emisión óptica
<i>HSD</i>	Honestly-significant-difference
<i>ES</i>	Tratamiento de plantas estresadas
<i>BR</i>	Tratamiento de plantas bien regadas o control
<i>D19</i>	19 días de suspensión del riego
<i>D27</i>	27 días de suspensión del riego
<i>DRH</i>	3 días de rehidratación
<i>R_S</i>	Relación raíz parte aérea
<i>p</i>	Valor p
<i>PDH</i>	Prolina deshidrogenasa
<i>LHC</i>	Complejos de captación de luz
<i>SL</i>	Estrigolactonas
<i>NADP</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato por sus siglas en inglés
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<i>Cd_R</i>	Concentración de Cd en raíces
<i>Cd_T</i>	Concentración de Cd en tallo

Símbolo	Término
<i>Cd_H</i>	Concentración de Cd en hojas
<i>Cd_TOT</i>	Concentración de Cd total
<i>MS_H</i>	Masa seca de las hojas
<i>MS_T</i>	Masa seca de las hojas
<i>MS_R</i>	Masa seca de las raíces
<i>MS_TOT</i>	Masa seca total
<i>PEROX</i>	Peróxido de hidrógeno

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
ψ	Potencial hídrico
μ	micro

Subíndices

Subíndice	Término
hoja	hoja
2	dos
3	tres
4	cuatro

Superíndices

Superíndice	Término
2	cuadrado
+	Carga positiva de la molécula
-	Carga negativa de la molécula
2+	Valencia del elemento
-1	Denominador

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>NRAMP</i>	Proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural
<i>ATPasa</i>	Enzimas que utilizan ATP
<i>ATP</i>	Adenosintrifosfato
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>HMA</i>	ATPasas de metales pesados
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>ABA</i>	Ácido abscísico
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa
<i>CAT</i>	Catalasa
<i>NR</i>	Nitrato reductasa
<i>GB</i>	Glicina betaína

Abreviatura	Término
<i>POX</i>	Peroxidasa
<i>APX</i>	Ascorbato peroxidasa
<i>CIC</i>	Capacidad de intercambio catiónico
<i>ZIP</i>	Permeasa de zinc-hierro
<i>YSL</i>	yellow-stripe 1
<i>WUE</i>	Uso eficiente del agua por sus siglas en inglés
<i>DRO1</i>	DEEPER ROOTING 1
<i>EFT</i>	Tiempo de floración temprano
<i>MDA</i>	Malondialdehído
<i>CVA</i>	Contenido volumétrico del agua
<i>TBA</i>	Ácido tiobarbitúrico
<i>TCA</i>	Ácido tricloroacético
<i>ANOVA</i>	Análisis de varianza por sus siglas en inglés
<i>FT</i>	Factor de translocación
<i>TBARS</i>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por sus siglas en inglés

Introducción

El cadmio (Cd) es un metal pesado que afecta la salud de animales y humanos en muy bajas cantidades (Maddela et al., 2020). El cacao es uno de los cultivos que representa una fuente dietética significativa de Cd, ya que los granos son la materia prima del chocolate (Moore et al., 2020). Las concentraciones de Cd en los granos de cacao provenientes de América del Sur y América Central son los más altos en el mundo, con valores que pueden estar entre 0,6 y 0,8 mg kg⁻¹, superando los niveles máximos permitidos por la Unión Europea (UE), de acuerdo con la última regulación de trazas de Cd en el cacao y el chocolate (Chavez et al., 2015; Meter et al., 2019). El límite tolerable máximo en chocolates con sólidos de cacao superiores o iguales al 50% es de 0,8 mg kg⁻¹ (Chavez et al., 2015; Florida Rofner, 2021; Meter et al., 2019).

El cacao es una de las especies de plantas que absorbe y acumula fácilmente el Cd en sus órganos cuando crece en suelos contaminados, natural o antropológicamente (Kirkham, 2006; Roberts, 2014). El Cd⁺² es móvil en suelos ácidos e ingresa a la planta a través de canales iónicos de Fe⁺², Zn⁺² y Ca⁺² y transportadores del Zn⁺² y Ca⁺² (Roberts, 2014; Song et al., 2017). En cacao, las proteínas transportadoras NRAMP5 median la entrada de Cd desde la rizósfera y las ATPasas de metales pesados (HMA) determinan la deposición de Cd en vacuolas y su translocación en la planta. La eficacia de estos transportadores puede diferir entre genotipos (Moore et al., 2020; Vanderschueren et al., 2021). Una vez el Cd es absorbido por las raíces, ingresa a la epidermis vía simplasto y pasa hacia el xilema por vía apoplasto y/o simplasto hasta llegar a las hojas para ser almacenado y posteriormente retranslocado a los frutos y semillas de cacao (Lewis et al., 2018; Song et al., 2019).

El déficit hídrico se considera uno de los factores de estrés abiótico más limitantes en el crecimiento, desarrollo y producción de cacao (Bunn et al., 2017; De Almeida et al., 2016; Medina & Laliberte, 2017). El riesgo de sequía en las zonas productoras de este cultivo en Colombia y el mundo, ha aumentado en las últimas décadas por efectos de la variabilidad

climática, ya sea a través de la disminución de la precipitación o el aumento de la evapotranspiración (Bunn et al., 2017). Se ha demostrado que ciertos niveles de reducción de agua en el suelo causan disminución del potencial hídrico foliar (Ψ_{hoja}), induce el cierre de estomas y pueden disminuir la tasa fotosintética en las plantas de cacao (García Lozano & Moreno Fonseca, 2016; Osorio Zambrano et al., 2021). En niveles de estrés severo, se incrementa el metabolismo energético de las plantas de cacao por el aumento en la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, como mecanismo de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS); la eficiencia de esta respuesta también puede variar entre genotipos (Osorio Zambrano et al., 2021).

Si bien es cierto que el contenido de agua en el suelo es un factor que puede limitar la absorción de Cd en diferentes especies de plantas (Wade et al., 2022), como en ricino (Shi et al., 2015), tomate (Ünyayar et al., 2005), mostaza india (Baudhdh & Singh, 2012) y soya (W. Bashir et al., 2019), la concentración del Cd en la planta tiende a aumentar, debido a una menor acumulación de biomasa en las plantas que crecen en condiciones de déficit hídrico (Liu et al., 2016; Xia et al., 2015). Lo anterior se ha reportado en plantas de soya (W. Bashir et al., 2019), trigo (Abbas et al., 2018; Adrees et al., 2020) y maní (Liu et al., 2016; Xia et al., 2015). Por esta razón, se espera que la susceptibilidad/tolerancia del cacao en condición de déficit hídrico juegue un papel importante en la acumulación de Cd. Según Bashir et al. (2019), los cultivares de soya tolerantes se ven menos afectados en longitud, área y diámetro de las raíces que los susceptibles, razón por la cual absorben mayor cantidad de Cd del suelo.

Hasta la fecha, no se han publicado estudios sobre la acumulación de Cd en condiciones de déficit hídrico en el cacao, ni sobre la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas frente a la combinación de estas dos condiciones estresantes, a pesar de ser comunes en las zonas cacaoteras de Colombia (Bravo et al., 2021; Bunn et al., 2017). Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la respuesta fisiológica y la acumulación de cadmio en plantas jóvenes de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de déficit hídrico. Para ello, se tuvo en cuenta que la acumulación de metales pesados en injertos está influenciada por la anatomía, morfología y fisiología del patrón utilizado (De Almeida et al., 2022; Lewis et al., 2018; Savvas et al., 2010). Por consiguiente, se seleccionaron materiales vegetales con potencial como portainjertos, uno de los cuales (IMC 67) es ampliamente conocido y utilizado en cultivos de cacao en Colombia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la respuesta fisiológica y acumulación de cadmio en plantas jóvenes de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de déficit hídrico.

Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta fisiológica y bioquímica de plantas jóvenes de cacao sometidas a estrés por déficit hídrico.
- Evaluar la respuesta fisiológica y bioquímica de plantas jóvenes de cacao expuestas a la interacción del estrés hídrico y la acumulación de cadmio.
- Determinar la acumulación de cadmio en plantas jóvenes de cacao sometidas a déficit hídrico.

Marco teórico

El cultivo de cacao, descripción general

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie de planta que pertenece a la familia Malvaceae. Es una especie perenne tropical cultivada por sus semillas, utilizadas en la producción de chocolate. Su origen tuvo lugar en la región amazónica, entre Colombia, Ecuador y Perú, y se cultiva en todo el mundo, principalmente en los trópicos húmedos y su mayor producción tiene lugar en África occidental, el sudeste de Asia y América Latina (Lahive et al., 2021; Motamayor et al., 2008).

A nivel mundial se ha observado una demanda global creciente de granos de cacao y sus subproductos, como chocolates y manteca de cacao. Esta creciente demanda resalta la importancia de aumentar la producción y el valor del cultivo para las economías locales, lo que ha llevado a una mayor intensificación de la investigación en esta área (Suh & Molua, 2022).

El cultivo de cacao en Colombia se establece en un rango que va desde el nivel del mar hasta los 1200 metros de altitud. Las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas entre 24 °C a 28 °C y precipitaciones anuales de entre 1800 a 2600 mm. Los suelos ideales para el cultivo de cacao son aquellos que son sueltos y profundos, permitiendo una buena distribución de las raíces, con una profundidad de 80 a 150 cm (Arvelo et al., 2017).

En las plantaciones de cacao se utiliza la propagación asexual mediante injertos con el fin de preservar la identidad genética de los materiales. Las varetas portayemas se obtienen de clones altamente productivos y se injertan sobre portainjertos o patrones que son producidos a través de semilla sexual. Esta técnica de propagación combina características de ambos materiales, lo que resulta en un período más corto entre la floración y la fructificación, además de incrementar la producción en árboles maduros (Jaimes et al., 2022).

Los materiales genéticos más empleados y recomendados como portainjertos en la producción de plantas de cacao en Colombia son IMC 67, PA 46, PA 121, PA 150, Pound 7, Pound 12, EET 399, EET 400, SPA 9 y CAU 39. Los estudios demuestran que el IMC 67, seguido del PA 46 y el PA 121, tienen un mejor desarrollo, además de presentar mayor grado de adaptación a diferentes condiciones de estrés y suelos con pH ácido y, por ende, mayor resistencia a enfermedades como *Phytophthora* sp. y *Ceratocystis* sp (Jaimes et al., 2022; Palencia et al., 2007).

Efectos del déficit hídrico en la fisiología de las plantas

Se espera que el cambio climático global se acelere en un futuro muy cercano debido al incremento de la temperatura del aire y los niveles de CO₂ atmosférico que, en última instancia, altera los patrones de lluvia y su distribución (Yang et al., 2021). Es así como el cambio climático generalmente resulta en condiciones de estrés por sequía predominantes en muchas zonas del mundo (Seleiman et al., 2021).

La reducción del agua disponible en el suelo debido a la disminución de la precipitación y/o un aumento en la evapotranspiración resulta en una menor absorción y contenido de agua en las plantas. Según Juenger & Verslues (2023), el potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) es la medida más indicativa del estado hídrico de las plantas en condiciones de déficit hídrico. A medida que el estrés hídrico se intensifica, diversos estudios han demostrado una disminución en el Ψ_{hoja} (Baccari et al., 2020; Maréchaux et al., 2015; Osorio Zambrano et al., 2021). Es importante destacar que los valores de Ψ_{hoja} pueden variar significativamente entre especies de plantas. Por ejemplo, en un estudio de Maréchaux et al. (2015) realizado en diversas especies de plantas amazónicas, se observaron valores que oscilaban entre -1,4 y -3,2 MPa, mientras que Baccari et al. (2020) encontraron valores tan bajos como -6,0 MPa en plantas jóvenes de olivo sometidas a un estrés hídrico severo.

El estrés hídrico provocado por la sequía tiene efectos adversos sobre el proceso de fotosíntesis. La reducción de la tasa fotosintética es el resultado del cierre de estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración y/o un deterioro metabólico de las plantas (Yang et al., 2021). Durante el estrés por déficit hídrico, la radiación sigue siendo captada por las plantas, pero la concentración limitada de CO₂ intercelular provoca la acumulación de componentes del transporte de electrones fotosintéticos reducidos. Esta acumulación puede reducir la disponibilidad de oxígeno molecular, lo que lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daño significativo al aparato fotosintético.

Investigaciones anteriores han revelado que la reducción en la tasa fotosintética durante situaciones de sequía se debe a dos factores principales: la limitación estomática y la limitación no estomática. En el caso de un estrés moderado, la limitación estomática es la causa principal por la que disminuye la tasa fotosintética en las plantas. Este cierre estomático es precedido por la síntesis y transporte del ácido abscísico (ABA) en las hojas, la hormona principal en la señalización del estrés hídrico (Wilkinson & Davies, 2010).

Numerosos estudios han examinado la relación entre la fotosíntesis y la conductancia estomática. Por ejemplo, Li et al. (2021) encontraron una correlación significativa de $r = 0,938$ entre estas dos variables en plantas de tomate. Bajo estrés moderado, con valores de Ψ_{hoja} entre -1,0 y -1,2 MPa, la limitación fotosintética fue principalmente estomática, lo que provocó una reducción del 50,3% en la tasa fotosintética de las plantas. En otro estudio realizado en *Arabidopsis thaliana*, Chen et al. (2016) observaron que los dímeros del fotosistema II (PSII) se mantuvieron estables bajo estrés por sequía a corto plazo, y empezaron a verse afectados después de 15 días de estrés.

Las limitaciones no estomáticas en la fotosíntesis abarcan procesos difusivos, como la reducción de la conductancia del mesófilo, y procesos metabólicos, que incluyen limitaciones fotoquímicas y enzimáticas (Varone et al., 2012; Yang et al., 2021). Por ejemplo, en un estudio realizado en maíz, Bashir et al. (2021) reportó que el estrés por sequía redujo el rendimiento cuántico de PSII, el quenching fotoquímico (qP) y la tasa de transporte de electrones a través de PSII. Estos daños suelen ocurrir cuando la severidad del estrés es alta, y la recuperación de la fotosíntesis puede llevar más tiempo o incluso no recuperarse en su totalidad, a diferencia de cuando las limitaciones son estomáticas (Loggini et al., 1999; Osorio Zambrano et al., 2021).

En condiciones de déficit hídrico, los pigmentos fotosintéticos como las clorofilas pueden experimentar una disminución en su síntesis y degradación debido a la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lisar et al., 2012; Zakariyya & Indradewa, 2018). Esto ocurre porque los cloroplastos, donde se lleva a cabo la fotosíntesis, son organelos con altas tasas de transferencia de electrones, lo que los convierte en principales fuentes y objetivos de las ROS (Yang et al., 2021). La degradación y reducción de la síntesis de clorofilas se han observado en diferentes especies de plantas, especialmente en aquellos genotipos o variedades que son susceptibles al estrés por déficit hídrico (Li et al., 2006; Li et al., 2020; Mafakheri et al., 2010).

Efectos del déficit hídrico en la bioquímica de las plantas

Bajo condiciones de estrés por sequía, el ajuste osmótico está implicado en el mantenimiento de la conductancia estomática, la fotosíntesis, el volumen de agua de la hoja y el crecimiento (Blum, 2017). El ajuste osmótico es un proceso que consiste en acumular soluto en células en división cuando se reduce el potencial hídrico, con el fin de mantener el agua al interior y mantener la turgencia (Basu et al., 2016).

Ciertos solutos, como cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos libres, la prolina y la glicina betaína pueden acumularse en las plantas para realizar ajuste osmótico, un papel esencial en la protección de las plantas contra los efectos dañinos del estrés por sequía (Ashraf & Foolad, 2007; Basu et al., 2016). Un estudio realizado por Živanović et al. (2020) en tomate encontró que la acumulación de aminoácidos libres, especialmente prolina y sus precursores, y aminoácidos de cadena ramificada específicos tanto en glucosa como en sacarosa, contribuyó a mantener la tasa de crecimiento de las plantas durante el déficit hídrico, manteniéndolas en niveles comparables a las plantas bien regadas.

La reducción en la fijación de CO₂ en condiciones de déficit hídrico, resulta en un aumento en la transferencia de electrones fotosintéticos al oxígeno (O₂). Este actúa como aceptor de electrones, formando un radical superóxido O²⁻, el cual puede desencadenar una serie de reacciones en cadena para producir una gran cantidad de radicales libres de oxígeno reactivo, como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ion superóxido (O²⁻), el oxígeno singlete (¹O₂) (Yang et al., 2021). Estos compuestos reactivos podrían inducir directamente la peroxidación de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de las membranas. Además, pueden conducir a una disminución o pérdida de la función de proteínas, ruptura de la cadena peptídica, entrecruzamiento de proteínas, transformación de los residuos de aminoácidos y cambios en las propiedades inmunoquímicas (Standtman et al., 2003).

Para superar el daño oxidativo, las plantas poseen sistemas de eliminación de ROS enzimáticos y no enzimáticos (Stankovic et al., 2022). Los antioxidantes enzimáticos incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POX), entre otros (Nadarajah, 2020; Stankovic et al., 2022). Los componentes no enzimáticos del sistema antioxidante comprende el ácido ascórbico, flavonoides, carotenoides, prolina, glicina betaína, compuestos fenólicos, entre otros, que mitigan el daño oxidativo mediante la

reducción directa de la actividad de ROS y trabajando junto con enzimas antioxidantes (Ashraf & Foolad, 2007; Meena et al., 2019; Stankovic et al., 2022).

Zakariyya & Indradewa (2018) llevaron a cabo una evaluación de cambios bioquímicos en tres clones de cacao sometidos a dos niveles de estrés hídrico: moderado, que consistió en riego cada 5 días, y severo, con riego cada 8 días. Los resultados de esta investigación revelaron diversas respuestas en las plantas frente al estrés hídrico. Se observó un aumento en el contenido de H₂O₂, acompañado de un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), el contenido de ácido ascórbico, los fenoles totales y los contenidos de prolina.

Tolerancia al déficit hídrico

La tolerancia de las plantas al estrés por déficit hídrico incluye respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas. De acuerdo con Oguz et al. (2022), las plantas pueden evitar, escapar o tolerar la condición de estrés por déficit hídrico.

La evitación del estrés por déficit hídrico en las plantas se logra mediante diferentes estrategias adaptativas. Entre ellas se incluyen el aumento en el crecimiento de las raíces hacia mayores profundidades para acceder a fuentes de agua, la regulación de la apertura estomática para reducir la pérdida de agua por transpiración, y la modificación de la arquitectura del dosel de la planta para mejorar el uso eficiente del agua (WUE) (Oguz et al., 2022). Un estudio realizado por Uga et al. (2013) reveló que un cultivar de arroz con una mayor expresión del gen *DRO1* experimentó un aumento en el ángulo de crecimiento de sus raíces, lo que favoreció un enraizamiento más profundo. Esta característica permitió a las plantas evitar la sequía al acceder a reservas de agua más profundas y, como resultado, mantuvieron un alto rendimiento en condiciones de sequía (Uga et al., 2013).

La estrategia de escape a la sequía es una estrategia que ciertas especies de plantas utilizan para completar su ciclo de vida antes de que el déficit hídrico se establezca. Pueden ajustar su crecimiento vegetativo y reproductivo según la disponibilidad de agua a través de un desarrollo fenológico rápido o una plasticidad del desarrollo (Basu et al., 2016; Oguz et al., 2022). Esta estrategia es común en plantas nativas y en cultivos como el trigo, donde ciertos genotipos de ciclo corto han demostrado escapar eficazmente de la sequía mediante la expresión de genes relacionados con un tiempo de floración temprano (EFT), que conduce a una transición rápida de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva (Shavrukov et al., 2017).

La tolerancia a la sequía en las plantas implica una serie de factores fisiológicos y bioquímicos, entre los cuales se incluye la síntesis de hormonas como el ABA, la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, el ajuste osmótico mediante la acumulación de osmolitos y osmoprotectores como la prolina, el mantenimiento de un alto contenido de agua y las tasas de fotosíntesis en las plantas (Oguz et al., 2022). En el caso específico del cacao, se han determinado ciertos parámetros bioquímicos para identificar materiales tolerantes al estrés por déficit hídrico. Estos incluyen la acumulación de prolina, glicina betaína (GB), poliaminas, y el incremento de la actividad de enzimas como la nitrato reductasa (NR) y la superóxido dismutasa (SOD) (Alban et al., 2016; Juby et al., 2021).

Cadmio en el suelo

El cadmio es un metal pesado preocupante para el medio ambiente ya que encuentra diversas formas de incorporarse a nuestros ecosistemas. Fuentes humanas como la minería, emisiones de combustión y fertilizantes que contienen cadmio son reconocidas por su influencia en la contaminación de suelos en diferentes partes del mundo. Pero no solo las actividades humanas son responsables, la naturaleza también juega un papel importante, ya que el Cd se une a minerales como sulfuros, carbonatos y fosforitas, dando lugar a concentraciones elevadas en ciertos tipos de rocas (Irfan et al., 2013; Kubier et al., 2019; Liu et al., 2017).

Los suelos en el mundo albergan un promedio de $0,36 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd (Kubier et al., 2019). Este metal está presente principalmente como iones de Cd o formando complejos orgánicos e inorgánicos en la solución del suelo (Gil et al., 2022; Kubier et al., 2019). Se estima que el 99% del Cd presente en la solución del suelo se encuentra como ion libre (Kabata-Pendias, 1993). Este metal se puede encontrar en formas solubles (Cd^{+2} , CdCl^+ , CdSO_4 , CdHCO_3^+) y de baja solubilidad (CdS y $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Cd}(\text{OH})^+$ y $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2^{-2}$) (Gil et al., 2022; Kubier et al., 2019; Zulfiqar et al., 2022). La disponibilidad del Cd y su solubilidad depende de diversos factores del suelo, entre los cuales se destaca el pH del suelo, la CIC, la materia orgánica, la textura del suelo y el tipo de suelo (Gu et al., 2022).

El Cd en el suelo tiene la capacidad de reemplazar a cationes divalentes como Ca, Fe, Zn, Pb y Co en varios minerales debido a su radio iónico similar. Por ejemplo, puede sustituir al Zn en minerales como la esfalerita (Kubier et al., 2019). Los minerales de sulfuro, como la pirita, son fuentes significativas de Cd en sistemas reducidos, llegando a contener hasta 52 mg kg^{-1} de Cd. También, el óxido hidratado de Fe (III) puede adsorber Cd y liberarlo en

la fase acuosa bajo ciertas condiciones redox. Otro caso es el reemplazo del Ca en la apatita, lo que hace que el Cd sea una impureza común en minerales de fosfato y rocas fosfóricas, los cuales son relevantes en la producción de fertilizantes fosfóricos (Kubier et al., 2019).

Concentraciones de Cd en suelo por debajo de 1 mg kg^{-1} se considera como suelo no contaminado, entre 1 a 3 mg kg^{-1} se considera como suelo ligeramente contaminado, y concentraciones superiores a 3 mg kg^{-1} es considerado un suelo contaminado antropogénicamente o debido a su naturaleza pedogeoquímica (Akbar et al., 2006; Irfan et al., 2013; Kubier et al., 2019). En términos de Cd soluble, la concentración máxima permitida en suelos agrícolas varía según el tipo de cultivo y los problemas de salud asociados con la cadena alimentaria. Para el arroz y el trigo, esta concentración puede oscilar entre $0,01$ y $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, mientras que en el cultivo de cacao puede alcanzar hasta $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd (Bravo et al., 2021).

En algunas áreas, se pueden encontrar concentraciones locales de Cd en el suelo que superan los 3 mg kg^{-1} sin contaminación antropogénica. En suelos de Jamaica, la meteorización de fosforitas de depósitos de guano ha producido contenidos de Cd superiores a 770 mg kg^{-1} (Garrett et al., 2008). Además, en países como China, Corea, Estados Unidos, Finlandia y Suecia, las lutitas negras y los suelos asociados presentan contenidos elevados de Cd, llegando a concentraciones de hasta 42 mg kg^{-1} debido a la oxidación de la materia orgánica y los sulfuros, lo que provoca drenaje ácido de la roca y aumenta la movilidad del Cd en el suelo (Liu et al., 2017).

Absorción de cadmio por las plantas

La entrada del Cd^{2+} en las raíces de las plantas se lleva a cabo mediante tres vías principales, tal como sugiere Song et al. (2017):

1. La primera vía implica una interacción rápida y no energética. Consiste en el intercambio instantáneo del H^+ , disociado del ácido carbónico presente en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz mediante la actividad respiratoria de la planta, por el Cd^{2+} que es adsorbido por las raíces a través de la vía apoplástica.
2. La segunda vía de entrada está condicionada por la concentración de Cd en el suelo. El Cd^{2+} entra en las células vegetales mediante canales iónicos compartidos

con otros elementos como Fe^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} . El Cd^{2+} se asocia a proteínas transportadoras de Zn^{2+} y Ca^{2+} mientras atraviesa los canales iónicos correspondientes hasta ingresar a la raíz a través de la vía simplástica.

3. La tercera y última vía es una estrategia activa por parte de las raíces para aumentar la disponibilidad de iones en el suelo de la rizosfera a través de la secreción de compuestos de bajo peso molecular que actúan como quelantes del Cd^{2+} y forman complejos de ligandos metálicos. De esta manera, el Cd^{2+} ingresa a través de la capa epidérmica de la raíz mediante proteínas similares a las "yellow-stripe 1" (YSL) en forma de quelatos. Esta última es típica para plantas de la familia Poaceae.

Las familias de genes transportadores más importantes en la captación del Cd son la permeasa de zinc-hierro (ZIP), las proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural (NRAMP) y las ATPasas transportadoras de metales pesados (HMA). Estas proteínas tienen la capacidad de transportar diversos metales de transición divalentes, como Fe (II), Zn, Mn y Cd (Vanderschueren et al., 2021).

Acumulación de cadmio

La acumulación de Cd en la parte aérea de la planta está influenciada por diversos procesos. Estos incluyen la captación por las raíces, el secuestro en las células corticales de la raíz, la carga del xilema, la translocación de la raíz al brote, la descarga del xilema y el secuestro en los brotes (Shi et al., 2015).

En diversos cultivos, como en el cacao, una interesante estrategia para reducir la absorción de Cd es utilizar portainjertos que acumulen bajos niveles de este metal. Esta técnica común de injerto ha sido empleada para mitigar el estrés de las plantas causado por condiciones químicas adversas del suelo, como la absorción y acumulación de metales pesados en las raíces (Savvas et al., 2010).

Se ha comprobado en diferentes especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana* y soya, que los injertos de plantas que acumulan Cd, cuando se injertan en portainjertos con baja capacidad de translocación de Cd, logran reducir las concentraciones de este metal en la parte aérea de la planta. Este hallazgo sugiere que utilizar portainjertos de baja acumulación de Cd con injertos de alto rendimiento podría ser una estrategia efectiva para

mitigar la bioacumulación de este metal en los órganos fotosintéticos de las plantas (Lewis et al., 2018).

En ciertas plantas, los portainjertos que acumulan Cd en sus raíces han revelado un interesante mecanismo de defensa contra este metal tóxico (De Almeida et al., 2022). Esta habilidad puede interpretarse como una forma de tolerancia a la toxicidad del Cd, ya que permite inmovilizar o quelar el metal en la zona radical, evitando su traslado a la parte aérea de la planta (Pasricha et al., 2021; Pereira et al., 2015). No obstante, en otros casos, la retención del Cd en las raíces se asocia a plantas intolerantes, mientras que la habilidad de translocar metales hacia la parte aérea se considera un indicador de tolerancia (Verbruggen et al., 2009).

La tasa de translocación del Cd desde las raíces hacia los órganos superficiales está gobernada por una serie de procesos. Entre ellos se encuentran el secuestro en vacuolas, la carga del xilema y la transferencia intervascular y del xilema al floema. Durante su transporte radial a través de las células de la raíz, el Cd puede ser retenido en las vacuolas como una medida de protección para evitar su movimiento hacia otros tejidos. Un actor esencial en este proceso es el transportador de entrada ATPasa 3, transportadora de metales pesados (HMA3), localizado en la membrana de las vacuolas. Este descubrimiento ha demostrado ser un factor determinante en el secuestro de Cd en las raíces de diversas especies de plantas (Vanderschueren et al., 2021).

Toxicidad por cadmio en plantas

El cadmio puede volverse tóxico para las plantas incluso en concentraciones muy bajas. Para la mayoría de las plantas, se espera que aparezcan síntomas visibles de toxicidad cuando la concentración de Cd en el tejido vegetal se encuentra en el rango de 3 a 30 mg kg⁻¹ (Dutta et al., 2020; White & Brown, 2010). Sin embargo, las plantas hiperacumuladoras de Cd pueden tolerar concentraciones más altas, llegando hasta 100 mg kg⁻¹ en hojas (Gill & Tuteja, 2011; Verbruggen et al., 2009).

Cuando el Cd alcanza niveles tóxicos para la planta, puede provocar diversos efectos negativos, como disminución en la absorción y translocación de nutrientes y agua, daño oxidativo, alteración del metabolismo de la planta y afectación de su morfología y fisiología (Haider et al., 2021).

Por ejemplo, Zhao et al. (2021) encontró que el tratamiento de 5 a 50 mg kg⁻¹ de Cd tuvo diversos efectos negativos en las plántulas de sasafrás. Aparte de afectar el crecimiento y la biomasa, se observó daño en la estructura de la membrana celular debido al aumento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y una disminución en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). La fotosíntesis también se vio afectada, con una disminución en los parámetros de intercambio de gases y respuesta a la luz fotosintética.

El Cd, en niveles tóxicos, también puede afectar los niveles de clorofila en las plantas, limitando así la actividad fotoquímica del fotosistema II (PSII), ya que es capaz de reemplazar el Mg²⁺ por Cd²⁺ en la clorofila (Andresen et al., 2020; Li et al., 2023). Estudios en hojas de *Salvia sclarea* tratadas con 100 µM de Cd mostraron una disminución del 30% en el contenido de Mg y un 36% en el contenido de clorofila después de ocho días (Dobrikova et al., 2021).

En síntesis, es posible afirmar que el Cd puede ejercer efectos tóxicos directos, como el reemplazo del Mg en la clorofila, y también inducir respuestas como el estrés oxidativo, lo que afecta el crecimiento, desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas expuestas. Estos efectos pueden variar según la especie y el genotipo de la planta.

1. Respuesta fisiológica y bioquímica a la interacción del estrés hídrico y la acumulación de cadmio en cacao

1.1 Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, ya que sus granos son utilizados para la producción de chocolate y otros productos derivados, relacionados con la industria alimenticia cosmética y farmacéutica (Baligar et al., 2008; Romero et al., 2017). Su producción está limitada por factores abióticos como el estrés por sequía y la acumulación de cadmio (Cd) (Bravo et al., 2021; Bunn et al., 2017; Gil et al., 2022).

El cambio climático y la escasez de agua son los principales desafíos para la producción de cacao en todo el mundo, por lo que se hace necesario evaluar e identificar la tolerancia a la sequía en genotipos de cacao para lograr la sostenibilidad a largo plazo de la producción (Suchithra et al., 2023). Diversos estudios han demostrado que las plantas de cacao son sensible a condiciones de déficit hídrico durante su etapa juvenil (De Almeida et al., 2016; García Lozano & Moreno Fonseca, 2016; Zakariyya & Indradewa, 2018). En plantas adultas, es el principal factor que limita su productividad (Alban et al., 2016).

El déficit hídrico en las plantas induce respuestas fisiológicas, como la expresión de hormonas como el ácido abscísico (ABA) y el cierre de estomas, con el propósito de evitar la pérdida de agua por transpiración (E) y reducir la asimilación de CO₂ (Baligar et al., 2008; De Almeida et al., 2016; García Lozano & Moreno Fonseca, 2016; Niether et al., 2020; Osorio Zambrano et al., 2021; Rada et al., 2005). En una segunda fase del estrés, se observa una disminución en la eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII), afectando aún más la tasa fotosintética de las plantas; esta recuperación no se logra a corto plazo, incluso

al restablecer condiciones óptimas de riego (Alban et al., 2016; Araque et al., 2012; De Almeida et al., 2016; Osorio Zambrano et al., 2021). Estudios en cacao bajo potenciales hídricos de la hoja (Ψ_{hoja}) entre -1,0 y -3,5 MPa han mostrado reducciones en el intercambio de gases, tasas fotosintéticas bajas, menor contenido de clorofilas y estrés oxidativo debido al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Alban et al., 2016; Dos Santos et al., 2014; García Lozano & Moreno Fonseca, 2016; Osorio Zambrano et al., 2021; Zakariyya & Indradewa, 2018). En estudios con cacao joven, se han reportado reducciones significativas en la fotosíntesis, llegando hasta el 98%, lo que afecta negativamente el crecimiento de las plantas en términos de acumulación de biomasa, desarrollo de la parte aérea, número de hojas, diámetro del tallo y altura de la planta (García Lozano & Moreno Fonseca, 2016; Niether et al., 2020; Osorio Zambrano et al., 2021).

En cacao, se exhibe una variación genotípica en la respuesta a condiciones de estrés hídrico (Alban et al., 2016; Juby et al., 2021). En genotipos tolerantes al déficit hídrico reportan un incremento en la acumulación de prolina y la respuesta antioxidante, principalmente la glicina betaína (GB), poliaminas y enzimas como superóxido dismutasa (SOD) y nitrato reductasa (NR) (Dzandu et al., 2021; Juby et al., 2021; Niether et al., 2020; Suchithra et al., 2023; Zakariyya et al., 2017). Estos parámetros bioquímicos pueden utilizarse como marcadores para identificar genotipos tolerantes a la sequía en programas de mejoramiento genético (Alban et al., 2016; Juby et al., 2021).

Aunque el cacao se considera una planta acumuladora de Cd^{+2} , este metal pesado puede afectar negativamente la fisiología de la planta (Borjas-Ventura et al., 2022). Generalmente, las plantas muestran síntomas de toxicidad por Cd cuando la concentración total en el suelo supera los 8 mg kg^{-1} , la concentración biodisponible en el suelo es superior a $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$, o la concentración en la planta se encuentra entre 3 y 30 mg kg^{-1} (Chen et al., 2011; He et al., 2017; Meter et al., 2019; Solís-Domínguez et al., 2007). Diversos estudios han informado que existen diferencias genotípicas en la tolerancia al Cd (Castro et al., 2015; Pereira de Araújo et al., 2017).

Se ha observado que concentraciones de Cd en hojas entre 80 y 200 mg kg^{-1} pueden provocar daños estructurales y fisiológicos en las plantas de cacao, como la condensación de la cromatina nuclear, reducción del mesófilo de las hojas, deformación de cloroplastos,

menor fluorescencia de la clorofila, disminución en la tasa fotosintética, menor eficiencia en el uso del agua y reducción en la acumulación de biomasa seca en tallos y hojas (Borjas-Ventura et al., 2022; Castro et al., 2015; Fernández-Paz et al., 2021). La tolerancia del cacao a la acumulación de Cd en las hojas se refleja en tasas de asimilación de CO₂ más altas, mayor actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT), y la expresión de genes involucradas en la síntesis de metalotioneinas y fitoquelatinas, encargadas de secuestrar el Cd y reducir la peroxidación lipídica (Castro et al., 2015; De Almeida et al., 2022).

El estrés combinado de déficit hídrico y toxicidad por Cd ha sido estudiado en diversas especies como trigo, soja y maní, entre otras (Adrees et al., 2020; W. Bashir et al., 2019; Shi et al., 2015; Ünyayar et al., 2005; Xia et al., 2015). Sin embargo, los estudios son limitados y los resultados son contrastantes. En especies como el ricino y el maní, se ha observado que la interacción del estrés por sequía y la acumulación de Cd en la parte aérea de las plantas reduce la fotosíntesis debido a una baja en la conductancia estomática y la transpiración (Shi et al., 2015; Xia et al., 2015). Por otro lado, en la soya, Bashir et al. (2019) encontraron más genes con expresión diferencial bajo la interacción del estrés por sequía y Cd que cuando ambos estreses ocurren por separado. Existe acuerdo en que el estrés combinado aumenta la producción de peróxido de hidrógeno, la pérdida de electrolitos y el contenido de malondialdehído (MDA), así como alteraciones en la morfología de las raíces, gobernada por la tolerancia al estrés hídrico (Adrees et al., 2020; Bashir et al., 2019; Shi et al., 2015; Xia et al., 2015). Sin embargo, hay otras variables fisiológicas que difieren entre investigaciones, especies y genotipos (Bashir et al., 2019; Ünyayar et al., 2005).

En un estudio en tomates, Ünyayar et al. (2005) encontraron diferencias en la respuesta al estrés combinado de déficit hídrico y Cd entre especies. La especie tolerante mostró un aumento en el contenido de clorofila a, b y clorofila total, mientras que la especie susceptible redujo estos pigmentos bajo las condiciones estresantes. Además, ambos grupos presentaron afectaciones en el crecimiento de los brotes, pero no se encontró una relación entre la tolerancia a la sequía y los niveles del sistema de defensa antioxidante inducido por el Cd (Ünyayar et al., 2005). En contraste, un estudio in vitro en plantas de banano realizado por El-Mahdy et al. (2021) sugirió que el efecto de la sequía redujo los efectos dañinos del Cd al minimizar su absorción y acumulación en los órganos aéreos de las plantas. Estos resultados demuestran que las respuestas a la interacción del estrés

hídrico y Cd son complejas y requieren de más investigaciones para comprender su efecto en la fisiología de las plantas.

Aunque el riesgo de sequía y la exposición a suelos contaminados por Cd son condiciones que pueden volverse comunes en zonas cacaoteras de Colombia y el mundo (Bravo et al., 2021; Bunn et al., 2017; Gil et al., 2022), hasta la fecha, no se han publicado estudios que analicen la interacción del estrés por déficit hídrico y la acumulación de Cd en plantas de cacao. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue evaluar el comportamiento fisiológico y bioquímico de plantas jóvenes de cacao frente al estrés por déficit hídrico y la acumulación de Cd.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Localización del experimento

El experimento se realizó bajo condiciones de casa de malla en el Centro de Investigación Nataima – AGROSAVIA, ubicado en una zona de bosque seco tropical a 4°11'31"N y 74°57'41"W, a una altitud de 374 msnm en el municipio de El Espinal (Tolima, Colombia).

1.2.2 Material vegetal

El material vegetal utilizado en este experimento hace parte de un programa de mejoramiento genético de cacao dirigido por la Corporación Colombiana de investigación agropecuaria – AGROSAVIA. Se utilizaron tres progenies de cacao: A2, 1233 e IMC 67. Las progenies A2 y 1233 son dos familias de hermanos completos obtenidos de cruzamientos dirigidos, las cuales presentan diferencias en la tolerancia al déficit hídrico, siendo 1233 el material tolerante, según estudios previos de AGROSAVIA (AGROSAVIA, 2021). La progenie IMC 67 es un genotipo comercial utilizado ampliamente en Colombia como patrón de cacao, obtenida a partir de libre polinización. Los cruzamientos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación Palmira - AGROSAVIA (Valle del Cauca, Colombia) en condiciones de campo.

Las semillas obtenidas se germinaron y se mantuvieron en un medio inerte (arena de río) durante 60 días en el Centro de Investigación Nataima - AGROSAVIA. Posteriormente, se trasplantaron plantas de mes de edad, con entre 6 y 8 hojas verdaderas, en bolsas

plásticas que contenían suelo, en donde se mantuvieron hasta el final del experimento. El suelo utilizado presentaba un contenido promedio de 0,356 mg kg⁻¹ de Cd soluble, determinado siguiendo la metodología de Bravo et al. (2021) (Información anexa 1).

1.2.3 Establecimiento del experimento

Bajo condiciones de casa de malla, se realizó el trasplante en bolsas de plástico negro (60 cm alto x 30 cm de diámetro) con 40 kg de suelo franco, pH promedio de 5,29 y carbono orgánico de 5,1%. El suelo fue previamente homogenizado en tamiz de 12 mm. Considerando los resultados del análisis de suelos (Información anexa 2), cada planta, a los 4 meses de edad, se fertilizó con 5,7 g de Calcinit B (15,5% N; 26,0% Ca; 0,1% B), 8,6 de DAP (18,0% N; 46% P), 5,7 de ManuKiesek (3% K; 24% Mg; S 18%) y 9 ml de Transfer ionic (complejo orgánico de ácidos carboxílicos, gluconatos y ácido ascórbico), con el fin de corregir relaciones iónicas y saturación de bases en el suelo, de acuerdo a los requerimientos nutricionales del cacao (Jaraba et al., 2021a).

Durante el período comprendido entre el trasplante y la aplicación de los tratamientos de estrés hídrico, todas las plantas se hidrataron a capacidad de campo utilizando agua del acueducto. El riego se ajustaba según la humedad del suelo, la cual era monitoreada mediante sensores de humedad volumétrica tipo CS616 (Campbell Scientific®, USA). Se aplicaban entre 250 y 300 cc de agua por planta, con una frecuencia promedio de cada dos días, dependiendo de las condiciones de humedad detectadas.

Los tratamientos de déficit hídrico se establecieron cuando las plantas tenían 6 meses de edad (dos Santos et al., 2014) y se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones en un arreglo factorial, donde el primer factor fueron las progenies: A2, IMC 67 y 1233, y el segundo factor los dos estados hídricos: plantas con estrés por déficit hídrico (ES) y plantas bien regadas (BR). Para el tratamiento BR, las plantas se regaron de manera óptima durante el periodo de evaluación, con el fin de mantener el contenido volumétrico de agua (CVA) del suelo entre 38 y 40% durante el periodo de evaluación (Figura 1). El valor de la capacidad de campo del suelo se determinó mediante curva de retención de humedad del suelo del experimento. El CVA se monitoreó con sensores de humedad volumétrica tipo CS616 (Campbell Scientific®, USA) previamente calibrados en laboratorio usando la metodología descrita en el manual del fabricante. Los sensores se instalaron a 25 cm de profundidad en el suelo, donde se encuentran las raíces secundarias

y absorbentes de las plantas de cacao, encargadas de tomar agua y nutrientes del suelo (Jaraba et al., 2021b).

1.2.4 Tratamientos de estrés hídrico

En condiciones de campo, el potencial hídrico foliar (Ψ_{hoja}) antes del amanecer se mantuvo entre -0,2 y -0,7 MPa, según valores reportados para plantas de cacao en estado hídrico óptimo (Dos Santos et al., 2014). En el tratamiento ES se suspendió el riego por 19 (D19) y 27 días (D27) consecutivos hasta que Ψ_{hoja} alcanzó valores entre $-1,4 \pm -0,4$ y $-2,05 \pm 0,25$ MPa, respectivamente, con el fin de someter las plantas a dos niveles de estrés, moderado y severo (De Almeida et al., 2016; Dos Santos et al., 2014; Rada et al., 2005), momentos en los cuales el CVA presentó el 30 y el 25% (Figura 1). Al final la fase de estrés D19 y D27, todas las plantas se regaron hasta alcanzar valores de capacidad de campo con 38-40% al tercer día, logrando recuperarse de la fase de estrés (fase de rehidratación). Las evaluaciones de la recuperación se realizaron al tercer día después de la rehidratación (DRH).

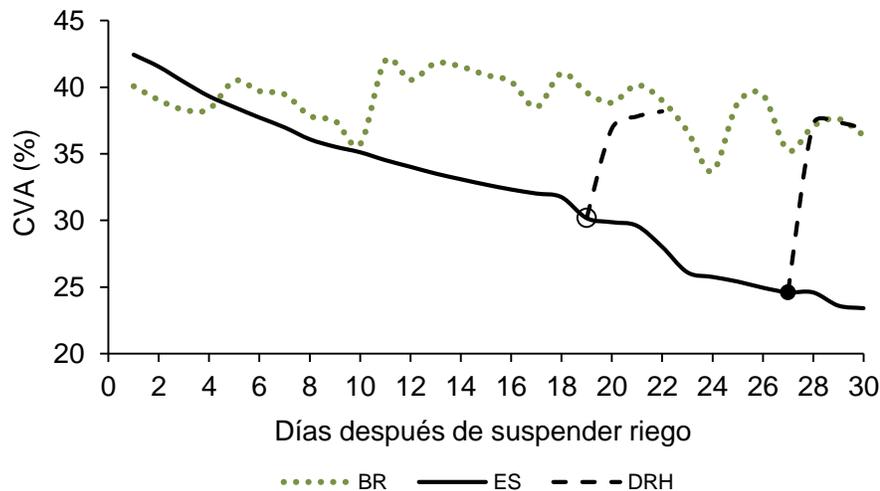


Figura 1. Comportamiento del CVA (%) del suelo bajo dos niveles de déficit hídrico y rehidratación del mismo. Círculo abierto: CVA (%) del suelo cuando las plantas tenían un Ψ_{hoja} entre -1 y -1,8 MPa; Círculo cerrado: CVA (%) del suelo cuando las plantas de cacao tenían un Ψ_{hoja} menor a -1,8 MPa. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; DRH, rehidratación de plantas sometidas a ES durante tres días consecutivos.

Se evaluaron todos los parámetros en tres momentos diferentes: el día 19 y 27 de estrés hídrico (D19 y D27) y al final de la fase de rehidratación (DRH). Sin embargo, la biomasa y el contenido de Cd en la planta solo se determinaron en D19 y D27. Para realizar estas mediciones, las muestras de tejido foliar se trituraron en nitrógeno líquido y luego se conservaron a -80 °C. Posteriormente, se utilizaron estas muestras para determinar las variables fisiológicas y bioquímicas de las plantas de cacao.

1.2.5 Condiciones ambientales durante el experimento

Durante el transcurso del experimento, se realizaron mediciones de variables ambientales clave, como la temperatura del aire (°C), la humedad relativa del aire (% HR) y la radiación solar ($W m^{-2}$). Para este propósito, se utilizaron dos sensores ATMOS 14 de Meter Groups (EE. UU.), adaptados a un Data Logger EM50 y colocados dentro de la casa de mallas. Estos sensores registraron la temperatura y la humedad relativa diariamente, con una frecuencia de muestreo de 30 minutos. Además, para medir la radiación solar, se utilizó la estación meteorológica Vantage Pro2 (Davis Instruments, USA), ubicada a una distancia de 200 metros de la casa de malla. Los datos recopilados durante todo el experimento se muestran en la Figura 2.

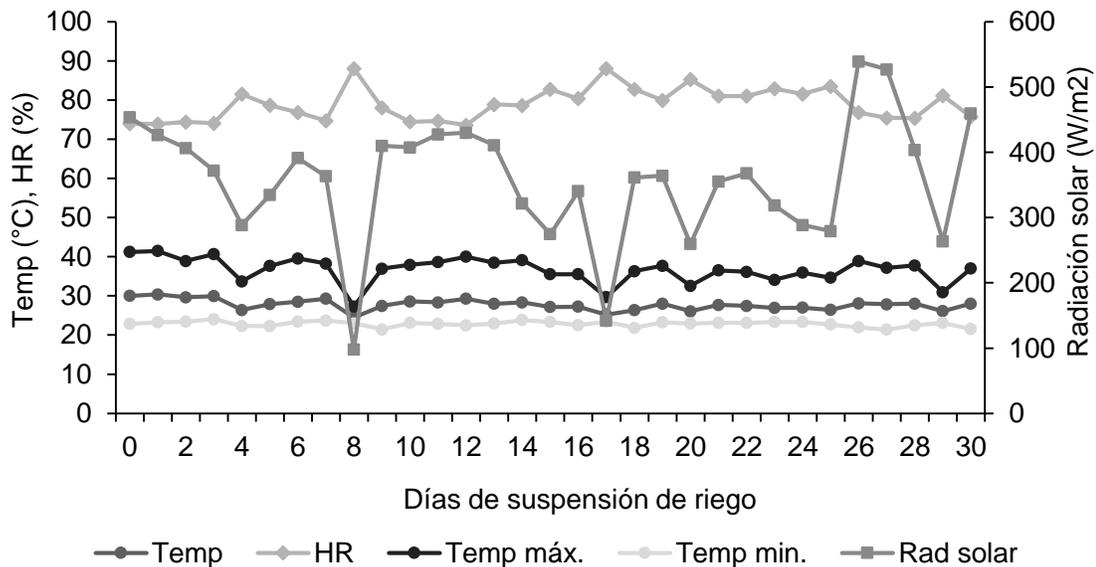


Figura 2. Condiciones de temperatura promedio (Temp), temperatura máxima (Temp máx.), temperatura mínima (Temp mín.), humedad relativa (HR) y radiación solar (Rad solar) diaria, a la que fueron expuestas las plantas de cacao durante el tiempo del experimento.

1.2.6 Potencial hídrico de la hoja

Se determinó Ψ_{hoja} entre las 2:00 a.m. y 4:00 a.m. tomando la tercera hoja madura de arriba hacia abajo (De Almeida et al., 2016) de nueve plantas por tratamiento ($n = 9$) con ayuda de una bomba de presión Schölander (PMS Model 615, Fresno, CA, United States).

1.2.7 Intercambio de gases

Los parámetros de tasa fotosintética (A), conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) y carbono interno (C_i) se registraron de 9:00 a.m. a 12 m en la cuarta hoja madura de arriba hacia abajo (Osorio Zambrano et al., 2021) en doce plantas por tratamiento ($n = 12$), usando un sistema portátil de fotosíntesis LI-6800XT (LI-COR Biosciences Inc. NE, United States) con una concentración ambiental de CO_2 de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (J. De Almeida et al., 2016) y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de acuerdo con los umbrales de respuesta de las curvas de luz para las tres progenies, realizadas previamente al establecimiento de los tratamientos (datos no mostrados). El equipo LI-6800XT también determinó los valores de déficit de presión de vapor (DPV) durante el tiempo de medición del intercambio gaseoso.

1.2.8 Acumulación de biomasa

Se tomaron seis plantas por tratamiento ($n = 6$) y se dividieron en hojas+peciolos, tallos y raíces, se llevaron a una estufa a 60°C durante tres días y se determinó el peso seco de cada órgano en una balanza analítica. La relación raíz/parte aérea de la planta (R_S) se determinó dividiendo peso seco de la raíz entre el peso seco de las hojas+tallo.

1.2.9 Pigmentos fotosintéticos

Se determinó el contenido de carotenoides (Car), clorofila a ($Chla$), clorofila b ($Chlb$) y clorofila total ($ChIT$) en la cuarta hoja madura de nueve plantas por tratamiento ($n = 9$). Se siguió la metodología propuesta por Warren (2008) y Nguyen et al. (2020) con algunas modificaciones. Después de extraer las clorofilas de dos discos (1,5 cm de diámetro) de la cuarta hoja madura con metanol (100%) y centrifugar a 5000 xg por 5 min, se usó el sobrenadante para determinar pigmentos con un lector de microplacas (Epoch BioTek) a

470, 652 y 665 nm. Para el cálculo de clorofilas y carotenoides se usaron las fórmulas propuestas por (Warren, 2008).

1.2.10 Prolina

El contenido de prolina se determinó en la cuarta hoja madura, de arriba hacia abajo, en la misma hoja donde se evaluó el intercambio gaseoso. Se determinó en nueve plantas por tratamiento ($n = 9$) con base en el método de detección de (Bates et al., 1973) modificado por (Ábrahám et al., 2010) y se adicionan las modificaciones de (Barrera et al., 2010). Para obtener el extracto vegetal se usó ácido 5-sulfosalicílico 3% (p/v). La mezcla duró en agitación horizontal (200 rpm) durante 1 hora y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min para obtener el sobrenadante de interés. Se generó un mix de reacción a una relación 1:2:2 con ácido 5-sulfosalicílico 3% (p/v), ácido acético glacial y ninhidrina ácida, el cual se mezcló con el sobrenadante extraído y se dejó en baño María a 90°C por 60 min. La reacción se detuvo en una cama de hielo y posteriormente se le adicionó tolueno, se agitó en vórtex y se midió absorbancia a 520 nm de la fase orgánica de la mezcla. La concentración final de prolina se determinó a partir de la curva patrón de L-prolina (Barrera et al., 2010).

1.2.11 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El contenido de H₂O₂ se determinó en la cuarta hoja madura de nueve plantas por tratamiento ($n = 9$) siguiendo en la metodología desarrollada por (Alexieva et al., 2001) con algunas modificaciones. Se tomaron 0,15 g de tejido foliar previamente congelado en nitrógeno líquido, y se homogenizaron con 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1% (p/v) durante 10 segundos en un vórtex. Posteriormente, se centrifugó a 12000 x g durante 15 min. Se recolectó 0,25 ml del sobrenadante y se le adicionó a 0,25 ml de buffer fosfato (100 mM) y 1 ml de yoduro de potasio (1 M KI p/v en H₂O). Inmediatamente se incubó durante 1 hora en condiciones de oscuridad. El contenido de H₂O₂ se determinó usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 390 nm. La curva estándar de H₂O₂ se hizo preparando varias concentraciones de H₂O₂ puro, iniciando con una solución stock de 1000 ppm.

1.2.12 Malondialdehído (MDA)

El acumulación de MDA, como producto de la peroxidación lipídica, se estimó siguiendo el método de Heath & Packer (1968). Se tomaron muestras de 0,2 g, previamente congeladas en nitrógeno líquido, de la cuarta hoja madura de nueve plantas por tratamiento (n = 9), se homogenizaron con TCA al 5%, se centrifugó 13000 x g durante 20 min. Se extrajo 0,5 ml del sobrenadante y se mezcló con 1 ml de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% y TCA al 20%, se llevó a baño María durante 20 min y posteriormente se centrifugó a 13000 x g durante 5 min y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532, 600 y 440 nm. El equivalente de malondialdehído (MDA) se calculó con las fórmulas de Heath & Packer (1968).

1.2.13 Contenido de cadmio en hojas

Se determinó el contenido de Cd en las hojas, considerando que las variables fisiológicas y bioquímicas también se evaluaron en este órgano de las plantas. Además, se ha demostrado que el Cd presente en las hojas es un indicador predictivo del contenido de Cd presente en los granos de cacao (Wade et al., 2022), de ahí la importancia de determinar la acumulación de Cd en las hojas.

Para determinar el contenido de Cd en las hojas de cacao, se recolectaron todas las hojas de la planta, utilizando tres plantas por progenie (n = 3) en los días 19 y 27 de estrés. Posteriormente, las muestras se sometieron a un proceso de secado en un horno a 70°C durante una semana, hasta alcanzar un peso constante. El contenido total de Cd en hojas se obtuvo utilizando la técnica de espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Lanza et al., 2016).

Los resultados del contenido de Cd en las hojas se expresaron tanto en términos de concentración en mg Cd kg de hojas, como en términos de acumulación en mg de Cd por órgano (hojas).

1.2.14 Análisis estadístico

Se determinaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de las variables evaluadas y se realizó un ANOVA de dos vías (progenie x tratamiento). Se hizo la comparación de medias para evaluar diferencias significativas a través de la prueba HSD

de Tukey. Además, se realizó un análisis de correlaciones de Pearson con los variables para determinar posibles relaciones entre ellas (Figura anexa 2). Los análisis se llevaron a cabo usando el software R (R Studio Versión 4.0.1).

1.3 Consideraciones éticas

1.3.1 Reutilización y reciclaje de materiales

Materiales como mangueras de riego y polisombra fueron dispuestas en la bodega de operaciones de campo de Agrosavia, con el fin de utilizarlos en experimentos posteriores. Las bolsas de plástico donde se encontraban las plantas de cacao fueron dispuestas en canastas de basura específicas para este tipo de material.

1.4 Resultados

1.4.1 Potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja})

El potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) de las plantas de cacao fue significativamente diferente entre los tratamientos de plantas bien regadas (BR) y estresadas (ES) (Figura 3). En plantas bien regadas (BR), el Ψ_{hoja} presentó valores entre -0,31 y -0,61 MPa, mientras que en las estresadas (ES) el Ψ_{hoja} se mantuvo entre -1,51 y -2,09 MPa. En el día 19 (D19) de estrés hídrico, la progenie que redujo en menor medida el Ψ_{hoja} fue 1233 (-1,51 MPa), seguido por IMC 67 (-1,78 MPa) y A2 (-1,87 MPa). Los valores más bajos de Ψ_{hoja} los presentaron las plantas ES en el D27 (-2,04 \pm 0,05 MPa) cuando el CVA alcanzó el 24,6% (Figura 1), sin diferencias significativas entre las progenies. No obstante, a los tres días después de la rehidratación (DRH), todas las progenies previamente sometidas a estrés (ES), mostraron valores de Ψ_{hoja} cercanos a los del tratamiento BR (

Tabla 3).

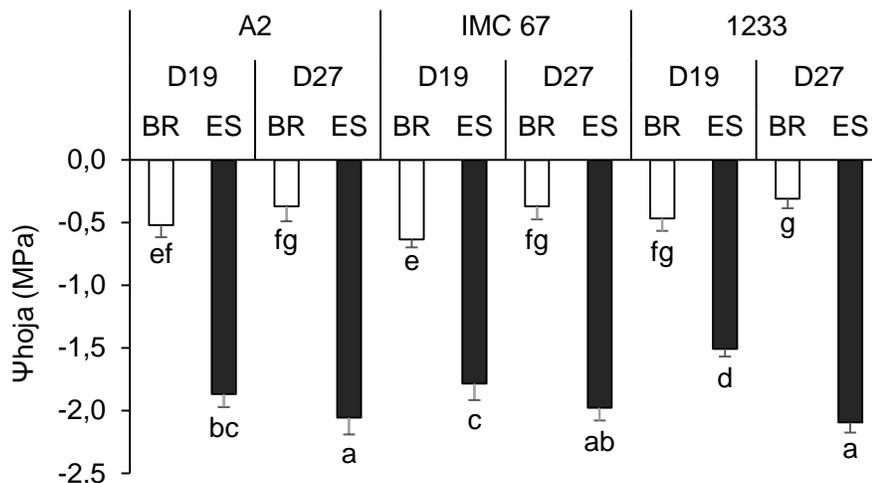


Figura 3. Potencial hídrico de la hoja Ψ_{hoja} (MPa) de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico (D19 y D27, respectivamente). BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico. Valores promedio ($n = 9$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie \times estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

1.4.2 Intercambio de gases

El déficit hídrico afectó la capacidad de las plantas de cacao para intercambiar gases, excepto la variable Ci. En el tratamiento BR, los valores de fotosíntesis (A) se mantuvieron entre 5,92 y 9,08 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y se observaron diferencias significativas entre las progenies y los días de suspensión de riego (D19 y D27) (Tabla 1). Por otro lado, en el tratamiento de estrés (ES), A se redujo un 50,20% en las plantas que estuvieron 19 días sin riego (D19) ($3,55 \pm 0,33 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y hasta un 74,00% en las que permanecieron 27 días ($2,11 \pm 0,57 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Solo se encontraron diferencias significativas en el nivel máximo de estrés (D27) entre las progenies IMC 67 y 1233. Las variables gs y Ci no presentaron diferencias entre las progenies después de 19 y 27 días de estrés. Sin embargo, la progenie IMC 67 mostró una reducción significativa de gs (64,90%) cuando las plantas se dejaron de regar durante 27 días (D27), comparadas con las que se estresaron durante 19 días (D19). Después de rehidratar las plantas estresadas (DRH), los valores de A, gs y E se restablecieron, en promedio, un 94,2% de los valores observados en las plantas bien regadas (BR) (

Tabla 3).

Tabla 1. Parámetros de intercambio gaseoso de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico.

Progenie	Estado hídrico	A		gs		E		Ci	
		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1}$)	
A2	D19	BR	7,46 ± 0,61 c		0,067 ± 0,017 ab		0,0017 ± 0,00032 ab		224,87 ± 45,41 ab
		ES	3,47 ± 0,53 e		0,030 ± 0,014 c		0,0008 ± 0,00033 fg		193,03 ± 71,99 ab
	D27	BR	8,75 ± 0,41 ab		0,078 ± 0,015 a		0,0013 ± 0,00033 bcd		178,67 ± 44,76 b
		ES	2,14 ± 0,57 gh		0,024 ± 0,012 c		0,0004 ± 0,00021 gh		245,97 ± 66,40 ab
IMC 67	D19	BR	5,92 ± 0,50 d		0,057 ± 0,017 b		0,0015 ± 0,00043 abc		212,40 ± 67,11 ab
		ES	3,29 ± 0,37 ef		0,035 ± 0,009 c		0,0009 ± 0,00029 def		217,84 ± 62,24 ab
	D27	BR	6,33 ± 0,52 d		0,069 ± 0,019 ab		0,0012 ± 0,00042 cde		222,42 ± 53,96 ab
		ES	1,54 ± 0,47 h		0,019 ± 0,013 c		0,0003 ± 0,00020 h		249,69 ± 87,27 ab
1233	D19	BR	8,21 ± 0,63 b		0,070 ± 0,016 ab		0,0017 ± 0,00037 a		210,64 ± 34,93 ab
		ES	3,88 ± 0,47 e		0,034 ± 0,011 c		0,0008 ± 0,00024 ef		212,20 ± 54,16 ab
	D27	BR	9,08 ± 0,48 a		0,086 ± 0,021 a		0,0012 ± 0,00020 cde		190,74 ± 58,07 ab
		ES	2,65 ± 0,61 fg		0,034 ± 0,017 c		0,0006 ± 0,00028 fgh		263,18 ± 67,49 a

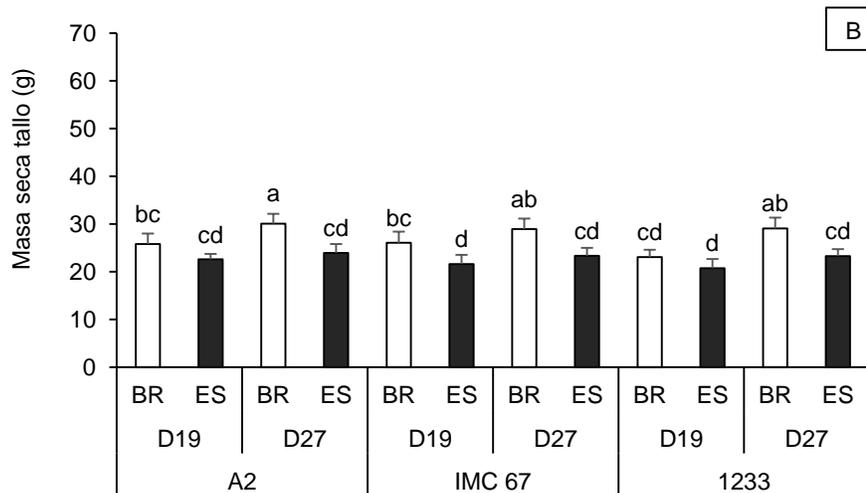
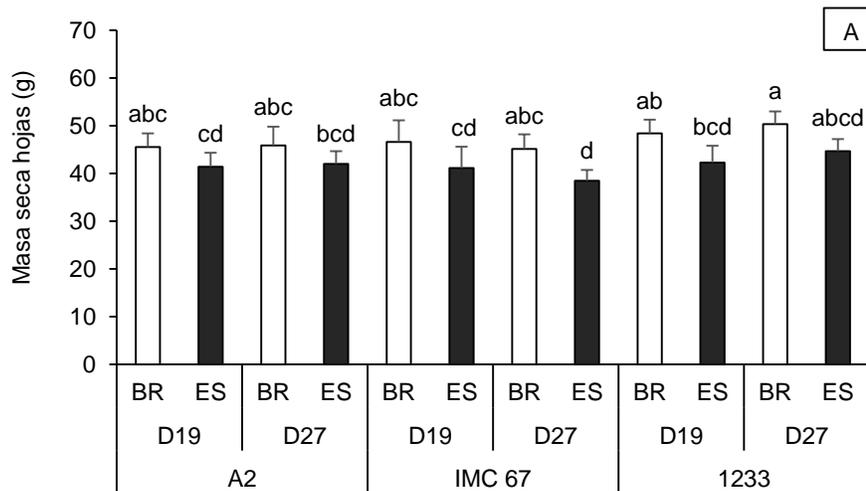
A, tasa fotosintética; gs, conductancia estomática; E, transpiración; Ci, carbono interno, ES, fase de estrés; DRH, fase de rehidratación; D19, 19 días de estrés; D27, 27 días de estrés. Valores promedio (n = 12). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

1.4.3 Acumulación de biomasa

Se observó una menor acumulación de biomasa en las plantas de cacao sometidas a los tratamientos de estrés hídrico (ES) en comparación con las plantas bien regadas (BR) (Figura 4). Sin embargo, la progenie 1233 fue una única excepción, ya que al estar sin riego durante 19 días (D19), acumuló solo un 6,82% menos de biomasa que las plantas control (BR), sin diferencias significativas.

Se encontró que el tallo fue el órgano más afectado por el déficit hídrico, con la progenie IMC 67 mostrando una menor acumulación de biomasa desde el día 19 de estrés (D19). En contraste, en las progenies A2 y 1233, esta menor producción de materia seca solo se

observó en plantas sometidas a 27 días de estrés (D27). Además, solo la progenie IMC 67 presentó una menor biomasa de las hojas en de las plantas estresadas durante 27 días (D27). No se encontraron diferencias significativas en la relación raíz/parte aérea entre los tratamientos y progenies evaluados. Sin embargo, se observó que en el tratamiento de estrés (ES), la progenie 1233 presentó una biomasa mayor en un 5,43% en las plantas que estuvieron 19 días sin riego (D19), mientras que en las progenies A2 e IMC 67 permaneció sin cambios y fue menor que las plantas bien regadas (BR), respectivamente.



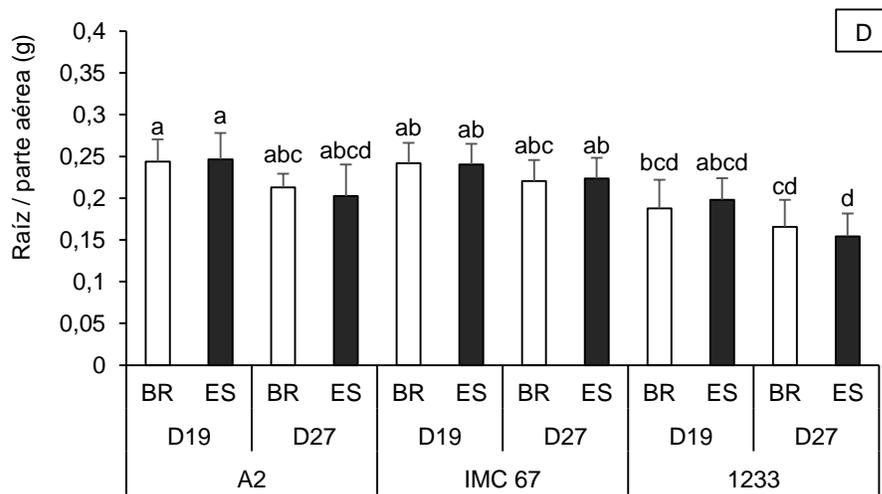
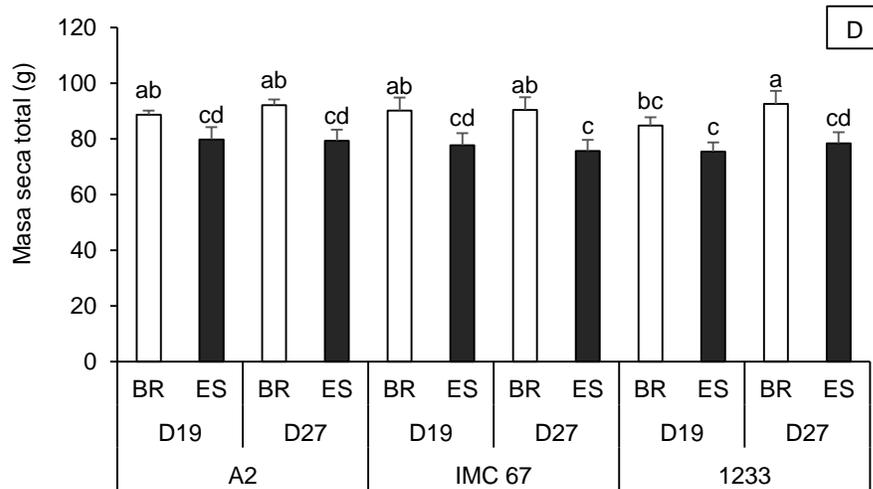
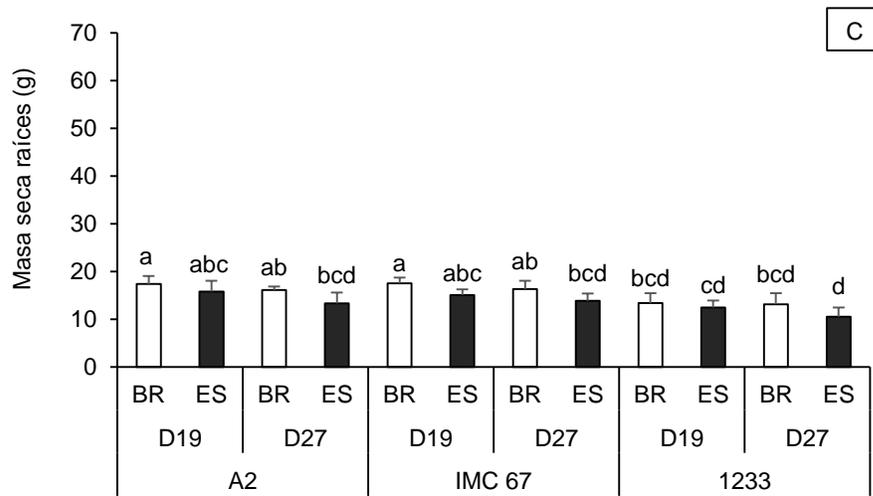


Figura 4. Acumulación de biomasa en (A) hojas, (B) tallo, (C) raíces, (D) total y (E) relación raíz / parte aérea de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. *BR*, bien regado; *ES*, estrés por déficit hídrico; *D19*, estrés por déficit hídrico de 19 días; *D27*, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 6$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

1.4.4 Pigmentos fotosintéticos

En cuanto a los pigmentos fotosintéticos, se observó que el estrés hídrico no tuvo efecto en la clorofila a (Chla). Sin embargo, el tratamiento de estrés (ES) aumentó significativamente la concentración de clorofila b (Chlb) en la progenie A2 cuando las plantas se sometieron a 19 días de estrés (D19), mientras que en la progenie IMC 67 la redujo después de 27 días (D27), ambos con diferencias significativas frente a plantas bien regadas (BR). El aumento de clorofila a y clorofila b en la progenie A2 durante el tratamiento de estrés (ES) resultó en un incremento significativo en la concentración de clorofila total (ChIT) (Tabla 2). Por otra parte, cabe destacar que la progenie A2 fue el único que aumentó significativamente el contenido de carotenoides (Car) cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico (ES). No obstante, la fase de rehidratación (DRH) fue suficiente para que las concentraciones de clorofila b, clorofila total y carotenoides de las plantas estresadas se estabilizaran al nivel de las plantas bien regadas (Tabla 3).

Tabla 2. Pigmentos fotosintéticos en hojas de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico.

Progenie	Estado hídrico		mg L ⁻¹							
			Chla		Chlb		ChIT		Car	
A2	D19	BR	7,90 ± 1,00	d	2,26 ± 0,48	d	10,19 ± 1,12	e	2,29 ± 0,29	d
		ES	9,72 ± 0,78	bcd	3,05 ± 0,34	bc	12,59 ± 0,94	cd	2,87 ± 0,19	bc
	D27	BR	10,82 ± 0,93	bc	2,95 ± 0,39	bc	13,76 ± 0,94	bc	2,93 ± 0,32	bc
		ES	11,47 ± 0,77	b	3,44 ± 0,18	b	14,98 ± 1,02	ab	3,51 ± 0,28	a
IMC 67	D19	BR	8,34 ± 1,76	d	2,27 ± 0,42	d	11,17 ± 1,98	de	2,83 ± 0,37	bcd
		ES	8,55 ± 1,75	d	2,46 ± 0,56	cd	11,26 ± 2,11	de	2,71 ± 0,45	bcd
	D27	BR	13,47 ± 1,59	a	4,08 ± 0,58	a	16,69 ± 1,75	a	3,22 ± 0,54	ab
		ES	11,53 ± 1,35	ab	3,39 ± 0,49	b	15,02 ± 1,78	ab	3,49 ± 0,44	a
1233	D19	BR	9,64 ± 1,20	bcd	2,90 ± 0,49	bc	12,47 ± 1,42	cde	2,83 ± 0,22	bcd
		ES	8,35 ± 1,51	d	2,57 ± 0,50	cd	10,79 ± 1,90	de	2,44 ± 0,40	cd
	D27	BR	9,10 ± 1,31	cd	2,69 ± 0,40	cd	11,63 ± 1,70	cde	2,53 ± 0,39	cd
		ES	9,17 ± 0,86	cd	2,68 ± 0,26	cd	11,94 ± 1,09	cde	2,77 ± 0,24	bcd

BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días; Chla, clorofila a; Chlb, clorofila; ChIT, clorofilas totales; Car, carotenoides. Valores promedio (n = 9). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

1.4.5 Prolina

Los tratamientos de estrés hídrico (ES) aumentaron significativamente el contenido de prolina en las progenies de cacao evaluados. La progenie 1233 presentó un aumento del 160,80% en su contenido de prolina cuando las plantas fueron sometidas a 19 día de estrés (D19), equivalente al incremento observado en A2 (166,40%) e IMC 67 (163,63%) a los 27 días de estrés (D27). En este punto (D27), el contenido de prolina en 1233 aumentó en un 253,92% respecto a las plantas bien regadas (BR) (Figura 5).

La fase de rehidratación (DRH), disminuyó el contenido de prolina en todas las plantas, pero las progenies sometidos a estrés (ES) mantuvieron significativamente mayores niveles de prolina, como la progenie 1233, que mantuvo un incremento del 201,05% respecto a las plantas BR (Tabla 3). Este hallazgo sugiere una adaptación al estrés hídrico

por parte de las plantas de cacao a través de la acumulación de prolina, aunque esta acumulación disminuye rápidamente durante la fase de recuperación.

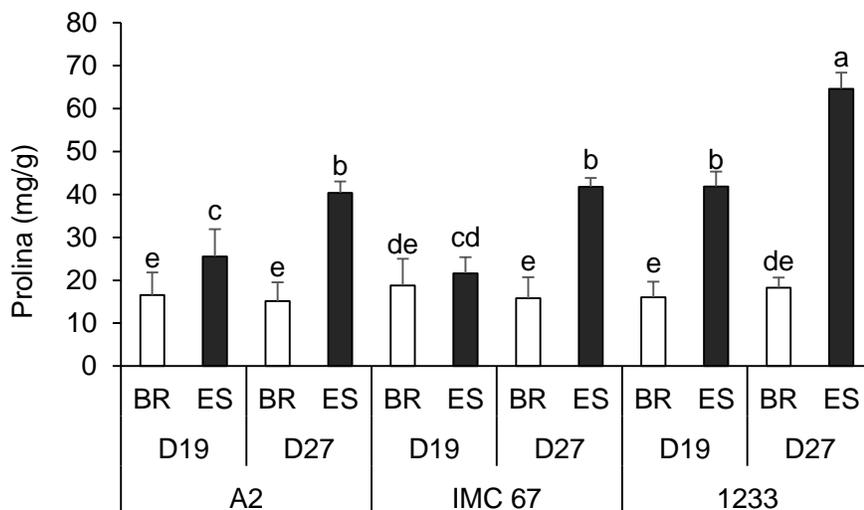


Figura 5. Contenido de prolina (mg g^{-1}) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 9$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

1.4.6 Peroxidación lipídica

Se registró una interacción entre el estado hídrico de las plantas y las diferentes progenies en cuanto al contenido de H_2O_2 en las hojas de cacao. El tratamiento de estrés hídrico (ES) aumentó significativamente el contenido de H_2O_2 en la progenie A2 cuando las plantas se sometieron a 19 y 27 días de estrés, en comparación con las plantas del tratamiento control (BR). En cambio, en IMC 67 y 1233 se observó un aumento del H_2O_2 únicamente cuando las plantas estuvieron 19 y 27 días sin riego, respectivamente (Figura 6).

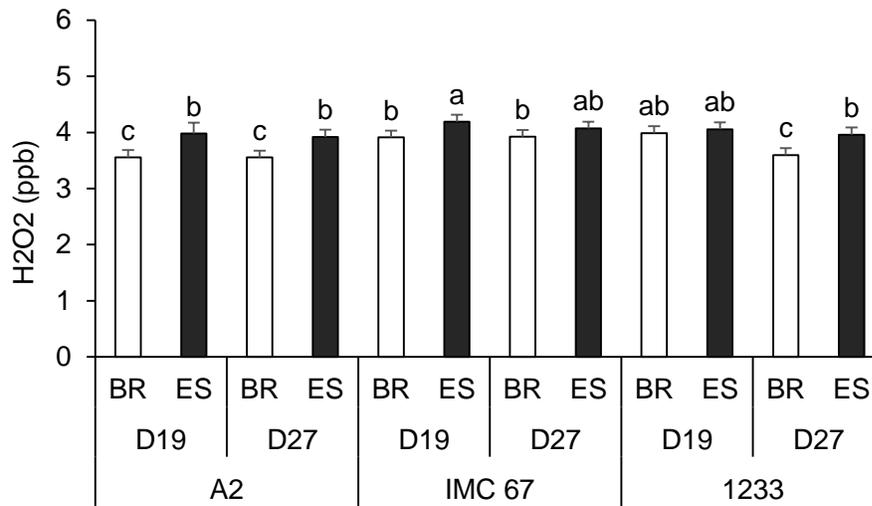


Figura 6. Contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (ppb) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio (n = 9). Diferencias significativas (p < 0,05) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

La rehidratación (DRH) de las plantas estresadas no redujo el contenido de H₂O₂ en las hojas de cacao (Tabla 3). Específicamente, en la progenie IMC 67, se observó un aumento significativo del 10,76% en las plantas rehidratadas que habían sido sometidas a 27 días de estrés (D27), en comparación con las plantas bien regadas durante todo el experimento (BR). Asimismo, en la progenie 1233 se mantuvo la diferencia significativa entre plantas estresadas (ES) y bien regadas (BR) después de haber rehidratadas (DRH). En la progenie A2, el incremento de H₂O₂ en las plantas con riego óptimo (BR) pudo estar relacionado con el contenido de Cd en las hojas, ya que se observó una correlación positiva y significativa entre ambas variables (r = 0,74) (Figura anexa 2A).

Se encontró una correlación entre el contenido de H₂O₂ y MDA en hojas de cacao únicamente en la progenie A2 (Figura anexa 2). Las tres progenies mostraron un incremento en el contenido de MDA en las hojas de las plantas sometidas 27 días de estrés hídrico (D27). La progenie IMC 67 presentó el mayor aumento, con un incremento del 53,85% en comparación con las plantas bien regadas (BR), seguido por A2 (39,27%) y 1233 (16,80%) (Figura 7).

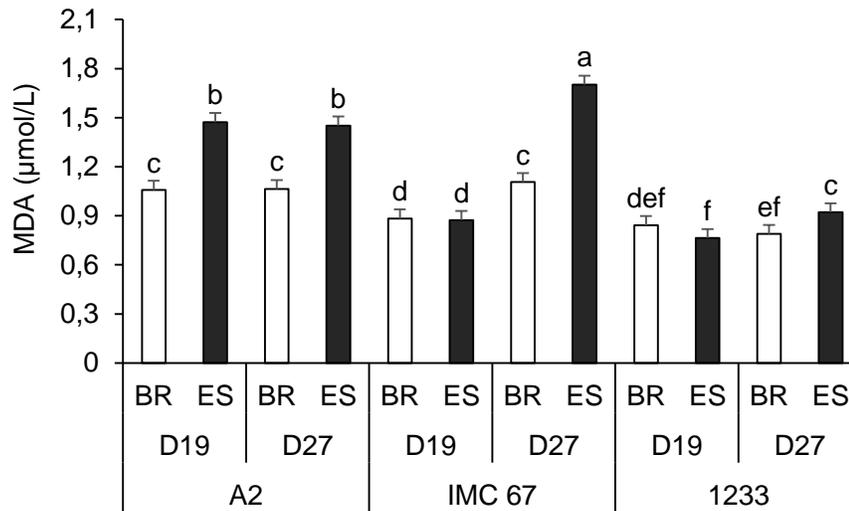


Figura 7. Contenido de malondialdehído (MDA) ($\mu\text{mol L}^{-1}$) en hojas de tres progenies de cacao de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 9$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie \times estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

La rehidratación (DRH) reestableció el contenido de MDA de las plantas sometidas al estrés durante 27 días (D27) al nivel de las plantas bien regadas (BR). Sin embargo, en A2 e IMC 67, las plantas sometidas a estrés durante 19 días (D19) continuaron aumentando el contenido de MDA a pesar de la rehidratación (Tabla 3).

1.4.7 Contenido de cadmio en hojas

Se observó una interacción entre las progenies y el estado hídrico de las plantas en cuanto a la concentración de Cd en las hojas de cacao. La progenie que mayor cantidad de Cd presentó fue la progenie A2, seguido por IMC 67 y 1233. El IMC 67 y 1233 no mostraron una variación significativa en el contenido de Cd en las hojas en relación con el estado hídrico de las plantas. Sin embargo, en la progenie A2, se encontraron diferencias significativas entre plantas bien regadas (BR) y plantas sometidas a estrés hídrico (ES) (Figura 8). Las plantas a las que se suspendió el riego durante 19 días (D19) presentaron un aumento (30,67%) en el contenido de Cd.

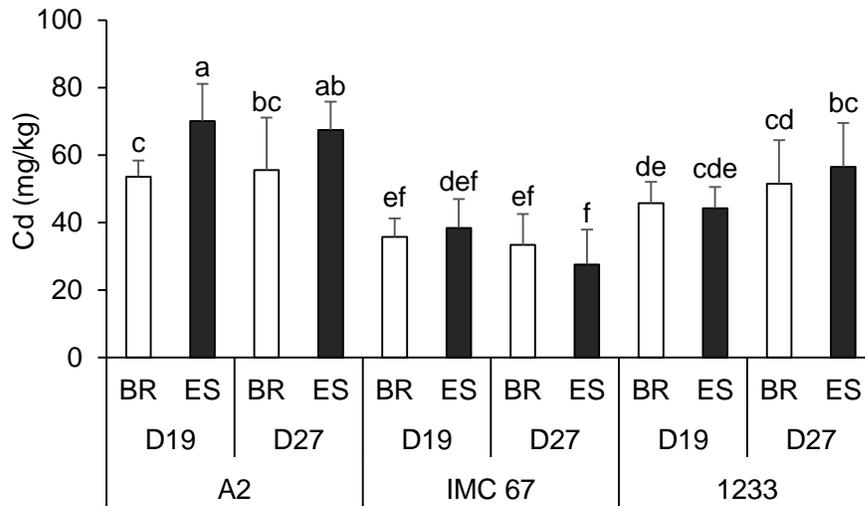


Figura 8. Concentración de Cd (mg kg^{-1}) en hojas de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

1.4.8 Respuestas a la fase de rehidratación

Las variables de potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}), intercambio gaseoso (A, gs, E) y pigmentos fotosintéticos (Chla, Chlb, ChIT y Car) de las plantas rehidratadas (DRH), previamente sometidas a déficit hídrico, se recuperaron al nivel o muy cerca de los valores presentados por las plantas con riego óptimo (Tabla 3). Por su parte, el contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de malondialdehído (MDA) de las plantas rehidratadas (DRH) fue significativamente diferente que en las plantas control (BR). En el caso de la prolina, la rehidratación (DRH) disminuye el contenido, pero no alcanza a llegar al nivel de las plantas bien regadas (BR).

Tabla 3. Comportamiento de variables fisiológicas y bioquímicas de tres progenies de cacao sometidos a rehidratación (DRH) durante tres días consecutivos, después de un déficit hídrico de 19 y 27 días (D19 y D27, respectivamente).

Progenie	Estado hídrico		Ψ_{hoja}		A		gs	
			(MPa)		$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$		$(\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	
A2	D19	BR	-0,34 ±	-0,04 fg	6,74 ±	0,70 b	0,072 ±	0,016 abc
		DRH	-0,33 ±	-0,04 fg	6,72 ±	0,63 bc	0,071 ±	0,011 abc
	D27	BR	-0,42 ±	-0,04 de	7,43 ±	0,80 ab	0,071 ±	0,021 abc
		DRH	-0,52 ±	-0,06 bc	7,31 ±	0,79 ab	0,071 ±	0,024 abc
IMC 67	D19	BR	-0,33 ±	-0,06 ef	5,60 ±	0,68 d	0,054 ±	0,019 bc
		DRH	-0,47 ±	-0,06 cd	5,82 ±	0,65 cd	0,051 ±	0,013 c
	D27	BR	-0,57 ±	-0,07 ab	6,55 ±	0,69 bc	0,061 ±	0,026 abc
		DRH	-0,54 ±	-0,05 abc	6,69 ±	0,60 bc	0,073 ±	0,015 abc
1233	D19	BR	-0,29 ±	-0,06 g	7,45 ±	0,63 ab	0,080 ±	0,020 a
		DRH	-0,37 ±	-0,05 ef	6,71 ±	0,68 bc	0,050 ±	0,014 c
	D27	BR	-0,61 ±	-0,05 a	8,17 ±	0,83 a	0,076 ±	0,016 ab
		DRH	-0,62 ±	-0,07 a	6,89 ±	0,75 b	0,070 ±	0,014 abc

Continuación

Progenie	Estado hídrico		E		Ci		Chla	
			$(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$		$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol air}^{-1})$		$(\mu\text{mol ml}^{-1})$	
A2	D19	BR	0,0015 ±	0,0005 abc	237,87 ±	32,05 a	8,30 ±	1,58 c
		DRH	0,0015 ±	0,0003 abc	224,21 ±	32,06 a	8,58 ±	1,14 bc
	D27	BR	0,0013 ±	0,0007 abc	217,39 ±	67,40 a	11,03 ±	0,82 a
		DRH	0,0015 ±	0,0008 abc	234,32 ±	49,60 a	10,56 ±	1,17 a
IMC 67	D19	BR	0,0009 ±	0,0003 c	203,02 ±	49,44 a	10,32 ±	1,67 ab
		DRH	0,0009 ±	0,0002 c	213,59 ±	36,02 a	8,69 ±	0,99 bc
	D27	BR	0,0011 ±	0,0004 bc	185,46 ±	43,54 a	10,18 ±	1,59 ab
		DRH	0,0013 ±	0,0003 abc	214,90 ±	53,82 a	9,21 ±	1,39 abc
1233	D19	BR	0,0017 ±	0,0005 ab	236,34 ±	31,41 a	9,28 ±	0,76 abc
		DRH	0,0009 ±	0,0002 c	193,27 ±	56,93 a	10,30 ±	1,45 ab
	D27	BR	0,0018 ±	0,0008 a	239,76 ±	31,90 a	10,63 ±	1,52 a
		DRH	0,0012 ±	0,0005 abc	184,07 ±	48,28 a	9,51 ±	1,01 abc

Continuación

Progenie	Estado hídrico		Chlb	Chltotal	Car
			($\mu\text{mol ml}^{-1}$)	($\mu\text{mol ml}^{-1}$)	($\mu\text{mol ml}^{-1}$)
A2	D19	BR	2,44 \pm 0,47 e	10,66 \pm 2,02 d	2,36 \pm 0,45 d
		DRH	2,62 \pm 0,43 cde	11,00 \pm 1,37 cd	2,42 \pm 0,25 cd
	D27	BR	3,43 \pm 0,23 a	13,79 \pm 1,08 a	2,75 \pm 0,28 abcd
		DRH	3,29 \pm 0,32 ab	13,40 \pm 1,54 ab	2,84 \pm 0,38 abcd
IMC 67	D19	BR	3,19 \pm 0,41 abc	13,43 \pm 1,98 ab	3,11 \pm 0,40 a
		DRH	2,59 \pm 0,36 de	11,40 \pm 1,29 bcd	2,71 \pm 0,31 abcd
	D27	BR	3,05 \pm 0,51 abcd	13,10 \pm 1,97 abc	2,92 \pm 0,38 ab
		DRH	2,79 \pm 0,46 bcde	11,79 \pm 1,79 abcd	2,58 \pm 0,41 bcd
1233	D19	BR	2,47 \pm 0,25 e	11,99 \pm 0,94 abcd	2,71 \pm 0,18 abcd
		DRH	2,98 \pm 0,43 abcde	13,15 \pm 1,73 abc	2,86 \pm 0,45 abc
	D27	BR	2,99 \pm 0,47 abcde	13,59 \pm 1,93 ab	2,96 \pm 0,40 ab
		DRH	2,48 \pm 0,47 e	12,17 \pm 1,27 abcd	2,66 \pm 0,27 abcd

Continuación

Progenie	Estado hídrico		Prolina	H ₂ O ₂	MDA
			(mg g^{-1})	(ppb)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)
A2	D19	BR	14,04 \pm 5,38 d	3,91 \pm 0,14 de	1,19 \pm 0,08 bc
		DRH	19,09 \pm 5,70 bc	4,06 \pm 0,15 bcd	1,70 \pm 0,08 a
	D27	BR	13,56 \pm 2,78 d	3,70 \pm 0,14 de	1,08 \pm 0,08 cd
		DRH	19,44 \pm 2,40 bc	4,15 \pm 0,15 bcd	1,18 \pm 0,08 bc
IMC 67	D19	BR	19,77 \pm 5,62 b	3,97 \pm 0,14 bcd	1,05 \pm 0,08 d
		DRH	19,05 \pm 2,28 bc	4,17 \pm 0,14 bcd	1,29 \pm 0,08 bc
	D27	BR	13,57 \pm 3,53 d	4,00 \pm 0,15 bcd	1,04 \pm 0,09 d
		DRH	19,11 \pm 4,89 bc	4,43 \pm 0,15 a	0,88 \pm 0,08 e
1233	D19	BR	15,40 \pm 3,30 cd	3,94 \pm 0,15 cd	1,05 \pm 0,09 d
		DRH	16,38 \pm 2,82 bcd	4,13 \pm 0,14 bcd	0,99 \pm 0,09 de
	D27	BR	13,41 \pm 2,55 d	3,94 \pm 0,15 cd	0,62 \pm 0,08 e
		DRH	26,97 \pm 4,52 a	4,18 \pm 0,14 e	0,73 \pm 0,08 e

BR, bien regado; DRH, rehidratación de plantas sometidas a D19 y D27; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días; Ψ_{hoja} , potencial hídrico de la hoja; A, tasa fotosintética; gs, conductancia estomática; E, transpiración; Ci, carbono interno; Chla, clorofila a; Chlb, clorofila b; ChIT, clorofila total; Car, carotenoides; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; MDA, malondialdehído. Diferencias significativas ($p < 0,05$) con

ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba HSD de Tukey.

1.5 Discusión

1.5.1 Comportamiento fisiológico del cacao al déficit hídrico

El potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) es un indicador del estado de hidratación de las plantas y su capacidad para evitar la pérdida de agua a través de la transpiración (Lahive et al., 2019). Varios estudios sugieren que las plantas jóvenes de cacao experimentan estrés moderado cuando el Ψ_{hoja} varía entre -0,8 y -1,5 MPa, y estrés severo por debajo de -1,76 MPa (Deng et al., 1990; Medina & Laliberte, 2017; Osorio Zambrano et al., 2021). Según nuestros resultados, después de 19 días de someter las plantas a déficit hídrico (D19), la progenie 1233 mostró estrés moderado (-1,5 MPa), mientras que A2 e IMC 67 experimentaron un estrés intermedio (-1,9 y -1,8 MPa, respectivamente), entre moderado y severo (Figura 3). Después de 27 días de someter las plantas a déficit hídrico (D27), las tres progenies presentaron valores de Ψ_{hoja} indicativos de un estrés severo. En el cacao, las progenies tolerantes al déficit hídrico muestran valores de Ψ_{hoja} menos negativos que las progenies susceptibles (Balasimha et al., 1991; Osorio Zambrano et al., 2021), lo que sugiere que la progenie 1233 es más tolerante al déficit hídrico que A2 e IMC 67.

La capacidad de recuperación de las plantas estresadas después de la rehidratación (DRH) (Tabla 3), indica que las tres progenies podrían tolerar estos niveles de estrés. Esto está en línea con lo reportado por Osorio Zambrano et al. (2021), quienes encontraron que los clones de cacao recuperaron los valores de Ψ_{hoja} similares a las plantas bien regadas después de cuatro días de riego de recuperación, a pesar de haber llegado a valores por debajo de -2,3 MPa.

La sensibilidad en la regulación estomática ante el estrés hídrico es un rasgo fisiológico crucial para las plantas, ya que determina la pérdida de agua durante el proceso de transpiración (Lahive et al., 2019). Según Carr & Lockwoods (2011), *Theobroma cacao* comienza a cerrar parcialmente sus estomas cuando Ψ_{hoja} alcanza aproximadamente -1,5 MPa. Con este valor de Ψ_{hoja} (-1,5 MPa), la progenie 1233 alcanzó una reducción del 51,43% en la conductancia estomática (gs) a los 19 días de estrés hídrico (D19) (Tabla 1). Estos resultados indican que el cierre estomático probablemente comenzó cuando el

potencial hídrico de la hoja era mayor a $-1,5$ MPa, lo que demuestra una alta sensibilidad en la regulación estomática, un rasgo fisiológico importante para la tolerancia al estrés por déficit hídrico (Araque et al., 2012; Lahive et al., 2019).

Normalmente, valores bajos de g_s en condiciones de déficit hídrico se consideran un rasgo de tolerancia (Gupta et al., 2020; Osakabe et al., 2014). No obstante, algunos estudios sugieren que g_s y E no son un método de detección adecuado de genotipos tolerantes (Balasimha et al., 1991). Los valores de g_s disminuyeron en condición de déficit hídrico, consistente con lo reportado por Osorio Zambrano et al., (2021), pero no hubo diferencias entre progenies ni entre niveles de estrés (Tabla 1). La g_s no solo depende del contenido de agua en el suelo y la planta, el déficit de presión de vapor (DPV) es una condición ambiental que incide en la regulación estomática (Baligar et al., 2008; Lahive et al., 2019). Para el cacao, cuando el DPV se encuentra por debajo de $1,8$ kPa, la demanda evaporativa es baja, como sucedió en el día 27 de estrés ($1,57$ kPa), por lo que las plantas de cacao pueden mantener sus estomas más abiertos que cuando se supera este valor (García Lozano & Moreno Fonseca, 2016) y es posible que no se observen diferencias entre niveles los de estrés evaluados, tal cual como lo mostraron nuestros resultados (Figura anexa 1).

La correlación entre Ψ_{hoja} y la fotosíntesis (A) ($r > 0,94$) (Figura anexa 2) y la reducción promedio de la conductancia estomática (g_s) de las progenies evaluados ($48,36\%$ y $67,35\%$ en el D19 y D27, respectivamente), sugiere una respuesta sensible de las estomas para la regulación de la pérdida de agua por transpiración, y como consecuencia la reducción de A por una disminución del consumo de CO_2 . Este comportamiento apoya la hipótesis que la respuesta fotosintética al déficit hídrico está fuertemente gobernada por la conductancia estomática en plantas de cacao (De Almeida et al., 2016; Osorio Zambrano et al., 2021) y otras especies perennes (Jiménez et al., 2013; Martínez-Ferri et al., 2019; Ramalho et al., 2018).

El estado hídrico y las variables de intercambio gaseoso en las tres progenies se recuperaron después de rehidratar las plantas de cacao a capacidad de campo durante 3 días. Osorio Zambrano et al. (2021) evaluó ocho genotipos de cacao, los cuales rehidrató durante dos días después de someterlos a estrés severo ($-2,0$ a $-2,5$ MPa) y solo dos lograron recuperarse al nivel del control en variables de intercambio gaseoso. Esto sugiere que el restablecimiento de la actividad fotosintética en las plantas de cacao depende del

genotipo y que las limitaciones de la fotosíntesis en este estudio fueron principalmente estomáticas (Drake et al., 2017), ya que la asimilación de CO₂ se ajustó una vez lo hizo la conductancia estomática y el potencial hídrico de la hoja (Figura 3; Tabla 1).

La sorprendente recuperación de las variables de intercambio gaseoso en la progenie A2 después de la rehidratación es notable (Tabla 3), considerando que previamente se le había caracterizado como susceptible al déficit hídrico. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que esta progenie muestra una tolerancia a los niveles de estrés evaluados (-1,9 y -2,1 MPa) y a los períodos de suspensión de riego (19 y 27 días), dadas las condiciones edafoclimáticas en las que crecieron las plantas.

La fijación reducida de CO₂ en condiciones de estrés hídrico da como resultado una disminución en el suministro de NADP⁺ y un aumento relativo en la tasa de transferencia de electrones fotosintéticos a O₂, que es utilizado como aceptor de electrones para formar O₂⁻, desencadenando la producción los radicales libres de oxígeno reactivo (Yang et al., 2021). La mayoría de estudios en *Theobroma cacao* bajo condiciones de estrés hídrico evalúan la actividad y expresión de antioxidantes enzimáticos (Dos Santos et al., 2020; Lewis et al., 2021; Osorio Zambrano et al., 2021) como medidas indirectas de la producción de ROS. En el presente estudio se determinó el contenido de H₂O₂ y se encontró que se correlaciona negativamente con el Ψ_{hoja} en las progenies A2 ($r = -0,85$), IMC 67 ($r = -0,70$) y 1233 ($r = -0,50$) (Figura anexa 2). El contenido de H₂O₂ fue significativamente mayor en plantas estresadas (ES) que en plantas bien regadas (BR), excepto la progenie 1233 donde la producción de este radical libre permaneció al nivel del control (BR) y aumentó solo después de 27 días de estrés hídrico (Figura 6).

En el estudio realizado por Wang et al. (2010), se observó un aumento en el contenido de H₂O₂ en las hojas de arroz bajo condiciones de estrés hídrico. Además, se encontró que este incremento fue más pronunciado y ocurrió de manera más temprana en los híbridos de arroz menos tolerantes a la sequía en comparación con los más tolerantes. Estos hallazgos respaldan la idea de que la progenie 1233 exhibe una mayor tolerancia al estrés hídrico que A2 e IMC 67. En concordancia con estos resultados, se observó que las progenies A2 e IMC 67 presentaron un aumento significativo en el contenido de H₂O₂ en el día D19 bajo el tratamiento de estrés hídrico (ES) en comparación con el tratamiento sin

estrés (BR) (Figura 6). Estos cambios en el contenido de H_2O_2 en las hojas está asociado a la capacidad antioxidante de la progenie (Wang et al., 2010).

Sin embargo, durante la rehidratación (DRH) continuó incrementando el contenido de H_2O_2 tanto en plantas bien regadas (BR) como en plantas estresadas (ES) en las progenies A2 y 1233 (Tabla 3). Estos resultados están en línea con lo reportado por Loggini et al. (1999) en dos genotipos de trigo sometidos a déficit hídrico (-2,32 y -1,96 MPa) y posteriormente rehidratados (-0,37 y -0,30 MPa, respectivamente). En uno de los genotipos, se observó un aumento significativo del contenido de H_2O_2 (aproximadamente un 33%) en el cuarto día de rehidratación en comparación con el momento de estrés, mientras que en el otro genotipo no se observaron cambios significativos. Este incremento en el contenido de H_2O_2 fue asociado con una reducción en la actividad antioxidante como resultado de la rehidratación (Loggini et al., 1999).

El H_2O_2 puede funcionar como una señal para la inducción de los sistemas de defensa de las plantas y esto podría mejorar la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, la respuesta de la progenie a la acumulación de H_2O_2 en las primeras etapas del estrés hídrico puede aumentar o reducir la peroxidación de lípidos y la acumulación de contenido de H_2O_2 (Berglund & Ohlsson, 1995). Por esto es posible que la producción de H_2O_2 y MDA se dé en diferentes momentos, pues el MDA es un compuesto más estable que se acumula gradualmente en las membranas celulares, mientras que el H_2O_2 está sujeto a la degradación enzimática en condiciones de estrés (Ibrahim & Jaafar, 2012; Stankovic et al., 2022). Esta podría ser la razón por la cual el contenido de H_2O_2 y de MDA no se correlacionaron en las progenies IMC 67 y 1233 (Figura anexa 2B, 2C).

La producción de ROS puede ocurrir en diferentes orgánulos celulares, siendo los cloroplastos y las mitocondrias los principales responsables. Estos orgánulos presentan una elevada actividad de oxidación o una intensa función de transferencia de electrones, los cuales se dan durante los procesos de fotosíntesis y respiración, respectivamente (Yang et al., 2021), siendo los cloroplastos la principal fuente de producción de ROS en las plantas (Dietz, 2016). En el presente estudio, solo se observó una reducción del contenido de clorofila b (Chlb) en la progenie IMC 67, específicamente un descenso del 16,91% en día 27 (D27) de estrés hídrico (Tabla 2).

Por otra parte, y en contraste con las expectativas, en la progenie A2, la concentración de Clorofilas totales (ChIT) aumentó significativamente en las plantas de cacao sometidas a estrés hídrico (ES) (Tabla 2). Este fenómeno ha sido reportado en otros estudios en condiciones de déficit hídrico, como en el caso del maní (Arunyanark et al., 2008) y la papa (Romero et al., 2017). En el maní, este aumento se asoció con un aumento en el grosor de las hojas, mientras que en la papa se relacionó con una mayor concentración debido a la reducción del área foliar. En relación con esto, la progenie A2 mostró la menor reducción en masa seca de la hoja durante los tratamientos de estrés hídrico, tanto en el D19 como en el D27, con descensos del 9,08% y 8,37%, respectivamente (Tabla 2). Por otro lado, la progenie IMC 67 fue el único en el que se observó una disminución en la concentración de ChIb bajo estrés hídrico (Tabla 2), y a su vez, presentó la mayor reducción en materia seca de las hojas, con disminuciones del 11,80% y 14,77% en el D19 y D27, respectivamente. Aunque no se haya encontrado una correlación entre el contenido de pigmentos y la biomasa de las hojas (Figura anexa 2), es posible que exista una relación indirecta que afecte la concentración de clorofilas por área en las diferentes progenies.

En cuanto a los carotenoides, se observó que no disminuyeron en las progenies IMC 67 y 1233 en el tratamiento de plantas estresadas (ES). Estos resultados coinciden con los informados por Shawon et al. (2018) en *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*, donde se encontró que el contenido de carotenoides no se vio afectado o solo se redujo marginalmente en plantas sometidas a estrés por sequía. Por otro lado, en la progenie A2 se observó un aumento en los carotenoides en las plantas debido al estrés hídrico, tanto a los 19 (D19) como a los 27 días (D27) sin riego, con incrementos del 25,33% y 19,80%, respectivamente (Tabla 2). Este fenómeno también ha sido reportado en otras especies vegetales, como *Populus cathayana* y *Helianthus annuus* bajo condiciones de estrés hídrico y salino (Umar & Siddiqui, 2018; Xiao et al., 2008). En *Theobroma cacao* no se encuentran estudios publicados sobre el comportamiento de los carotenoides en plantas sometidas a déficit hídrico.

Considerando que un mayor contenido de clorofila y carotenoides se ha asociado con la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés (Terzi & Kadioglu, 2006), la progenie A2 revela mecanismos de tolerancia diferentes a los otros progenies evaluados. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas en el contenido de pigmentos fotosintéticos después de la rehidratación (DRH) (Tabla 3), lo cual sugiere que,

independientemente de los mecanismos específicos, las tres progenies mostraron tolerancia a los niveles de estrés hídrico a los que fueron sometidos en el presente estudio.

1.5.2 Respuesta fisiológica a la interacción entre el déficit hídrico y la acumulación de cadmio en hojas

En las progenies evaluados, no se encontró una correlación entre el contenido de Cd y el potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) (Figura anexa 2), lo que indica que, bajo las condiciones de este experimento, el contenido hídrico de la planta no es determinante para la acumulación de Cd en las hojas de las progenies de cacao analizados en este estudio. Sin embargo, en la progenie A2, se observó una mayor concentración de Cd en las hojas de las plantas jóvenes de cacao bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 8). Este comportamiento ha sido reportado en especies como la soya (Bashir et al., 2019), trigo (Abbas et al., 2018; Adrees et al., 2020) y maní (Liu et al., 2016; Xia et al., 2015). Estos resultados fueron asociados al aumento en la concentración de Cd en la planta debido a la reducción de la biomasa ocasionada por el déficit hídrico al que fueron expuestas.

Nuestros resultados mostraron que, en la progenie IMC 67, pese a la condición de estrés, no se observó un aumento en el contenido de Cd en hojas, aunque haya habido una menor acumulación de la biomasa acumulada del órgano (Figura 8; Figura 4). Además, no se encontró una correlación entre la acumulación de Cd en las hojas y la biomasa en ninguno de las progenies (Figura anexa 2), incluido A2, donde aumentó el contenido de Cd bajo el estrés hídrico. Esto sugiere que otros factores, además del estatus hídrico y la menor acumulación de materia seca, influyen en el contenido de Cd en las hojas de la progenie A2. En el caso de la progenie IMC 67, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cd entre plantas estresadas (ES) y plantas con riego óptimo (BR) (Figura 8), pero se observó una correlación positiva entre la acumulación de Cd y las variables de intercambio gaseoso g_s ($r = 0,63$), E ($r = 0,73$) y A ($r = 0,55$) (Figura anexa 2B). Esto indica que la reducción en la transpiración y la conductancia estomática durante el estrés hídrico puede reducir la absorción y acumulación de Cd en las hojas, limitando su entrada en la planta. Para las otras dos progenies, no se pudo determinar qué factores específicos están relacionados con la acumulación de Cd en las hojas en respuesta al estrés hídrico.

De acuerdo a diversos estudios, la concentración de Cd tiende a aumentar en las plantas que experimentan condiciones de déficit hídrico, debido a la reducción de la biomasa

acumulada (Liu et al., 2016; Xia et al., 2015). En los resultados del presente estudio, solo la progenie A2 presentó una correlación entre la concentración de Cd y el potencial hídrico de la hoja ($r = -0,67$), pero el Cd en hojas y la biomasa de la planta (Figura anexa 2). En esta progenie se registró un incremento del 23,54% ($70,07 \text{ mg kg}^{-1}$) y 17,55% ($67,40 \text{ mg kg}^{-1}$) en la concentración de Cd en las hojas de las plantas de la progenie A2 sometidas a 19 (D19) y 27 días (D27) de estrés hídrico, respectivamente, en comparación con las plantas con riego óptimo (BR) ($53,57 \text{ mg kg}^{-1}$ y $55,57 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente) (Figura 8). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las demás progenies evaluadas.

El Cd es altamente tóxico para la mayoría de las plantas, incluso en concentraciones bajas en las hojas, superiores a valores entre 5 y 10 mg kg^{-1} (White & Brown, 2010). Cuando la concentración de Cd en las hojas alcanza niveles de entre 3 y 30 mg kg^{-1} , se observan síntomas visibles de toxicidad en la mayoría de las plantas (Dutta et al., 2020), con excepción de especies hiperacumuladoras de Cd, que pueden tolerar concentraciones foliares de hasta 100 mg kg^{-1} (Gill & Tuteja, 2011; Verbruggen et al., 2009). En este estudio, las plantas de cacao presentaron concentraciones de Cd que se encuentran por encima de lo reportado como tolerable para la mayoría de las plantas (entre 3 y 30 mg kg^{-1}) (Figura 8).

Se ha comprobado en diversos estudios que la acumulación de Cd en el cacao puede tener efectos tóxicos a nivel fisiológico (De Almeida et al., 2022; Dos Santos et al., 2020; Pereira De Araújo et al., 2017). Pereira de Araújo et al. (2017) demostraron que una concentración de Cd de $388,970 \text{ mg kg}^{-1}$ en las hojas de plántulas de cacao ocasionó daños severos en la fotosíntesis. Además, Fernández-Paz et al. (2021) observaron reducciones significativas en la tasa fotosintética y la biomasa de la planta en dos de cuatro genotipos evaluados cuando las concentraciones de Cd en las hojas estaban entre 80 y 100 mg kg^{-1} , valores cercanos a los nuestros. Con una concentración de $61,7 \pm 8,4 \text{ mg kg}^{-1}$ en la progenie A2 y se presentó una correlación negativa entre el contenido de Cd y la fotosíntesis (A) ($r = -0,54$). En las demás progenies no se observó una correlación entre estas dos variables.

La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluido el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es el resultado de la reducción de CO_2 fijado en condiciones de estrés hídrico y una de las primeras respuestas del estrés causado por metales pesados en las

células vegetales (Lajayer et al., 2017; Yang et al., 2021). La acumulación de ROS en las células del mesófilo debido a la presencia de Cd ha sido identificada como una causa de la reducción de la fotosíntesis en el cacao (De Almeida et al., 2022). En nuestros resultados, se observó una correlación entre el contenido de H_2O_2 y la fotosíntesis (A) en las progenies A2 ($r = -0,74$), IMC 67 ($r = -0,56$) y 1233 ($r = -0,56$) (Figura anexa 2). Sin embargo, solo en la progenie A2 se encontró una alta correlación entre el contenido de H_2O_2 y la concentración de Cd en la hoja ($r = 0,74$) (Figura anexa 2A). Esto quiere decir que, en las progenies IMC 67 y 1233, la producción de H_2O_2 estuvo influenciada exclusivamente por las diferencias entre el contenido de agua en la planta de las plantas estresadas (ES) y las plantas bien regadas (BR).

El efecto tóxico del Cd sobre los pigmentos fotosintéticos ha sido documentado en diversas especies vegetales, incluyendo el cacao (Parmar et al., 2013; Pereira de Araújo et al., 2017). Con el objetivo de determinar si las concentraciones de Cd en las plantas del experimento tuvieron algún efecto tóxico sobre los pigmentos fotosintéticos, nos basamos en los valores reportados por Fernández-Paz et al. (2021), en plantas de cacao de la misma edad (6-7 meses), pertenecientes a diferentes genotipos, establecidas en un suelo libre de contaminación por Cd. En su estudio, el contenido de Clorofila total (ChIT) total varió entre 15,35 y 18,18 $mg L^{-1}$, mientras que en las progenies evaluadas en nuestro experimento fue de $12,65 \pm 4,04 mg L^{-1}$ (Tabla 2). Con esos valores de Clorofila total, los autores citados registraron tasas de fotosíntesis entre 6,50 y 9,00 $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$, en comparación con $7,63 \pm 1,71 CO_2 m^{-2} s^{-1}$ en nuestras progenies de interés (Tabla 1). Por lo tanto, aunque los niveles de clorofila parecen ser inferiores en nuestras plantas y podrían indicar una toxicidad debido a la acumulación de Cd, las tasas fotosintéticas se mantienen dentro del rango que Fernández-Paz et al. (2021) reportaron para plantas de cacao de la misma edad sin presencia de Cd en sus hojas.

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica y su incremento en condiciones de estrés por metales se considera un indicador importante del daño oxidativo en las plantas (De Almeida et al., 2022; Najeeb et al., 2011). En presencia de Cd, se ha observado que el MDA tiende a aumentar debido al estrés oxidativo (Cho & Seo, 2005; Mukherjee, 2017; Rellán-Álvarez et al., 2006). En un estudio reciente, De Almeida et al. (2022) evaluaron diferentes combinaciones de copa y portainjerto en plantas de cacao con contenidos de Cd entre 100 y 150 $mg kg^{-1}$ en las hojas. En estas combinaciones, se

observó un incremento significativo en el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente MDA.

Bansal et al. (2021) llevaron a cabo un estudio en *Lens culinaris* donde encontraron una correlación positiva del contenido de Cd con el H₂O₂ ($r = 0,86$) y el MDA ($r = 0,89$). Además, se observó una correlación positiva entre el contenido de H₂O₂ y MDA ($r = 0,72$). Este fenómeno también ha sido reportado en otras especies como el frijón (Gutiérrez-Martínez et al., 2020) y el tomate (Cho & Kim, 2003). En nuestro experimento, se observó un comportamiento similar entre el H₂O₂ y MDA ($r = 0,86$) únicamente en la progenie A2, mientras que en las demás progenies no se encontró esta correlación (Figura anexa 2A).

La reducción de la biomasa total de las plantas en condiciones de déficit hídrico se atribuye no solo a la disminución en la asimilación de CO₂, sino también a un incremento en la biosíntesis de osmolitos, como la prolina. La síntesis de prolina se realiza a partir del glutamato a través de vías enzimáticas dependientes del NADPH. En situaciones de estrés, es probable que el glutamato se destine principalmente a la síntesis de prolina en lugar de aminoácidos, lo que limita la producción de materia seca (Furlan et al., 2020). Cabe resaltar que la fase rehidratación (DRH), disminuyó significativamente la cantidad de prolina en las hojas (Tabla 3), posiblemente por un aumento en la actividad de la enzima prolina deshidrogenasa (PDH), que degrada la prolina en glutamato (Verbruggen & Hermans, 2008), permitiendo su reutilización en la síntesis de aminoácidos y la producción de biomasa.

En cuanto al contenido de prolina, se observó un aumento en las tres progenies bajo ambos niveles de estrés, siendo la progenie 1233 la que acumuló la mayor cantidad de prolina en sus hojas, con un contenido un 43,75% y 36,44% mayor que las otras progenies en los días 19 y 27 de estrés, respectivamente (Figura 5). La acumulación de prolina es una respuesta prioritaria de las plantas al déficit hídrico, ya que ayuda a compensar la pérdida de turgencia mediante el ajuste osmótico a través de la acumulación de solutos y osmolitos (Blum, 2017). Según Niether et al. (2020), este aumento en la acumulación de prolina en las hojas de las plantas jóvenes de cacao es una respuesta a corto plazo al estrés por déficit hídrico. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, si el estrés hídrico persiste en el tiempo, la prolina puede degradarse y perder su función como respuesta al estrés (Niether et al., 2020).

En el caso del cacao, la acumulación de prolina se considera un indicador de tolerancia al estrés hídrico (Dzandu et al., 2021; Zakariyya et al., 2017). En consonancia con nuestros resultados, un estudio realizado por Juby et al. (2021) encontró que los híbridos de cacao más tolerantes al déficit hídrico presentaron los niveles más altos de contenido de prolina. Por lo tanto, a partir de nuestros hallazgos en relación con esta variable, podemos inferir que la progenie 1233 demuestra ser más tolerante a ambos niveles de estrés evaluados. No obstante, el contenido de prolina encontrado en las tres progenies evaluadas en el presente estudio, supera el valor reportado por Juby et al. (2021) para los híbridos tolerantes ($0,411 \text{ mg kg}^{-1}$).

El contenido de prolina en las hojas no solo mostró una correlación negativa con Ψ_{hoja} ($r = -0,85$), sino que también se encontró una correlación positiva con el contenido de Cd en las hojas ($r = 0,74$), específicamente en la progenie A2 (Figura anexa 2A). La acumulación de prolina en respuesta al exceso de metales como Cd, Cu, Zn y Ni ha sido reportada en diversas especies vegetales (Ahmad, 2012; Alia & Saradhi, 1991; Carpena et al., 2003; Singh & Prasad, 2014; Yilmaz & Parlak, 2011), incluyendo el cacao (Dos Santos et al., 2023; Dos Santos et al., 2020). Por ejemplo, en un estudio realizado por Dos Santos et al. (2020), en cacao, se observó un incremento en los niveles de prolina respecto al control, con valores de hasta $1,73 \text{ mg g}^{-1}$ en plantas de 4,2 meses de edad con un contenido de Cd de 90 mg kg^{-1} en las hojas. De acuerdo a nuestros resultados, las progenies evaluados presentaron valores promedio de prolina en plantas sin estrés (BR) de $16,77 \text{ mg g}^{-1}$, con contenidos de Cd entre $33,33$ y $55,57 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 5), los cuales superan significativamente los valores reportados por Dos Santos et al. (2020). Esto indica que las tres progenies evaluados poseen la capacidad de acumular prolina en presencia de Cd en las hojas.

La acumulación de prolina en plantas expuestas tanto a condiciones de déficit hídrico como a niveles tóxicos de metales pesados, evidencia su potencial antioxidante al reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica (Ashraf & Foolad, 2007; Dos Santos et al., 2023; Hossain et al., 2010). La prolina muestra una alta capacidad antioxidante debido a su reacción directa con el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical hidroxilo (OH), los cuales se generan con frecuencia en presencia de H_2O_2 y metales pesados (Matysik et al., 2002; Singh & Prasad, 2014). Además, la prolina actúa como quelante y forma complejos prolina-metal, reduciendo la actividad del ion metálico Cd^{2+} libre (Alia & Saradhi, 1991; Sharma et al., 1998). Estas propiedades contribuyen a la estabilización de

proteínas, ADN y membranas, previniendo así la peroxidación lipídica en respuesta al exceso de metales como el Cd (Singh & Prasad, 2014).

El contenido de prolina en respuesta al estrés hídrico y la acumulación de Cd en las hojas de la progenie A2, mostró una correlación positiva tanto con el contenido de H₂O₂ ($r = 0,80$) como con el MDA ($r = 0,79$) (Figura anexa 2A). Dado el papel de la prolina como antioxidante no enzimático, es plausible que haya desempeñado una función protectora en esta progenie, lo que se refleja en una recuperación completa de la asimilación de CO₂ en tan solo tres días de rehidratación (DRH) (Tabla 3). Investigaciones previas realizadas en *Jatropha curcas* por Makholwa et al. (2021) han encontrado que las accesiones con mayores niveles de prolina en las hojas presentan una menor acumulación de MDA. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en las progenies 1233 e IMC 67.

En la progenie 1233, se observó una correlación significativa entre los niveles de prolina y el MDA ($r = 0,51$) (Figura anexa 2A). Esto se tradujo en una mayor acumulación de prolina bajo estrés hídrico (Figura 5) y una menor cantidad de MDA (Figura 7) en comparación con las otras progenies, sin diferencias significativas con las plantas control (BR) en el D19 de estrés. En promedio, los niveles de prolina fueron un 43,75% más altos en esta progenie que en A2 e IMC 67. Sin embargo, la progenie IMC 67, aunque mostró una acumulación menor de prolina comparado con la progenie 1233, no presentó diferencias significativas en los niveles de MDA entre los tratamientos de estrés hídrico y las plantas control en el D19 (Figura 7), y mostró una correlación fuerte entre los niveles de MDA y prolina ($r = 0,82$) (Figura anexa 2C). Estos resultados respaldan la idea de que la acumulación de prolina en las progenies estudiadas bajo condiciones de estrés hídrico indica un mejor mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Makholwa et al., 2021).

La prolina, además de que funciona como antioxidante no enzimático (Dos Santos et al., 2020) y osmolito compatible para realizar ajuste osmótico en las células (Blum, 2017), es capaz de mejorar de la eficiencia del fotosistema II (PSII) y el metabolismo de la clorofila (Altuntaş et al., 2020). La progenie A2 mostró un incremento en la concentración de Chlb, variable que se correlacionó con el Ψ_{hoja} ($r = -0,62$) y el contenido de Cd en las hojas ($r = 0,58$), a pesar de que, generalmente, se reporta que el déficit hídrico y el Cd disminuyen el contenido de este tipo de pigmentos fotosintéticos (Lisar et al., 2012; Pereira de Araújo et al., 2017; Zakariyya & Indradewa, 2018). Algunos estudios reportan resultados similares

a los nuestros. Bajo condiciones de déficit hídrico, el aumento en la concentración de clorofilas ha sido atribuido a la reducción foliar y al incremento en el grosor de las hojas (Arunyanark et al., 2008; Romero et al., 2017). Por otro lado, Zhou & Qiu (2005) observaron que algunas plantas consideradas hiperacumuladoras de Cd aumentaron el contenido de clorofilas en presencia de este metal, como es el caso de *Sedum alfredii*. Además, la relación de clorofila a/b mostró una disminución, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que encontramos una correlación moderada negativa ($r = -0,5$) entre clorofila a/b y el Cd en las hojas, específicamente en la progenie A2 (Figura anexa 2A).

En un estudio llevado a cabo por Fernández-Paz et al. (2021), se evidenció que el incremento de clorofilas en plantas de cacao expuestas a Cd estuvo influenciado por el genotipo. Estos hallazgos respaldan nuestros resultados, donde solo la progenie A2 entre los tres evaluados mostró un aumento significativo en la concentración de clorofilas (Tabla 2). Además, Fernández-Paz et al. (2021) no solo reportó un incremento en las clorofilas, sino también en otros pigmentos, como los carotenoides. Nuestros resultados coinciden, ya que el contenido de carotenoides también se incrementó en la progenie A2 (Tabla 2), pero exclusivamente en respuesta al déficit hídrico, y presentó una correlación negativa moderada con Ψ_{hoja} ($r = -0,63$) (Figura anexa 2A).

Los carotenoides desempeñan un papel importante al disipar el exceso de energía causado por la reducción en la asimilación de CO_2 , mediante la estabilización estructural de los complejos de captación de luz (LHC) (Sun et al., 2022). Además, actúan como antioxidantes no enzimáticos, eliminando el oxígeno singlete, y proporcionan precursores para la biosíntesis de fitohormonas clave en la respuesta al déficit hídrico, como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas (SL) (Pompelli et al., 2010; Sun et al., 2022; Telfer, 2005). La acumulación de estos pigmentos en condiciones de déficit hídrico se asocia con la tolerancia relativa de las plantas a este tipo de estrés (Pompelli et al., 2010; Terzi & Kadioglu, 2006).

El análisis de los resultados anteriores muestra que tanto el déficit hídrico como la acumulación de Cd indujeron estrés oxidativo en las plantas de la progenie A2. Por lo tanto, las respuestas observadas, como el aumento de clorofilas y prolina, son el resultado de la interacción entre el déficit hídrico y el Cd. Sorprendentemente, a pesar de ser clasificada como susceptible al déficit hídrico, la progenie A2 mostró una recuperación en las variables

de intercambio gaseoso tras la rehidratación, lo que sugiere la presencia de otros factores que podrían estar contribuyendo a su tolerancia al estrés hídrico.

Un estudio en arroz realizado por Oono et al. (2014) reveló que la señalización del estrés por Cd controla la expresión de genes involucrados en las vías de señalización del estrés por sequía en el arroz. A la luz de este hallazgo, no podemos descartar la posibilidad de que en la progenie A2, la acumulación de Cd haya contribuido a una respuesta mejorada al estrés hídrico, gracias a las respuestas inducidas por el estrés oxidativo derivado de la presencia de este metal en la planta.

1.6 Conclusiones

El estrés hídrico indujo cambios en la fisiología de las plantas jóvenes de cacao en las progenies evaluadas. Estos cambios fueron influenciados tanto por el genotipo como por la duración del estrés hídrico. Las tres progenies exhibieron mecanismos de respuesta al estrés hídrico que les permitieron evitar limitaciones de tipo no estomáticas de la fotosíntesis. Las plantas de la progenie 1233 demostraron una capacidad destacada para mantener el estado hídrico de la planta y niveles bajos de peróxido de hidrógeno, durante un estrés moderado. Por otro lado, la progenie A2 mostró la capacidad de aumentar la concentración de pigmentos fotosintéticos en condiciones de estrés, incluso bajo un estrés severo.

Asimismo, la recuperación de las variables de intercambio gaseoso, el potencial hídrico de las hojas y los pigmentos fotosintéticos en las plantas de cacao, después de tan solo 3 días de rehidratación, tras haber experimentado un déficit hídrico de aproximadamente un mes, sugiere que los tres genotipos poseen la capacidad de tolerar los niveles de estrés evaluados (-1,5 a 2,1 MPa).

Adicionalmente, la acumulación de prolina y pigmentos antioxidantes, como los carotenoides, demostraron mitigar los efectos negativos del estrés hídrico en los tres genotipos evaluados. Además, se observó que la interacción entre el estrés hídrico y la acumulación de Cd en las hojas de las plantas de la progenie A2 indujo una mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos, como las clorofilas y carotenoides, lo que probablemente mitigó el daño oxidativo a los fotosistemas causado por el estrés hídrico y la acumulación de Cd.

Las plantas de la progenie A2, previamente consideradas susceptibles al déficit hídrico por AGROSAVIA, mostraron una notable capacidad de recuperación tras la rehidratación. Es posible que la acumulación de Cd haya contribuido a una mejor respuesta al estrés hídrico, gracias a las respuestas inducidas por el estrés oxidativo en ambas condiciones. Sin embargo, los resultados del estudio no permiten concluir definitivamente sobre este aspecto, ya que no se cuenta un tratamiento de suelo sin Cd para comparar la respuesta de las plantas sometidas únicamente al estrés hídrico.

Es importante resaltar que este estudio proporciona información valiosa sobre un aspecto poco explorado en el cacao, ampliando el conocimiento sobre la respuesta de esta planta a condiciones estresantes combinadas. Además, destaca el potencial de los pigmentos como los carotenoides, que pueden actuar como antioxidantes y componentes clave en la respuesta del cacao a estas condiciones.

2. Acumulación de cadmio en plantas de cacao sometidas a déficit hídrico

2.1 Introducción

La acumulación de cadmio (Cd), un metal pesado altamente tóxico, en los cultivos agrícolas representa una preocupación creciente debido a sus efectos adversos tanto en la salud humana como en el ambiente (Maddela et al., 2020). El cacao (*Theobroma cacao* L.), uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, no escapa a esta problemática, ya que sus granos son la materia prima para la producción de chocolate, y se ha identificado como una fuente dietética significativa de Cd (Moore et al., 2020).

América del Sur y América Central albergan regiones cacaoteras donde se han registrado los niveles más altos de Cd en los granos de cacao en comparación con otras regiones del mundo, con valores que pueden estar entre 0,6 y 0,8 mg kg⁻¹. Estas concentraciones pueden superar los límites máximos permitidos por la Unión Europea, que fija un límite tolerable máximo de 0,8 mg kg⁻¹ a chocolates con sólidos de cacao superiores o iguales al 50% (Chavez et al., 2015; Florida Rofner, 2021; Meter et al., 2019). Esta situación plantea preocupaciones significativas para la calidad y seguridad de los productos derivados del cacao.

Según Savvas et al. (2010), la selección adecuada de portainjertos puede ayudar a mitigar la toxicidad de los metales en las plantas, ya que estos no solo afectan la absorción de metales, sino también su translocación de la raíz a la parte aérea (De Almeida et al., 2022; Savvas et al., 2010). Generalmente, el contenido de Cd es mayor en las raíces que en los brotes, ya que las raíces actúan como una barrera eficaz para reducir la translocación de Cd hacia la parte aérea (Shahid et al., 2016). Algunos portainjertos de cacao han demostrado la capacidad de restringir la carga de Cd a través del xilema y acumulación en los órganos aéreos (Albacete et al., 2015; Fernández-Paz et al., 2021).

Existen indicios de que ciertos portainjertos, que acumulan Cd en sus raíces, pueden utilizar mecanismos de defensa como la inmovilización o quelación del Cd en este órgano (De Almeida et al., 2022). Por otro lado, Pereira de Araújo et al. (2017) interpretaron el hecho de que las plantas translocaron el cadmio hacia los órganos aéreos como una señal de tolerancia al Cd, ya que las plantas intolerantes tienden a acumularlo principalmente en las raíces (Verbruggen et al., 2009). Diversos estudios también han reportado que la tolerancia a la acumulación de Cd está en función de las diferencias genotípicas (Castro et al., 2015; Pereira de Araújo et al., 2017).

Aunque se han realizado algunos estudios previos para investigar la variación genética en la acumulación y distribución de Cd en el cacao, estos estudios han sido limitados en términos del número de genotipos evaluados, las condiciones ambientales en las que se llevaron a cabo y la falta de información sobre la bioacumulación de Cd en el cacao (Lewis et al., 2018). Adicionalmente, la mayoría de los estudios sobre la absorción y acumulación de Cd en plantas jóvenes de cacao se llevan a cabo utilizando suelos o sustratos artificialmente enriquecidos con fuentes solubles de Cd, como el cloruro de cadmio (CdCl_2) (De Almeida et al., 2022; Pereira de Araújo et al., 2017) y el nitrato de cadmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) (Fernández-Paz et al., 2021). Asimismo, los estudios realizados en suelos contaminados con Cd, sin la adición de fuentes específicas de este metal pesado para el estudio, se han llevado a cabo en plantaciones con una antigüedad superior a diez años (Arévalo-Gardini et al., 2017; Barraza et al., 2017; Furcal-Beriguete & Torres-Morales, 2020; Lewis et al., 2018).

Hasta el momento, no se han realizado estudios que aborden la interacción entre el déficit hídrico y la acumulación de Cd en el cacao. Sin embargo, en especies como el ricino, la mostaza de la India y el tomate, entre otras, se ha observado que la absorción y acumulación de Cd en los tejidos tiende a disminuir en función de la transpiración de las plantas bajo condiciones de déficit hídrico (Baudh & Singh, 2012; Shi et al., 2015; Ünyayar et al., 2005). Por otro lado, en trigo, soya y maní, se ha reportado que la concentración de Cd tiende a aumentar debido a la reducción en la acumulación de biomasa bajo condiciones de estrés hídrico (Abbas et al., 2018; Adrees et al., 2020; Bashir et al., 2019; Liu et al., 2016; Xia et al., 2015).

La absorción y acumulación de Cd en condiciones de déficit hídrico parecen depender en gran medida del genotipo y su tolerancia a esta condición. Según Bashir et al. (2019), los

cultivares de soya tolerantes son menos afectados en términos de longitud, área y diámetro de las raíces en comparación con los susceptibles, lo que les permite absorber una mayor cantidad de Cd del suelo. En el caso de especies de tomate, Ünyayar et al. (2005) encontró que el Cd se acumuló en mayor cantidad en las raíces de la especie sensible a la sequía que en la tolerante a la sequía, lo que generó diferencias en la translocación de este metal hacia la parte aérea de las plantas. Los autores concluyeron que existe una clara relación entre la absorción de Cd y la tolerancia a la sequía (Ünyayar et al., 2005). Por otro lado, para el ricino, Shi et al. (2015) informó que la translocación de Cd desde la raíz hacia los órganos aéreos no se vio afectada por el estrés hídrico.

El análisis previo revela que existen diferencias significativas entre especies y genotipos en la acumulación de Cd bajo condiciones de déficit hídrico. Por lo tanto, se considera esencial estudiar este comportamiento en las plantas de cacao, dado que el déficit hídrico y la presencia de Cd en el suelo son situaciones cada vez más comunes en las zonas cacaoteras de Colombia y el mundo debido al cambio climático y la contaminación de suelos por metales pesados como el Cd (Bravo et al., 2021; Bunn et al., 2017; Gil et al., 2022).

En este sentido, el objetivo de este capítulo fue evaluar la influencia e interacción del genotipo y el contenido de agua en el suelo en la acumulación y distribución de Cd en plantas de cacao. A diferencia de otros estudios que emplean sustratos o suelos enriquecidos artificialmente con fuentes solubles de Cd, como $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ y CdCl_2 (De Almeida et al., 2022; Fernández-Paz et al., 2021; Pereira de Araújo et al., 2017), esta investigación se realizó bajo condiciones más cercanas a la realidad del campo, donde las plantas crecieron sin la adición de fuentes externas de Cd.

2.2 Materiales y métodos

Se empleó el mismo material vegetal descrito en el Capítulo 1 para evaluar la acumulación de cadmio en las plantas de las progenies evaluadas. A continuación, se describe la metodología para determinar las variables relacionadas con el Cd en el suelo y la planta.

2.2.1 Contenido de cadmio en el suelo

El suelo utilizado para el crecimiento de las plantas en el experimento fue extraído de un lote ubicado en el Centro de Investigación Tibaitatá - AGROSAVIA, el cual se dedica a la

producción agropecuaria. Este suelo fue seleccionado específicamente por su contenido inicial de Cd pseudototal ($4,85 \text{ mg kg}^{-1}$) y por sus propiedades fisicoquímicas para el desarrollo de las plantas de cacao (Información anexa). Dado el uso del suelo durante las últimas décadas, se considera que el Cd tiene un origen antropogénico, debido a la actividad agropecuaria, específicamente al uso de fertilizantes fosfóricos que enriquecen el suelo con este metal.

Con el fin de garantizar uniformidad, se homogeneizó una cantidad total de 10,08 toneladas de suelo, la cual se utilizó para llenar bolsas de plástico negro con una capacidad de 40 kg cada una, de 65 cm de alto por 28 cm de diámetro. Estas bolsas fueron utilizadas posteriormente para trasplantar las plántulas de cacao que tenían entre seis y ocho hojas verdaderas.

El contenido de Cd en el suelo se determinó siguiendo la metodología descrita por (Bravo et al., 2021). La concentración de Cd pseudototal se determinó mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente con emisión óptica (ICP-OES) (Thermo Scientific ICAP 6000, Waltham, MA, EE. UU.). El término “pseudototal” se debe a que se usó el método de digestión pseudototal convencional (Lorentzen & Kingston, 1996), recomendado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA 3050B), el cual solo extrae y digiere los metales pesados retenidos en las fracciones más lábiles del suelo, como la materia orgánica o los carbonatos (Bravo et al., 2021).

La determinación de la concentración de Cd soluble en suelo, se realizó con curvas de calibración medidas con ICP-OES (Bravo et al., 2021). Se utilizó un material de referencia de cadmio puro (Merck-SRM solución estándar trazable de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ - 1000 mg kg^{-1} Cd Certipur. Referencia 1.19777.0500) para establecer las curvas de calibración estándar. Se prepararon curvas de calibración de bajo, medio y alto rango, con 10 puntos cada una, donde el límite de detección cuantitativa fue de $0,040 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd^{2+} , y se recuperó un 99.3% de Cd en las muestras de suelo.

Según los resultados de esta determinación, se puede afirmar que las plantas de todos los tratamientos, incluyendo las plantas bien regadas, crecieron en suelo con un contenido promedio de $0,356 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd soluble, valor considerado alto según Dutta et al. (2020).

2.2.2 Contenido de Cd en la planta

Para determinar el contenido de Cd en la planta, se separaron los órganos en hojas con peciolo, tallo y raíces de tres plantas por progenie ($n = 3$) en los días 19 y 27 de estrés. Posteriormente, las muestras se sometieron a un proceso de secado en un horno a 70°C durante una semana, hasta alcanzar un peso constante. El contenido de Cd en raíces, tallo y hojas, se obtuvo utilizando la técnica de espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Lanza et al., 2016). Los resultados del contenido de Cd en la planta se expresaron tanto en términos de concentración en mg Cd por kg del órgano.

Para determinar la acumulación de Cd por órgano de la planta, se multiplicó la concentración de Cd por la masa seca de cada órgano, expresado en mg de Cd por órgano. La acumulación Cd total en la planta se obtuvo sumando la acumulación de Cd en raíces, tallo y hojas.

2.2.3 Factor de translocación de Cd (FT)

El índice factor de translocación (FT) del Cd se determinó con la ecuación de Mattina et

a

l

.

$$FT = \frac{C_{\text{parte aérea}}}{C_{\text{raíces}}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

2

C = concentración de Cd en mg kg⁻¹ en la parte aérea (tallo + hojas) y las raíces de la planta.

El objetivo de determinar el índice FT fue evaluar la capacidad de las progenies evaluadas para retener Cd en las raíces o translocarlo hacia los órganos de parte aérea. Este aspecto es relevante ya que los programas de mejoramiento genético de cacao buscan portainjertos con baja absorción y acumulación de Cd (Savvas et al., 2010).

v

2.2.4 Análisis estadístico

r

El efecto del estado hídrico de la planta en la acumulación de cadmio en las hojas por parte de las progenies de cacao se evaluó mediante un ANOVA de dos vías (progenie x

R

E

F

tratamiento de estrés), permitiendo identificar diferencias significativas entre los tratamientos a través de la prueba HSD de Tukey. Además, se incluyó el contenido de cadmio en las hojas en el análisis de correlación de Pearson junto con los demás parámetros fisiológicos, con el objetivo de determinar la relación existente entre la acumulación de cadmio y dichas variables (Figura anexa 2).

2.3 Consideraciones éticas

2.3.1 Disposición de suelo con altos contenidos de cadmio

En el experimento se utilizaron 10,08 ton de suelo con contenidos de Cd elevado ($0,356 \text{ mg kg}^{-1}$) y se considera un sustrato contaminante, teniendo en cuenta que fue transportado de su lugar de origen (Sabana de Bogotá – AGROSAVIA Tibaitatá) al lugar del experimento (Espinal, Tolima – AGROSAVIA Nataima). Por lo tanto, el suelo se revirtió en el Centro de Investigación Tibaitatá, específicamente en el lote de donde se extrajo el mismo.

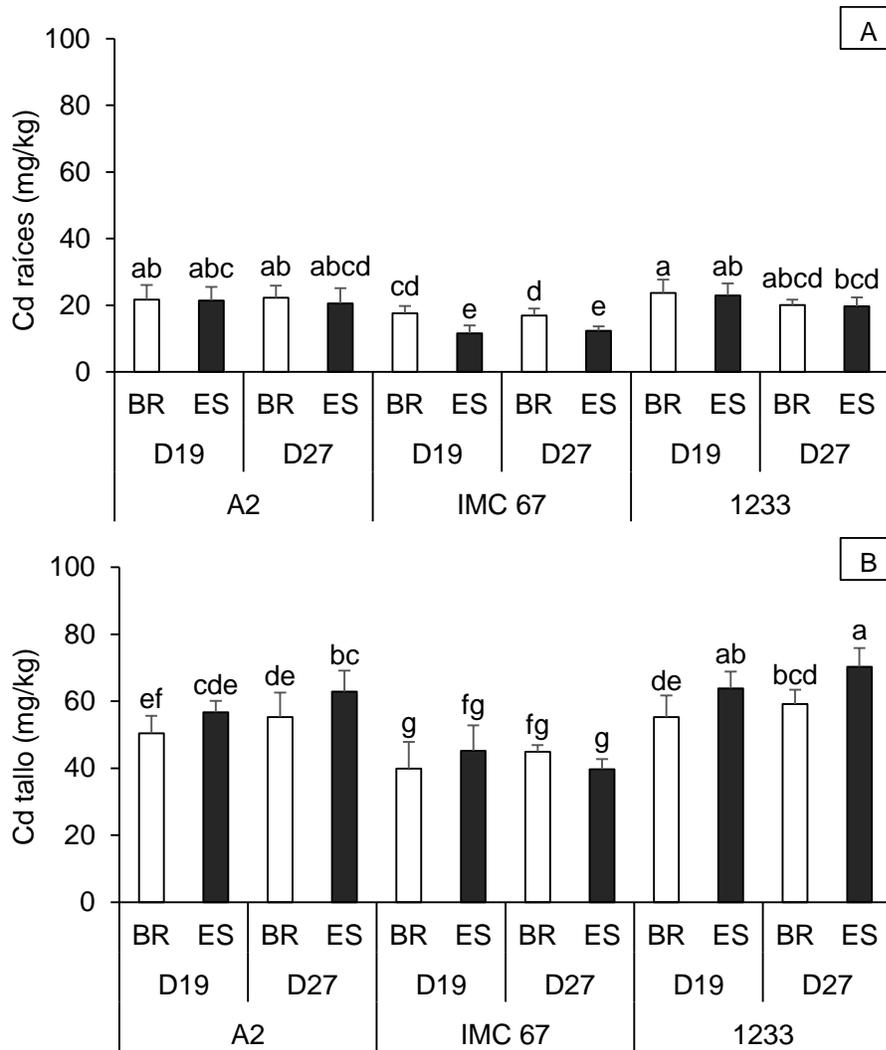
2.4 Resultados

2.4.1 Contenido de Cd en la planta

Se observó que las concentraciones más altas de Cd se encontraron en el tallo y las hojas de las plantas de cacao, mientras que la raíz presentó la menor concentración (Figura 9). En cuanto a las respuestas al estrés, las plantas de la progenie A2 mostraron un aumento significativo en la concentración de Cd en las hojas (30,80%) (Figura 9C) y el tallo (13,89%) (Figura 9B) cuando se sometieron a 19 (D19) y 27 (D27) días de estrés, respectivamente. Por otro lado, las plantas de la progenie IMC 67 mostraron una reducción del 34,09% y 26,91% en la concentración de Cd en las raíces durante los días 19 (D19) y 27 (D27) de déficit hídrico, respectivamente (Figura 9A).

En el caso de la progenie 1233, se observó un incremento significativo en la concentración de Cd solo en el tallo cuando se sometió a 19 (15,57%) y 27 (18,70%) días de estrés hídrico (Figura 9B). Estas diferencias en la acumulación de Cd en los diferentes órganos de las plantas de cacao de cada progenie tuvieron un impacto significativo en la concentración total de Cd en los tratamientos de estrés. Específicamente, se observó un aumento en la concentración total de Cd en la progenie A2 (D19 y D27) y en la progenie 1233 (D27),

mientras que en la progenie IMC 67 (D27) se observó una reducción en la concentración total de Cd (Figura 9D).



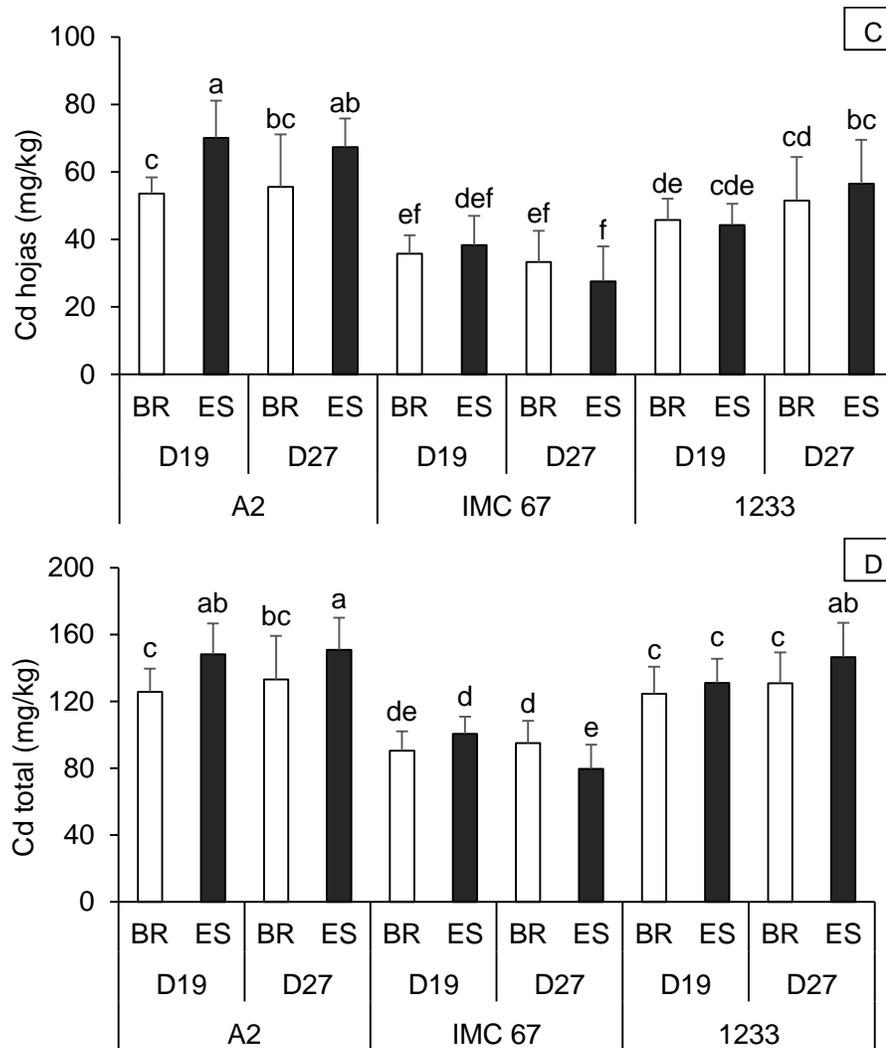
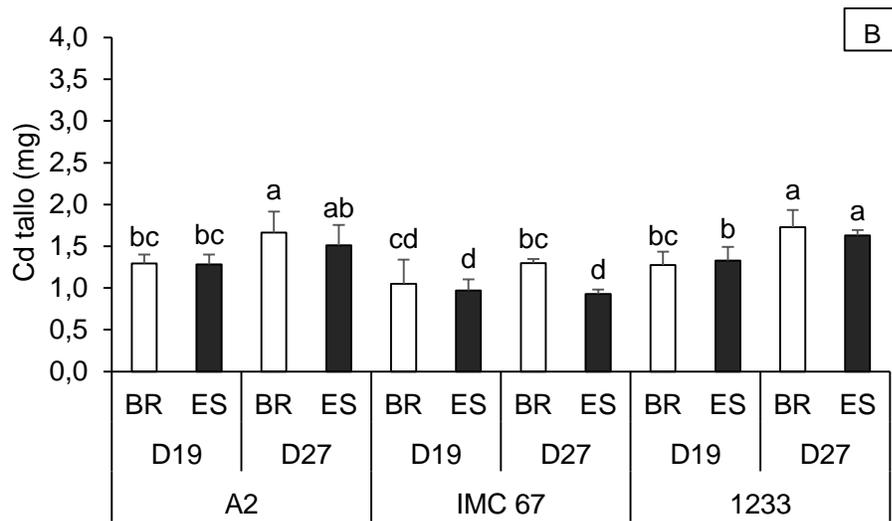
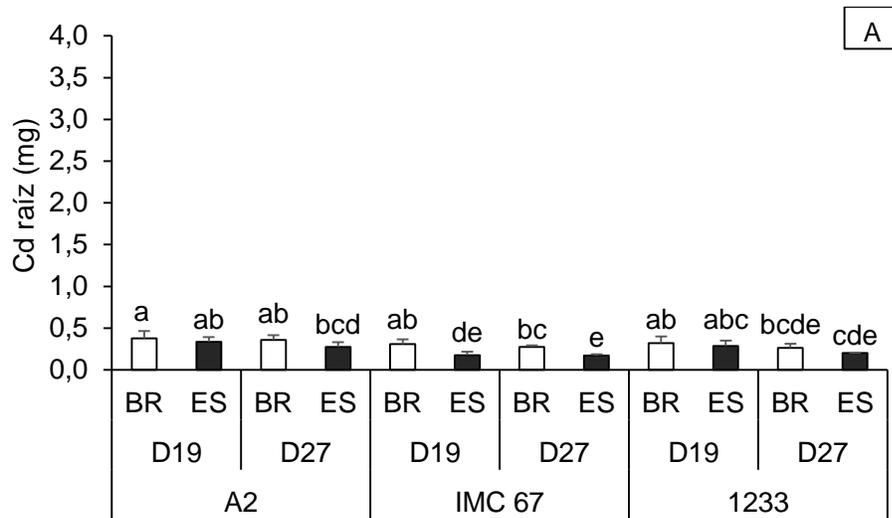


Figura 9. Concentración de Cd en (A) raíz, (B) tallo, (C) hojas y (D) total de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

Las hojas acumularon la mayor cantidad de Cd en la planta, seguido del tallo y las raíces. No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de Cd en las raíces entre los tratamientos de las progenies A2 y 1233. Sin embargo, en las plantas de la progenie IMC 67, se observó una reducción significativa en la acumulación de Cd en las raíces cuando se sometieron a déficit hídrico durante 19 (D19) y 27 (D27) días (Figura 10A). Además, se encontró una disminución del 30,77% en la acumulación de Cd en el tallo de las plantas de la progenie IMC 67 sometidas a estrés durante 27 días (D27) en

comparación con las plantas bien regadas (BR) (Figura 10B). No se observaron cambios en la acumulación de Cd en el tallo de los otros genotipos y niveles de estrés.

En cuanto a las hojas, no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de Cd entre los tratamientos tanto en el día 19 como en el día 27 de estrés. Sin embargo, se observó una tendencia a reducir la acumulación de Cd en las hojas de la progenie IMC 67 cuando se sometió a 27 días de estrés, con una reducción del 26,77% (Figura 10C). En general, la reducción en la acumulación de Cd en los tres órganos de las plantas de la progenie IMC 67 contribuyó a una disminución del 29,03% en la acumulación de Cd en toda la planta (Figura 10D). No se encontraron diferencias significativas en la acumulación total de Cd entre los tratamientos de estrés en el resto de las progenies.



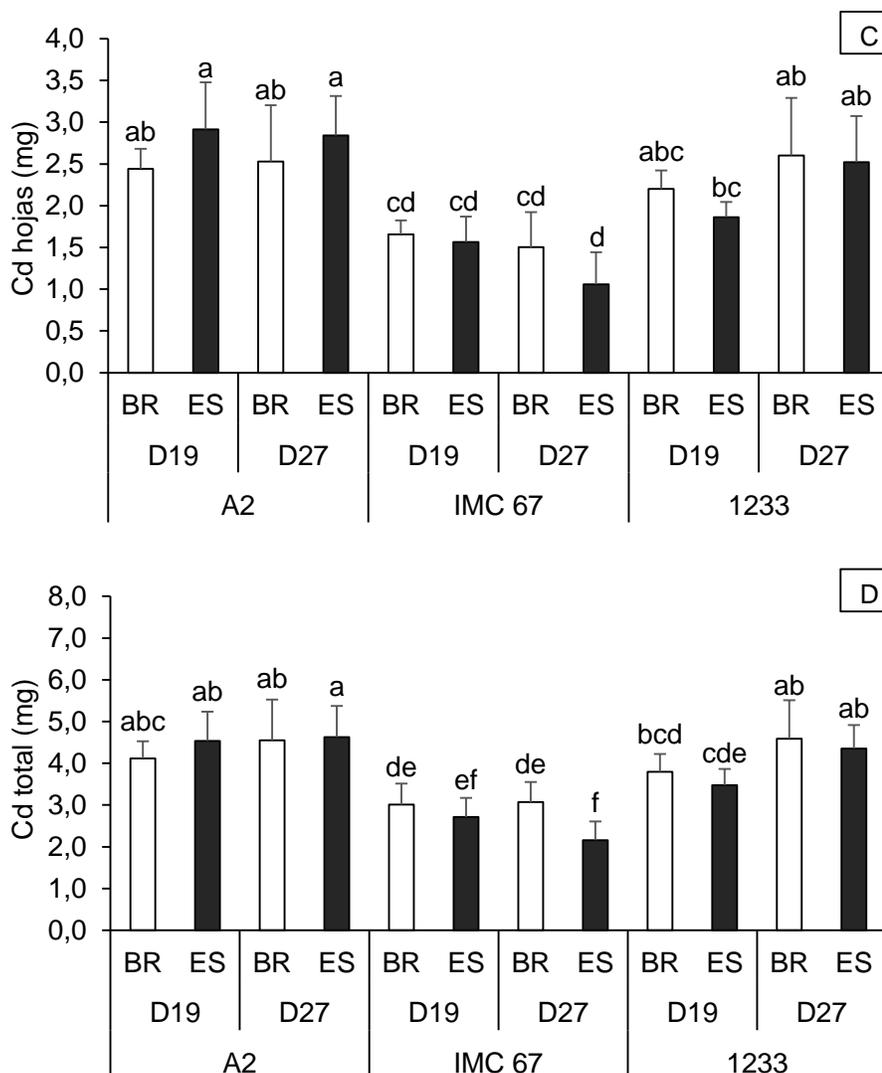


Figura 10. Acumulación de Cd en (A) raíz, (B) tallo, (C) hojas y (D) total de tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. BR, bien regado; ES, estrés por déficit hídrico; D19, estrés por déficit hídrico de 19 días; D27, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie x estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

2.4.2 Factor de translocación de Cd (FT)

El factor de translocación incrementó cuando las plantas de las progenies A2 e IMC 67 se sometieron a 27 (D27) y 19 (D19) días de estrés, respectivamente. Las plantas de la progenie 1233 no presentaron diferencias significativas en la acumulación de Cd entre plantas bien regadas (BR) y plantas estresadas (ES).

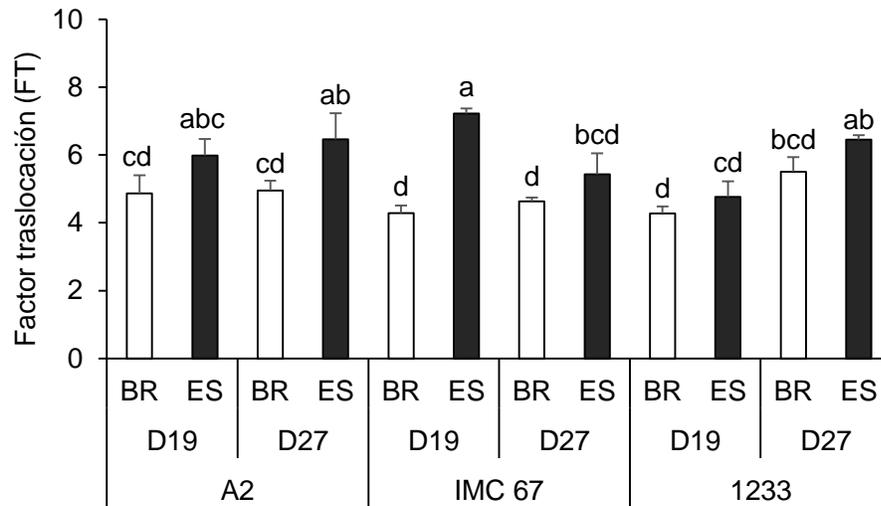


Figura 11. Factor de translocación (FT) del Cd tres progenies de cacao (A2, IMC 67 y 1233) de seis meses de edad sometidos 19 y 27 días de déficit hídrico. *BR*, bien regado; *ES*, estrés por déficit hídrico; *D19*, estrés por déficit hídrico de 19 días; *D27*, estrés por déficit hídrico de 27 días. Valores promedio ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0,05$) con ANOVA de dos vías (progenie \times estrés). Letras diferentes reflejan diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey.

2.5 Discusión

El cadmio (Cd) es un metal pesado presente en la solución del suelo, principalmente como ion Cd^{+2} o en forma de complejos orgánicos e inorgánicos (Gil et al., 2022; Kubier et al., 2019; Zulfiqar et al., 2022). Se considera un suelo contaminado por Cd cuando el contenido total supera los 3 mg kg^{-1} (Akbar et al., 2006; Irfan et al., 2013), o cuando la concentración de Cd biodisponible llega a ser mayor a $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ (Dutta et al., 2020). Según Bravo et al. (2021) la concentración máxima permisible de Cd soluble en los suelos para el cultivo de cacao es de $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$. En el caso del suelo donde se llevó a cabo el experimento, se determinó una concentración de Cd soluble de $0,356 \text{ mg kg}^{-1}$, lo cual indica que las plantas de cacao crecieron en un suelo con niveles contaminantes de Cd.

La absorción y acumulación de Cd en plantas de cacao está influenciada por diversos factores, entre ellos el pH del suelo, la disponibilidad de Cd en el suelo, el genotipo y la edad de la planta (Argüello et al., 2019; Oliveira et al., 2022; Wade et al., 2022). En este experimento, se tomaron medidas para minimizar la variación en el pH del suelo y la disponibilidad de Cd entre los tratamientos durante el periodo de establecimiento. Para esto, se regaron las plantas con la misma frecuencia y cantidad de agua y se aplicaron

fertilizantes en cantidades iguales y provenientes de las mismas fuentes, hasta que las plantas alcanzaron los 6 meses de edad. A partir de este momento, cuando se aplicaron los tratamientos de déficit hídrico a las plantas de cacao, es posible que se haya reducido la disponibilidad de Cd para su absorción por parte de las plantas debido a la disminución del agua disponible en el suelo (Gupta et al., 2020; Roupael et al., 2012). Por lo tanto, en este estudio se supone que hubo diferencias entre los tratamientos en dos de los factores más importantes que determinan la absorción de Cd en las plantas de cacao: el genotipo y la disponibilidad de Cd en el suelo (Oliveira et al., 2022).

Se observó que las plantas de la progenie A2 presentaron la mayor acumulación de Cd en la planta, con un promedio de 4,35 mg en las plantas bien regadas (BR), seguido por 1233, con un promedio de 4,20 mg e IMC 67 con 3,05 mg, mostrando diferencias significativas (Figura 9D). Los resultados concuerdan con lo reportado por Lewis et al. (2018), el cual catalogó a IMC 67 como un genotipo de baja acumulación de Cd. Los autores indican que la baja acumulación de Cd en genotipos como el IMC 67 se debe a múltiples puntos de regulación durante el viaje del Cd desde el suelo hasta las raíces, los brotes y las semillas (cotiledones y testa) de cacao, que posiblemente estén mediados por una serie de ligandos y proteínas de transporte (Lewis et al., 2018).

La influencia genética en la absorción y acumulación de Cd en la planta ha sido reportada en cultivos como el cacao (Arévalo-Gardini et al., 2017; He et al., 2015; Lewis et al., 2018), la soya y el arroz (Arao & Ishikawa, 2006). Estas diferencias en la acumulación de Cd entre genotipos se deben a diversos factores, como el vigor varietal, el tamaño y la morfología de la raíz, la actividad de los transportadores de absorción de iones metálicos en la superficie de la raíz, la capacidad de la raíz para producir exudados que se unen a los iones metálicos, y la interacción de la raíz con los microorganismos del suelo (Grant et al., 2008; Haider et al., 2021; Lewis et al., 2018). Este estudio no proporciona información detallada sobre los mecanismos de acumulación diferencial de Cd en las progenies evaluadas. Sin embargo, la respuesta diferencial de las progenies puede ser utilizada como herramienta para investigar los mecanismos de acumulación de cadmio en futuras investigaciones.

El contenido de Cd, en términos de concentración, tiende a aumentar en las plantas que experimentan condiciones de déficit hídrico, debido a la reducción en la acumulación de la biomasa (Liu et al., 2016; Xia et al., 2015). Aunque no se encontró una correlación

significativa entre la concentración de Cd y la biomasa acumulada en los diferentes órganos (Figura anexa 2A), se observó un incremento en la concentración total de Cd en las plantas del genotipo A2, lo cual podría explicarse por la disminución significativa de la masa seca de la planta en los días 19 y 27 de estrés hídrico (Figura 4D). De manera similar, el incremento en la concentración de Cd en las plantas de la progenie 1233 después de 27 días de estrés también podría ser resultado de la reducción de la biomasa acumulada en esas plantas bajo dicho nivel de estrés.

A pesar de la falta de correlación entre la concentración de Cd y la masa seca de las plantas de cacao, en la progenie A2 se observaron correlaciones significativas entre el potencial hídrico de la hoja (Ψ_{hoja}) y la concentración de Cd en las hojas ($r = -0,67$), tallos ($r = -0,61$) y concentración total ($r = -0,58$) (Figura anexa 2A). Además, se encontró una correlación significativa entre Ψ_{hoja} y la concentración de Cd en el tallo ($r = -0,74$) en la progenie 1233. Estas correlaciones indican que el estado hídrico de la planta influye en la acumulación de Cd en sus órganos, y esta relación no está determinada exclusivamente por una menor acumulación de biomasa en condiciones de déficit hídrico. Esto se confirma en el caso de la progenie IMC 67, donde a pesar de la reducción de la biomasa acumulada debido al tratamiento de estrés hídrico (Figura 4D), no se observa un incremento en la concentración de Cd en la planta (Figura 9D).

Existen diversos factores que pueden reducir en la absorción y acumulación de Cd en las plantas cuando se enfrentan a condiciones de déficit hídrico (Shi et al., 2015), dentro de los cuales se encuentran la morfología de la raíz y la reducción de la transpiración debido al cierre de las estomas (Liu et al., 2010; Rouphael et al., 2012; Su et al., 2013). Sin embargo, solo se observó este comportamiento en la progenie IMC 67, donde se encontró una reducción en la acumulación de Cd en los diferentes órganos de la planta (Figura 10).

Es importante destacar que se encontró una correlación positiva entre la transpiración (E) y la acumulación total de Cd ($r = 0,78$) en la progenie IMC 67 (Figura anexa 2B). Esto sugiere que la reducción significativa del 64,90% de la transpiración en la progenie IMC 67 entre los 19 y 27 días de estrés (Tabla 1), tuvo un impacto directo en la absorción y acumulación de Cd por parte de las plantas de cacao. Dicha reducción en la transpiración explica la disminución del 21,06% en la concentración de Cd en las raíces entre el día 19 y el día 27 de estrés (Figura 9A). Estos hallazgos están respaldados por estudios anteriores que señalan la influencia del genotipo y la duración del estrés en la acumulación de metales

pesados en las plantas (Abbas et al., 2018; Liu et al., 2016; Shi et al., 2015; Xia et al., 2015). En las demás progenies, no se evidenció un efecto significativo del déficit hídrico sobre la acumulación de Cd, posiblemente debido a que su transpiración fue menos sensible a la reducción del potencial hídrico de la hoja entre los 19 y 27 días de estrés hídrico (Tabla 1).

En investigaciones previas se ha demostrado que el estrés hídrico puede influir tanto en la absorción como en la translocación de Cd en plantas, como se ha observado en especies como la mostaza india (*Brassica juncea*) y el ricino (*Ricinus communis*) (Baudh & Singh, 2012). Adicionalmente, diversos autores aseguran que tanto la cantidad de Cd acumulado como la translocada varía según la especie y el genotipo (Arévalo-Gardini et al., 2017; Lewis et al., 2018; Song et al., 2017; Tran & Popova, 2013). En concordancia con lo anterior, en el presente estudio se observaron diferencias significativas entre los niveles de estrés y las progenies en la translocación de Cd en las plantas de cacao (Figura 11).

Teniendo en cuenta que el factor de translocación (FT) es un indicador de la capacidad de las progenies de cacao seleccionadas para transportar Cd desde las raíces hacia la parte aérea (De Almeida et al., 2022; Nirola et al., 2015), es posible afirmar que las progenies de cacao evaluadas, en particular IMC 67 y A2, mostraron una mayor translocación de Cd desde las raíces hacia la parte aérea cuando se sometieron a estrés (ES) durante 19 y 27 días, respectivamente, en comparación con las plantas bien regadas (BR) (Figura 11). Por su parte, la progenie 1233 no presentó cambios significativos en el factor de translocación en respuesta al déficit hídrico.

Es relevante destacar que, a pesar de que las plantas de la progenie IMC 67 acumularon la menor cantidad de Cd bajo condiciones de estrés hídrico moderado ($\Psi_{\text{hoja}} = -1,8$ MPa) (Figura 10D), fueron las que mostraron la mayor capacidad de translocar el Cd desde las raíces hacia la parte aérea (Figura 11) cuando las plantas se sometieron a 19 días de estrés (D19). Esto se debe a que las plantas de IMC 67, en este momento del estrés, mantuvieron la mayor transpiración, con un 12,94% más que las progenies A2 y 1233. Por otro parte, la progenie 1233, que tuvo una alta acumulación de Cd, no mostró un aumento en la translocación en condiciones de déficit hídrico. A pesar de que tanto A2 como 1233 presentaron correlación entre el factor de translocación y la transpiración (Figura anexa 2A, 2B), se observa que, para estas dos progenies, una reducción de la transpiración entre el 50 y 52,94% bajo condiciones de déficit hídrico (Tabla 1) no fue suficiente para aumentar

significativamente la translocación de Cd hacia la parte aérea (Figura 11). Estos resultados sugieren que tanto el genotipo, como el estado hídrico de la planta y su interacción, influyen en la capacidad de translocación del Cd.

Generalmente, se ha observado que el contenido de Cd es mayor en las raíces en comparación con la parte aérea de las plantas, debido a que las raíces actúan como una barrera eficaz para limitar la translocación de Cd en las plantas (De Almeida et al., 2022). Por ejemplo, un estudio realizado por Castro et al. (2015) en plantas de cacao de 2 meses de edad, sometidas previamente mediante imbibición de las semillas a diferentes soluciones de CdCl₂, encontró una mayor acumulación de Cd en las raíces en comparación con el tallo y las hojas. Sin embargo, la presencia de acumulación de Cd en la parte aérea de las plantas de cacao indica que el metal no fue completamente inmovilizado por las raíces. Adicionalmente, Pereira de Araújo et al. (2017) llevaron a cabo un estudio en plantas de cacao de 4 meses de edad expuestas a diferentes concentraciones de Cd en el suelo, y encontraron que el Cd fue absorbido y acumulado por igual en todos los órganos de la planta, por lo que se concluyó que las plantas translocaron Cd desde la raíz hacia la parte aérea (Pereira de Araújo et al., 2017).

En contraste, el estudio realizado por Fernández-Paz et al. (2021) en portainjertos de cacao de 8 meses de edad reveló concentraciones más altas de Cd en las hojas (85 mg kg⁻¹) en comparación con las raíces (40 mg kg⁻¹). Si bien la tolerancia a suelos contaminados por metales pesados generalmente se asocia con la retención del metal en las células de la raíz para evitar su translocación hacia las partes aéreas de la planta (De Almeida et al., 2022; Song et al., 2017), existen plantas hiperacumuladoras que transportan la mayor parte del metal pesado hacia la parte aérea a través del xilema (Salt et al., 1995). Aunque pueda parecer que este sea el caso en el cacao, la mayor acumulación de Cd en las hojas en lugar de las raíces está influenciada por el genotipo y la edad de las plantas (Wade et al., 2022). Estos factores demuestran la complejidad de la acumulación de Cd en el cacao y resaltan la importancia de considerar múltiples variables en la interpretación de los patrones de distribución del Cd en diferentes tejidos de la planta.

Las concentraciones de Cd encontradas en las hojas de las progenies evaluadas se sitúan por debajo de los niveles reportados en plantas de cacao menores de un año de edad. Según el estudio de Fernández-Paz et al. (2021), se observaron valores foliares de Cd entre 80 y 100 mg kg⁻¹, De Almeida et al. (2022) registraron un promedio de 200 mg kg⁻¹,

y Pereira de Araújo et al. (2017) detectaron concentraciones de 388,970 mg kg⁻¹. Estas diferencias se atribuyen al genotipo, a las concentraciones iniciales de Cd presentes en el suelo y al uso de fuentes de Cd altamente solubles, como Cd(NO₃)₂ y CdCl₂, en los estudios mencionados. Es importante destacar que en este experimento no se añadió ninguna fuente externa de Cd al suelo donde crecieron las plantas, lo cual puede influir en la disponibilidad del Cd para ser absorbido por las plantas (Zulfiqar et al., 2022).

En el caso de las plantas de cacao mayores a diez años de edad que crecen en suelos contaminados con Cd y sin adición de fuentes solubles externas, como en este estudio, se observa que las acumulaciones de Cd en las hojas son considerablemente inferiores a las concentraciones reportadas en plantas jóvenes. En estudios previos, se registraron valores máximos de 5,42 mg kg⁻¹ en hojas (Arévalo-Gardini et al., 2017; Barraza et al., 2017; C. Lewis et al., 2018). En cacao y diversas especies se ha demostrado que la edad de la planta desempeña un papel importante en la absorción y acumulación de Cd (Argüello et al., 2019; Haider et al., 2021). Los resultados de (Argüello et al., 2019) indicaron que las plantas jóvenes de cacao absorben más cadmio que las más viejas. Esto se ha asociado a una mayor profundidad de las raíces, donde hay menor cantidad de Cd biodisponible, a una mayor cantidad de calcio (Ca) en plantaciones antiguas, lo que podría bloquear la absorción de Cd (Argüello et al., 2019), a un mayor crecimiento de las plantas jóvenes y una mayor biomasa en árboles viejos, lo cual reduce la concentración de Cd en los tejidos de las plantas (Lettens et al., 2011).

Por otra parte, las plantas jóvenes presentan sistemas de raíces menos desarrollados y menos lignificados en comparación con las plantas de mayor edad. Como resultado, las barreras de la endodermis, como las bandas de Caspary, no están completamente suberizadas en las plantas jóvenes (Pasricha et al., 2021). Según Song et al. (2019), en *Cunninghamia lanceolata*, las bandas de Caspary desempeñan su función de barrera en la etapa secundaria del desarrollo de la endodermis, después de que la lignina y la suberina se depositan en la pared celular. Por lo tanto, es posible que en plantas jóvenes haya una menor capacidad para discriminar el Cd en las raíces antes de que ingrese al xilema y se transporte hacia las hojas (Pasricha et al., 2021).

La determinación de la translocación en plantas jóvenes de cacao con potencial como portainjertos demuestra la capacidad de las progenies evaluadas para acumular Cd en las raíces y/o transportarlo hacia la parte aérea. Considerando esto, el uso de portainjertos

con baja acumulación de Cd podría ser prometedor para reducir la absorción de este metal en el cacao (Savvas et al., 2010). Según Mingorance et al., (2007), un factor de translocación (FT) mayor a 1 indica que órganos de la planta de cacao están enriquecidos con Cd. Por otro lado, un FT cercano a 1 sugiere un comportamiento relativamente neutral de la planta con relación a la translocación de Cd hacia la parte aérea, mientras que un FT menor a 1 indica que la planta puede absorber pequeñas cantidades del elemento, pero no lo transloca hacia las hojas. En el caso de las progenies evaluadas en nuestro estudio, se observó un FT superior a 4, lo cual indica que los órganos aéreos de estas plantas jóvenes de cacao estaban significativamente enriquecidos con Cd.

La translocación de Cd en las plantas está relacionada con la retención del metal en las raíces y la actividad de carga en el xilema (Clemens et al., 2013; Verbruggen et al., 2009). Basándonos en los valores de factor de translocación (FT) observados en las progenies del presente estudio, se puede inferir que no existe una restricción eficiente en el movimiento del Cd hacia el cilindro vascular, lo que sugiere que las raíces podrían no estar completamente suberizadas debido a la falta de maduración de la endodermis (Lux et al., 2011).

En raíces jóvenes o en áreas apicales de las raíces donde las barreras apoplásticas, como bandas de Caspary, no están completamente desarrolladas, es posible que una cantidad considerable de Cd absorbido, sea transferido directamente del xilema al floema en las partes leñosas de la planta, como en el tallo (Redjala et al., 2009). Un estudio realizado por Engbersen et al. (2019) en diferentes genotipos de cacao, encontró que una cantidad sustancial del Cd de que ingresa a la raíz, puede ser transportada de los tallos y ramas hasta la semilla del cacao, sin paso previo por las hojas. Esto demuestra que el tallo puede ser un órgano donde la planta de cacao acumule este metal. Los resultados encontrados por Moore et al. (2020) sugieren que el Cd en el tallo puede estar secuestrado mediante vías bioquímicas similares a las que ocurren en las raíces.

Una vez que el Cd alcanza el cilindro vascular, este metal puede volver a ingresar al apoplasto del tallo antes de ser cargado en los vasos del xilema (Hu et al., 2009). Estudios han detectado la presencia de Cd en las paredes de los vasos del xilema en diferentes especies (Akhter et al., 2014), lo cual podría explicar la alta acumulación de Cd en el tallo de las plantas pertenecientes a las progenies A2 y 1233. Una vez en el xilema, este Cd puede unirse a ligandos como fitoquelatinas y ácidos carboxílicos en la vacuola y las

paredes celulares (Mori et al., 2009; Song et al., 2017), y su capacidad de carga depende de la actividad de los transportadores (Song et al., 2017).

Además, investigaciones en otras especies, como el arce rojo, han demostrado que el estrés combinado de sequía y metales pesados puede reducir la densidad de los vasos del xilema, lo que resulta en un aumento de las células del parénquima en el xilema (De Silva et al., 2012). Este aumento del parénquima bajo condiciones de estrés combinado puede explicar el almacenamiento de Cd translocado desde la raíz hacia el tallo en las progenies A2 y 1233. En la progenie A2 esto tiene mucho sentido, ya que durante el estrés moderado (D19), el Cd se concentró principalmente en las hojas, mientras que en el estrés severo (D27) el Cd se concentró en el tallo (Figura 10), posiblemente debido a una reducción de la densidad de los vasos y un aumento de las células del parénquima xilemático (De Silva et al., 2012).

Estos hallazgos destacan la complejidad de los procesos de absorción y translocación de Cd en las plantas y la influencia de factores genéticos y ambientales como el déficit hídrico en estos mecanismos.

2.6 Conclusiones

La absorción y acumulación de Cd en las plantas de cacao estuvo fuertemente influenciada por el genotipo. Se observó una diferencia significativa entre las progenies A2 y 1233 en comparación con el genotipo comercial IMC 67, y se corroboró que IMC 67 es un genotipo con una baja acumulación de Cd. Además, se observó que las plantas jóvenes de cacao tienden a acumular una mayor cantidad de Cd en la parte aérea que en la raíz, posiblemente debido a un sistema de raíces menos desarrollado, lo que resulta en una menor retención de Cd en la raíz a través de las barreras apoplásticas.

El aumento en la concentración de Cd bajo condiciones de déficit hídrico se explica por la reducción de la biomasa acumulada durante el estrés en las progenies A2 y 1233. Sin embargo, esta lógica no se aplicó a la progenie IMC 67, donde la transpiración de las plantas determinó la acumulación de Cd en los órganos de la planta.

El índice de factor de translocación (FT) reveló que un mayor contenido de Cd en la planta no siempre se traduce en una mayor translocación de Cd desde la raíz hasta la parte aérea. Por un lado, se encontró que la progenie A2 aumenta la translocación de Cd desde la raíz

hasta la parte aérea en respuesta al déficit hídrico. Por otro lado, la progenie IMC 67, a pesar de acumular una menor cantidad de Cd en la planta, presenta una mayor translocación de Cd bajo condiciones de estrés moderado. Y, por último, el estrés hídrico no afecta la translocación de Cd desde la raíz hasta la parte aérea en las plantas de la progenie 1233.

En resumen, el déficit hídrico no afectó la cantidad de Cd acumulado en las plantas de cacao, pero sí influyó la concentración y distribución de Cd en ellas. La progenie 1233 se destaca como el portainjerto más prometedor debido a su capacidad de tolerancia al estrés hídrico y su estabilidad en la acumulación de Cd bajo esta condición. Aunque esta progenie mostró la segunda mayor acumulación de Cd en las hojas, lo cual es común en plantas de esa edad, también presentó una de las mayores acumulaciones de Cd en las raíces y limitó la translocación de Cd desde las raíces hacia los órganos aéreos bajo condiciones de déficit hídrico, una característica valiosa en portainjertos en los programas de mejora genética en cacao.

Estos hallazgos son de gran relevancia para comprender el efecto del déficit hídrico en la acumulación de Cd en progenies de cacao consideradas como portainjertos potenciales dentro de un programa de mejoramiento genético del cacao. Estos resultados resaltan la importancia del experimento y su contribución al conocimiento sobre la respuesta de las *Theobroma cacao* al estrés hídrico y la acumulación de Cd.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

- El déficit hídrico tiene efectos negativos en la fisiología de las plantas jóvenes de cacao, incluyendo la disminución del potencial hídrico de la hoja y la tasa fotosintética, alteraciones en el crecimiento y la acumulación de biomasa, y un incremento del estrés oxidativo.
- El estrés por Cd podría mitigar los efectos del déficit hídrico en materiales con cierto grado de susceptibilidad a esta condición. Sin embargo, se necesita una investigación más profunda sobre este tema específico en cacao.
- El déficit hídrico puede aumentar la concentración de Cd en las plantas de cacao debido a la reducción de la acumulación de biomasa bajo estrés. No obstante, la absorción y acumulación de Cd en la planta pueden verse afectadas por la transpiración limitada, dependiendo del genotipo y el nivel de estrés.
- La acumulación de Cd está mayormente determinada por el genotipo, y se observó que IMC 67 es un genotipo con baja acumulación de este metal, lo cual es destacable. Sin embargo, la translocación observada bajo un déficit hídrico moderado plantea preguntas sobre su idoneidad como patrón en zonas con altos contenidos de Cd en el suelo y sometidas a sequía.
- La progenie 1233 sobresale como un prometedor portainjerto debido a su capacidad para tolerar el estrés hídrico y mantener una acumulación estable de Cd. No obstante, es necesario llevar a cabo una evaluación adicional sobre la acumulación y translocación de Cd desde el patrón hasta la copa del injerto bajo condiciones de déficit hídrico, así como considerar otros factores, como la edad de la planta.

- Este estudio revela importantes consideraciones para la selección adecuada de portainjertos en zonas con condiciones de sequía y alta concentración de Cd en el suelo. Es necesario profundizar en la comprensión de la interacción entre el estrés hídrico y la acumulación de Cd en cacao, lo que podría abrir nuevas oportunidades para mejorar la adaptación y rendimiento de este cultivo bajo condiciones desafiantes.

3.2 Recomendaciones

- Investigar el efecto del déficit hídrico en la acumulación de Cd, incluyendo un tratamiento control de Cd en suelos no contaminados. Esto permitirá asociar la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas de cacao a diferentes condiciones ambientales. Los resultados podrían aportar una comprensión más completa de cómo el estrés hídrico y la presencia de Cd interactúan y afectan la fisiología de las plantas de cacao.
- Incluir la determinación de enzimas antioxidantes en las evaluaciones para estudiar la interacción entre el déficit hídrico y la acumulación de Cd. Al incorporar la respuesta antioxidante, se obtendrá una visión más completa sobre cómo estas plantas se adaptan y protegen contra el estrés causado por el Cd y la escasez de agua.
- Se recomienda investigar en detalle las variables relacionadas con la precipitación del Cd en las raíces de las plantas de cacao, como el contenido de fitoquelatinas, metalotioneínas y ácidos carboxílicos, para comprender mejor su influencia en la translocación del Cd hacia la parte aérea y la estabilidad de la acumulación de Cd en la progenie 1233 bajo condiciones de déficit hídrico.
- Se sugiere evaluar la interacción del estrés hídrico y la acumulación de Cd en injertos utilizando las progenies IMC 67 y 1233 como portainjertos de interés. Esto permitirá analizar cómo diferentes combinaciones de portainjertos y copas responden a situaciones de estrés hídrico y cómo afecta la acumulación de Cd en las plantas. Los resultados de esta investigación serán fundamentales para identificar combinaciones de portainjertos y copas más resistentes y adaptadas a condiciones de escasez de agua y contaminación por Cd, lo cual será de gran valor para mejorar y seleccionar cultivos de cacao en futuros programas agrícolas.

A. Figuras anexas

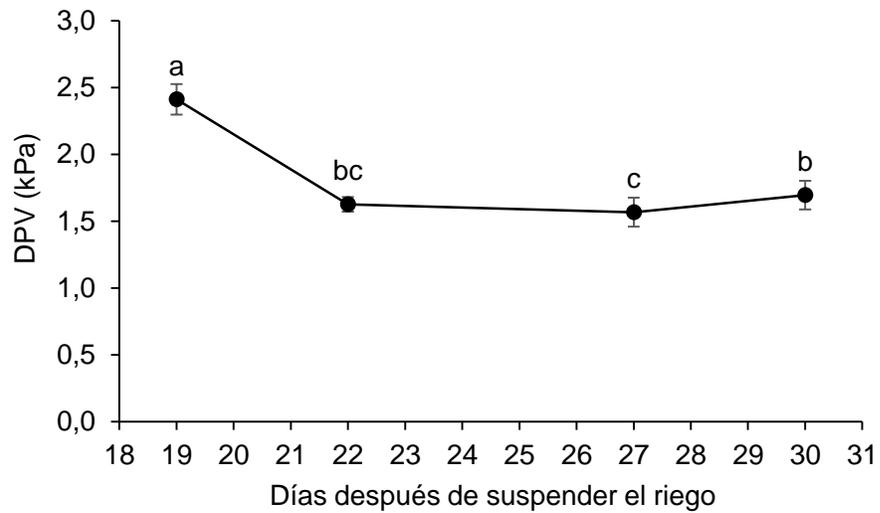
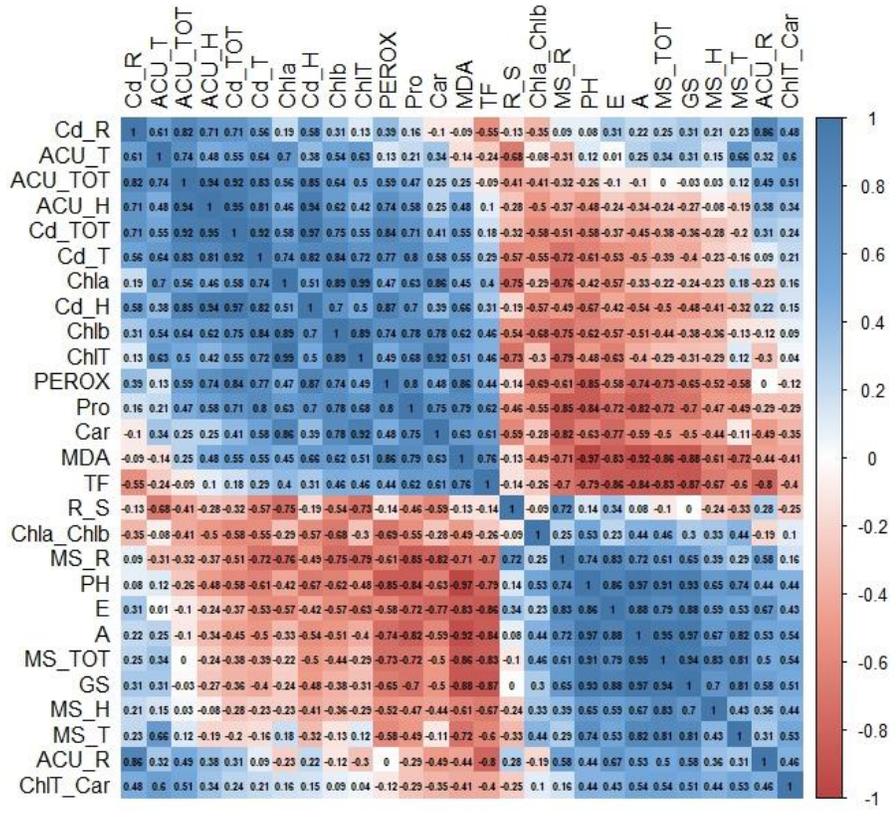
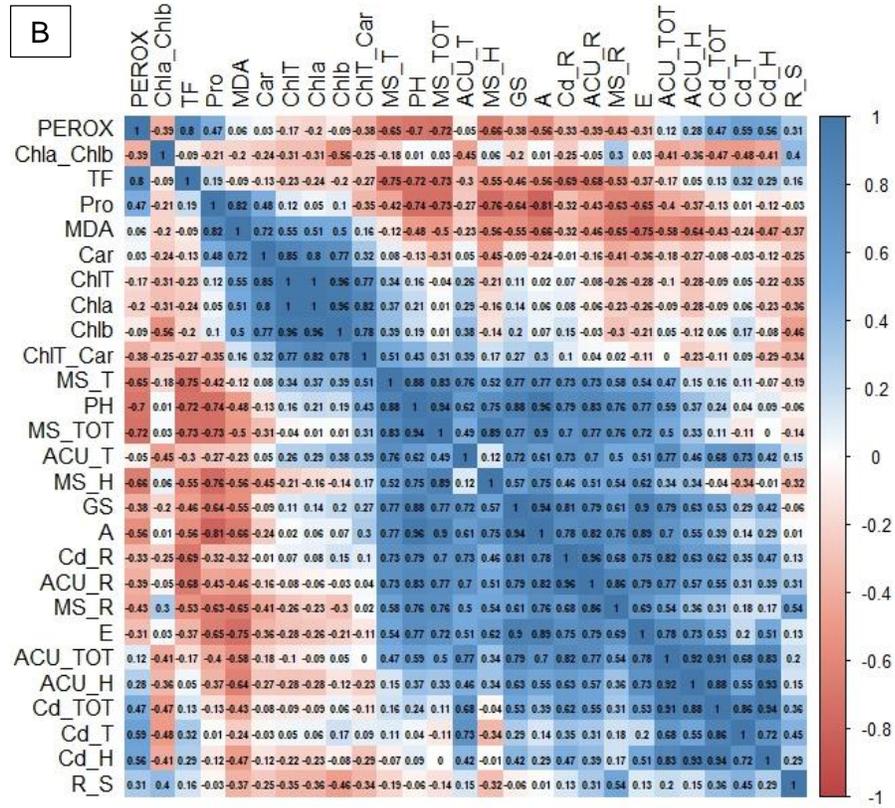


Figura anexa 1. Déficit de presión de vapor (DPV) durante el experimento. *Valores promedio (n=12). Letras diferentes reflejan diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo con la prueba HSD de Tukey*

A





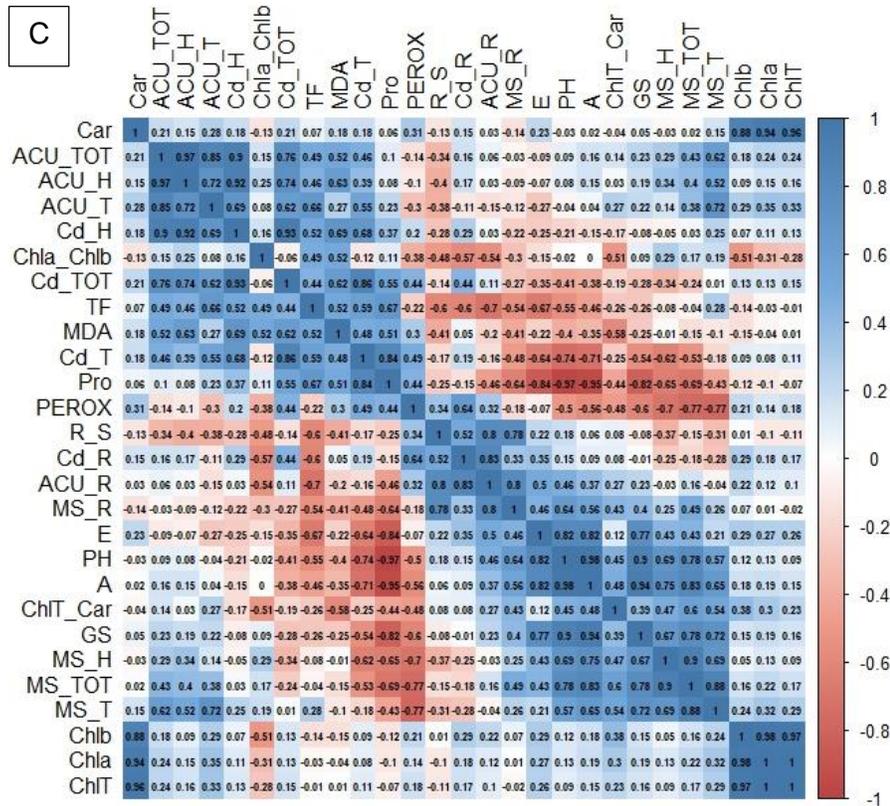


Figura anexa 2. Correlaciones de Pearson entre las variables fisiológicas y bioquímicas, determinadas en plantas jóvenes de cacao pertenecientes tres progenies: (A) A2, (B) IMC 67 y (C) 1233, sometidas a déficit hídrico y Cd en el suelo. *PH*, potencial hídrico de la hoja Ψ_{hoja} ; *Cd_R*, concentración de Cd en raíces; *Cd_T*, concentración de Cd en tallo; *Cd_H*, concentración de Cd en hojas; *Cd_TOT*, concentración de Cd total; *ACU_R*, acumulación de Cd en raíces; *ACU_T*, acumulación de Cd en tallo; *ACU_H*, acumulación de Cd en hojas; *ACU_TOT*, acumulación de Cd total; *MS_H*, masa seca de las hojas; *MS_T*, masa seca del tallo; *MS_R*, masa seca de la raíz; *MS_TOT*, masa seca total; *R_S*, relación raíz / parte aérea; *A*, tasa fotosintética; *GS*, conductancia estomática; *E*, transpiración; *Ci*, carbono interno, *Chla*, clorofila a; *Chlb*, clorofila b; *ChIT*, clorofila total; *Car*, carotenoides; *Chla_Chlb*, relación clorofila a/b; *ChIT_Car*, relación de clorofilas totales / carotenoides; *MDA*, malondialdehído, *PEROX*, peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

B. Información anexa

Información anexa 1. Análisis de suelo para determinar el contenido de cadmio (Cd) en el suelo del experimento.



INFORME DE RESULTADOS

ÁREA DE ANÁLISIS DE SUELOS



Informe N°	28016-V1-2021		N° de Laboratorio	ASU-07346-2021		
Información del Cliente						
Remitente	LA CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA - AGROSAVIA		Responsable	SRA. ANGELA MARIA CASTAÑO		
Propietario	LA CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA - AGROSAVIA		email contacto	amcastano@agrosavia.co		
Fecha Ingreso	10-08-2021		Fecha Emisión	27-08-2021		
Información de la Muestra enviada por el cliente						
Cultivo / Variedad	CACAO - NO ESPECIFICADO		Lote / Bloque	39 - PUNTO: 7 EDAD: POR ESTABLECER		
Municipio/Departamento/Finca	MOSQUERA - CUNDINAMARCA	TIBAITATA	N° Contrato	N.A.		
Información adicional	NINGUNA		Condiciones recepción	CONFORME		
ANÁLISIS CONVENCIONAL SUELO MÁS ADICIONALES						
Descripción Física de la Muestra		SÓLIDO NEGRO CON PRESENCIA DE MATERIAL VEGETAL				
Variable	Expresión / Sigla	Resultados	Unidades	Rango Medio		Extractante/Técnica/Referencia
pH	pH	5.46	pH_unit	5.50	6.50	Pasta de saturación / Conductimétrico / USDA, Salinity Laboratory
Carbono Orgánico Oxidable	COOx	6.72	%	2.00	4.00	Sin. Dicromato de Potasio / Colorimétrico / NTC 5403 Walkley-Black
Materia Orgánica	MO	11.6	%	N.R.	N.R.	Cálculo
METALES PESADOS						
Variable	Expresión	Resultado	Unidades	Extractante / Técnica / Referencia		
Cadmio Soluble	Cd	3.56	ug/kg	Pasta de Saturación USDA, ICP-OES / EPA 200.9		
Cadmio Soluble DTPA	Cd	2130	ug/kg	Sin. DTPA/ICP-OES/NTC5526- EPA 200.9		
Observaciones a los resultados:			Convenciones:			
NINGUNO			N.R. No registra / N.A. No Aplica / Sin. Solución / N.S. No Suministrada / N.D. No Detectado / M/H Mineralización Via Humeda / EAM: Extracción Asistida por Microondas / M.I. Muestra Insuficiente EAA Espectroscopía de Absorción Atómica / EAA Espectroscopía de Emisión Atómica / ICP-OES Espectroscopía de Emisión Óptica de plasma acoplado inductivamente			

---- Fin del Reporte de Resultados Analíticos ----

Autorizado por:

Teresa Cocho
Subgerencia Técnica - Química - PQ 2155

Revisado por:

Adriana Navarro
Coordinador de Área-Lic. en Química-

---- Fin del Informe ----

Información anexa 2. Análisis de suelo para determinar características fisicoquímicas del suelo del experimento.



INFORME DE RESULTADOS

ÁREA DE ANÁLISIS DE SUELOS



Informe N°	40135-V1-2021		N° de Laboratorio	ASU-11971-2021		
Información del Cliente						
Remitente	LA CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA - AGROSAVIA		Responsable	SR. ISIDRO BELTRAN		
Propietario	AGROSAVIA C.I.		email contacto	jibeltran@agrosavia.co; avargas@agrosavia.co		
Fecha Ingreso	11-11-2021		Fecha Emisión	03-12-2021		
Información de la Muestra enviada por el cliente						
Cultivo / Variedad	MAIZ - HIBRIDO		Lote / Bloque	AB(2) - CASA DE MALLAS		
Municipio/Departamento/Finca	ESPINAL - TOLIMA	C.I. NATAIMA	N° Contrato	N.A.		
Información adicional	EXPERIMENTAL 2021		Condiciones recepción	CONFORME		
ANÁLISIS CONVENCIONAL DE SUELO CAMPO*						
Descripción Física de la Muestra		SÓLIDO GRIS OSCURO				
Variable	Expresión / Sigla	Resultados	Unidades	Rango Medio		Extractante/Técnica/Referencia
pH	pH	5.27	pH_unit	5.60	6.80	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Conductividad Eléctrica	CE	0.61	dS/m	N.R.	N.R.	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Capacidad de Intercambio Catiónica Efectiva	CICE	17.0	meq/100g	N.R.	N.R.	Cálculo
Saturación de Humedad Medía	N.A.	34.5	%	20.0	40.0	Pasta de saturación / Gravimétrico / USDA Salinity Laboratory
Carbono Orgánico Oxidable	COOx	5.40	%	2.00	4.00	Sol. Dicromato de Potasio / Colorimétrica / NTC 5463 Walkley-Black
Materia Orgánica	MO	9.31	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Nitrógeno Total	N Total	0.450	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Densidad Aparente	d.a.	0.920	g/cm3	N.R.	N.R.	Cálculo
Determinación de Textura						
Arcilla	Tex.	18.0	%	%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Arena	Tex.	32.0	%	%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Limo	Tex.	50.0	%	%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Textura	Tex.	Franco		Adimensional		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Potasio Intercambiable	K	340	0.870	N.R.	N.R.	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Calcio Intercambiable	Ca	2590	12.9	3.00	6.00	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Magnesio Intercambiable	Mg	313	2.58	1.50	3.00	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Sodio Intercambiable	Na	96.4	0.419	0.04	0.48	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Acidez Intercambiable	Ac. Inter.	17.3	0.192	0.20	0.40	Sol. KCl 1N / Volumétrica / NTC 5263
Hierro	Fe	244	N.A.	20	100	Sol. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno

Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Manganeso	Mn	27.9	N.A.	10.0	50.0	Sls. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Cobre	Cu	1.87	N.A.	1.25	2.50	Sls. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Zinc	Zn	51.9	N.A.	2.00	5.00	Sls. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Boro	B	0.637	N.A.	0.50	1.00	Sls. Fosfato Monobásico de Calcio / Colorimétrico / Método Interno
Fósforo	P	56.7	N.A.	15.0	30.0	Sls. Bray II / Colorimétrico / NTC 5350
Azufre	S	84.2	N.A.	30.0	60.0	Sls. Fosfato Monobásico de Calcio / Turbidimétrico / Método Interno
RELACIONES MATEMÁTICAS						
Variable	Expresión	Resultado	Unidades		Extractante / Técnica / Referencia	
Saturación de Magnesio	Sat. Mg	15.2	%		Cálculo	
Saturación de Sodio	Sat. Na	2.46	%		Cálculo	
Saturación de Aluminio	Sat. Al	1.13	%		Cálculo	
Saturación de Potasio	Sat. K	5.12	%		Cálculo	
Saturación de Calcio	Sat. Ca	75.9	%		Cálculo	
Relación Calcio/Magnesio	Ca/Mg	5.00	Adimensional		Relación matemática	
Relación Calcio/Potasio	Ca/K	14.8	Adimensional		Relación matemática	
Relación Magnesio/Potasio	Mg/K	2.97	Adimensional		Relación matemática	
Relación (Ca+Mg)/K	(Ca+Mg)/K	17.8	Adimensional		Relación matemática	
Observaciones a los resultados:		Convenciones:				
NINGUNO		N.R. No registra / N.A. No Aplica / Sln. Solución / N.S. No Suministrada / N.D. No Detectado MVH Mineralización Vía Húmeda / M.I. Muestra Insuficiente EAA Espectroscopía de Absorción Atómica / EAA Espectroscopía de Emisión Atómica ICP-OES Espectroscopía de Emisión Óptica de plasma acoplado inductivamente				

---- Fin del Reporte de Resultados Analíticos ----

Autorizado por:



Teresa Coco
Subgerente Técnica - Química - PQ 2155

Revisado por:



Adriana Navarro
Coordinador de Área-Lic. en Química-



INFORME DE RESULTADOS

ÁREA DE ANÁLISIS DE SUELOS

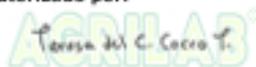


Informe N°	40133-V1-2021		N° de Laboratorio	ASU-11972-2021		
Información del Cliente						
Remitente	LA CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA - AGROSAVIA		Responsable	SR. ISIDRO BELTRAN		
Propietario	AGROSAVIA C.I.		email contacto	jibeltran@agrosavia.co; avargas@agrosavia.co		
Fecha Ingreso	11-11-2021		Fecha Emisión	03-12-2021		
Información de la Muestra enviada por el cliente						
Cultivo / Variedad	MAIZ - HIBRIDO		Lote / Bloque	AB(3) - CASA DE MALLAS		
Municipio/Departamento/Finca	ESPINAL - TOLIMA	C.I. NATAIMA	N° Contrato	N.A.		
Información adicional	EXPERIMENTAL 2021		Condiciones recepción	CONFORME		
ANÁLISIS CONVENCIONAL DE SUELO CAMPO*						
Descripción Física de la Muestra		SÓLIDO GRIS OSCURO				
Variable	Expresión / Sigla	Resultados	Unidades	Rango Medio		Extractante/Técnica/Referencia
pH	pH	5.25	pH_unit	5.60	6.80	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Conductividad Eléctrica	CE	0.55	dS/m	N.R.	N.R.	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Capacidad de Intercambio Catiónica Efectiva	CICE	17.5	meq/100g	N.R.	N.R.	Cálculo
Saturación de Humedad Media	N.A.	30.3	%	20.0	40.0	Pasta de saturación / Gravimétrico / USDA Salinity Laboratory
Carbono Orgánico Oxidable	COOx	4.85	%	2.00	4.00	Sit. Dicromato de Potasio / Colorimétrico / NTC 5463 Walkley-Black
Materia Orgánica	MO	8.36	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Nitrógeno Total	N Total	0.404	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Densidad Aparente	d.a.	0.937	g/cm3	N.R.	N.R.	Cálculo
Determinación de Textura						
Arcilla	Tex.	10.0		%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Arena	Tex.	42.0		%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Limo	Tex.	48.0		%		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Textura	Tex.	Franco		Adimensional		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Potasio Intercambiable	K	338	0.863	N.R.	N.R.	Sit. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Calcio Intercambiable	Ca	2700	13.5	3.00	6.00	Sit. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Magnesio Intercambiable	Mg	321	2.64	1.50	3.00	Sit. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Sodio Intercambiable	Na	79.1	0.344	0.04	0.48	Sit. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Acidez Intercambiable	Ac. Inter.	16.4	0.182	0.20	0.40	Sit. KCl 1N / Volumétrica / NTC 5263
Hierro	Fe	232	N.A.	20	100	Sit. Ácido Mehlich 1 / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno

Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Manganeso	Mn	31.3	N.A.	10.0	50.0	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Cobre	Cu	1.92	N.A.	1.25	2.50	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Zinc	Zn	54.9	N.A.	2.00	5.00	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Boro	B	0.536	N.A.	0.50	1.00	Sis. Fosfato Monobásico de Calcio / Colorimétrico / Método Interno
Fósforo	P	52.6	N.A.	15.0	30.0	Sis. Bray II / Colorimétrico / NTC 5350
Azufre	S	72.3	N.A.	30.0	60.0	Sis. Fosfato Monobásico de Calcio / Turbidimétrico / Método Interno
RELACIONES MATEMÁTICAS						
Variable	Expresión	Resultado	Unidades		Extractante / Técnica / Referencia	
Saturación de Magnesio	Sat. Mg	15.1	%		Cálculo	
Saturación de Sodio	Sat. Na	1.97	%		Cálculo	
Saturación de Aluminio	Sat. Al	1.04	%		Cálculo	
Saturación de Potasio	Sat. K	4.93	%		Cálculo	
Saturación de Calcio	Sat. Ca	77.1	%		Cálculo	
Relación Calcio/Magnesio	Ca/Mg	5.11	Adimensional		Relación matemática	
Relación Calcio/Potasio	Ca/K	15.6	Adimensional		Relación matemática	
Relación Magnesio/Potasio	Mg/K	3.05	Adimensional		Relación matemática	
Relación (Ca+Mg)/K	(Ca+Mg)/K	18.7	Adimensional		Relación matemática	
Observaciones a los resultados:		Convenciones:				
NINGUNO		N/R: No registra / N.A. No Aplica / Sln. Solución / N.S. No Suministrada / N.D. No Detectado M/VH Mineralización Via Húmeda / M.I. Muestra Insuficiente EAA Espectroscopía de Absorción Atómica / EAA Espectroscopía de Emisión Atómica / ICP-OES Espectroscopía de Emisión Óptica de plasma acoplado inductivamente				

---- Fin del Reporte de Resultados Analíticos ----

Autorizado por:



Teresa Cozo
Subgerencia Técnica - Química - PQ 2155

Revisado por:



Adriana Navarro
Coordinador de Área-Lic. en Química-



INFORME DE RESULTADOS

ÁREA DE ANÁLISIS DE SUELOS



Informe N°	40136-V1-2021		N° de Laboratorio	ASU-11970-2021		
Información del Cliente						
Remitente	LA CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA - AGROSAVIA		Responsable	SR. ISIDRO BELTRAN		
Propietario	AGROSAVIA C.I.		email contacto	jibeltran@agrosavia.co; avargas@agrosavia.co		
Fecha Ingreso	11-11-2021		Fecha Emisión	03-12-2021		
Información de la Muestra enviada por el cliente						
Cultivo / Variedad	MAIZ - HIBRIDO		Lote / Bloque	AB[1] - CASA DE MALLAS		
Municipio/Departamento/Finca	ESPINAL - TOLIMA	C.I. NATAIMA	N° Contrato	N.A.		
Información adicional	EXPERIMENTAL 2021		Condiciones recepción	CONFORME		
ANÁLISIS CONVENCIONAL DE SUELO CAMPO*						
Descripción Física de la Muestra		SÓLIDO GRIS OSCURO				
Variable	Expresión / Sigla	Resultados	Unidades	Rango Medio		Extractante/Técnica/Referencia
pH	pH	5.35	pH_unit	5.60	6.80	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Conductividad Eléctrica	CE	0.58	dS/m	N.R.	N.R.	Pasta de saturación / Conductimétrica / USDA Salinity Laboratory
Capacidad de Intercambio Catiónica Efectiva	CICE	16.8	meq/100g	N.R.	N.R.	Cálculo
Saturación de Humedad Media	N.A.	30.6	%	20.0	40.0	Pasta de saturación / Gravimétrica / USDA Salinity Laboratory
Carbono Orgánico Oxidable	COOx	5.04	%	2.00	4.00	Sol. Dicromato de Potasio / Colorimétrico / NTC 5403 Walkley-Black
Materia Orgánica	MO	8.69	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Nitrógeno Total	N Total	0.420	%	N.R.	N.R.	Cálculo
Densidad Aparente	d.a.	0.922	g/cm3	N.R.	N.R.	Cálculo
Determinación de Textura						
Arcilla	Tex.	10.0	%			Análisis directo / Método de Bouyoucos
Arena	Tex.	40.0	%			Análisis directo / Método de Bouyoucos
Limo	Tex.	50.0	%			Análisis directo / Método de Bouyoucos
Textura	Tex.	Franco		Adimensional		Análisis directo / Método de Bouyoucos
Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Potasio Intercambiable	K	319	0.815	N.R.	N.R.	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Calcio Intercambiable	Ca	2610	13.0	3.00	6.00	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Magnesio Intercambiable	Mg	295	2.43	1.50	3.00	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Sodio Intercambiable	Na	98.6	0.429	0.04	0.48	Sol. Acetato de Amonio / ICP-OES / NTC 5349 - Método Interno
Acidez Intercambiable	Ac. Inter.	15.1	0.168	0.20	0.40	Sol. KCl 1N / Volumétrica / NTC 5263
Hierro	Fe	262	N.A.	20	100	Sol. Ácido Mehlich 1 / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno

Variable	Expresión	Resultado (mg/kg)	Resultado (meq/100g)	Rango medio		Extractante / Técnica / Referencia
Manganeso	Mn	26.7	N.A.	10.0	50.0	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Cobre	Cu	1.92	N.A.	1.25	2.50	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Zinc	Zn	48.2	N.A.	2.00	5.00	Sis. Ácido Mehlich I / ICP-OES / NTC 5526-Método Interno
Boro	B	0.536	N.A.	0.50	1.00	Sis. Fosfato Monobásico de Calcio / Colorimétrico / Método Interno
Fósforo	P	57.1	N.A.	15.0	30.0	Sis. Bray II / Colorimétrico / NTC 5350
Azufre	S	74.7	N.A.	30.0	60.0	Sis. Fosfato Monobásico de Calcio / Turbidimétrico / Método Interno
RELACIONES MATEMÁTICAS						
Variable	Expresión	Resultado	Unidades		Extractante / Técnica / Referencia	
Saturación de Magnesio	Sat. Mg	14.5	%		Cálculo	
Saturación de Sodio	Sat. Na	2.55	%		Cálculo	
Saturación de Aluminio	Sat. Al	1.00	%		Cálculo	
Saturación de Potasio	Sat. K	4.85	%		Cálculo	
Saturación de Calcio	Sat. Ca	77.4	%		Cálculo	
Relación Calcio/Magnesio	Ca/Mg	5.35	Adimensional		Relación matemática	
Relación Calcio/Potasio	Ca/K	16.0	Adimensional		Relación matemática	
Relación Magnesio/Potasio	Mg/K	2.98	Adimensional		Relación matemática	
Relación (Ca+Mg)/K	(Ca+Mg)/K	18.9	Adimensional		Relación matemática	
Observaciones a los resultados:			Convenciones:			
NINGUNO			N.R. No registra / N.A. No Aplica / Sin. Solución / N.S. No Suministrada / N.D. No Detectado M.V.H. Mineralización Vía Húmeda / M.I. Muestra Insuficiente EAA Espectroscopía de Absorción Atómica / EAA Espectroscopía de Emisión Atómica ICP-OES Espectroscopía de Emisión Óptica de plasma acoplado inductivamente			

---- Fin del Reporte de Resultados Analíticos ----

Autorizado por:



Teresa Cozo
Subgerencia Técnica - Química - PQ 2155

Revisado por:



Adriana Navarro
Coordinador de Área-Lic. en Química-

Bibliografía

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Mahmood, A., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Arshad, M., & Qayyum, M. F. (2018). Biochar application increased the growth and yield and reduced cadmium in drought stressed wheat grown in an aged contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148(November 2017), 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.063>
- Ábrahám, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., & Szabados, L. (2010). Methods for Determination of Proline in Plants. In R. Sunkar (Ed.), *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology* (Vol. 639, pp. 317–331). <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0>
- Adrees, M., Khan, Z. S., Ali, S., Hafeez, M., Khalid, S., ur Rehman, M. Z., Hussain, A., Hussain, K., Shahid Chatha, S. A., & Rizwan, M. (2020). Simultaneous mitigation of cadmium and drought stress in wheat by soil application of iron nanoparticles. *Chemosphere*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124681>
- Ahmad, P. (2012). Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(11). <https://doi.org/10.5897/ajb11.3203>
- Akbar, K. F., Hale, W. H. G., Headley, A. D., & Athar, M. (2006). Heavy Metal Contamination of Roadside Soils of Northern England. *Soil & Water Res*, 1(4), 158–163.
- Akhter, M. F., Omelon, C. R., Gordon, R. A., Moser, D., & Macfie, S. M. (2014). Localization and chemical speciation of cadmium in the roots of barley and lettuce. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.005>
- Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Martínez-Pérez, A., Thompson, A. J., Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2015). Unravelling rootstockxscion interactions to improve food security. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), 2211–2226. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv027>
- Alban, M. B. K. A., Elain Apsara, S., Hebbar, K. B., Mathias, T. G., & Séverin, A. (2016). Morpho-physiological criteria for assessment of two month old cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes for drought tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0195-y>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>

- Alia, & Saradhi, P. (1991). Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. *Journal of Plant Physiology*, 138(5), 554–558. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80240-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80240-3)
- Altuntaş, C., Demiralay, M., Sezgin Muslu, A., & Terzi, R. (2020). Proline-stimulated signaling primarily targets the chlorophyll degradation pathway and photosynthesis associated processes to cope with short-term water deficit in maize. *Photosynthesis Research*, 144(1), 35–48. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00727-w>
- Andresen, E., Lyubenova, L., Hubáček, T., Nadeem, S., Bokhari, H., Matoušková, Š., Mijovilovich, A., Rohovec, J., & Küpper, H. (2020). Chronic exposure of soybean plants to nanomolar cadmium reveals specific additional high-affinity targets of cadmium toxicity. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1628–1644. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz530>
- Arao, T., & Ishikawa, S. (2006). Genotypic Differences in Cadmium Concentration and Distribution of Soybean and Rice. *Japan Agricultural Research Quarterly. Japan International Research Center for Agricultural Sciences*, 40(1), 21–30. <http://www.jircas.affrc.go.jp>
- Araque, O., Jaimez, R. E., Tezara, W., Coronel, I., Urich, R., & Espinoza, W. (2012). Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Experimental Agriculture*, 48(4), 513–522. <https://doi.org/10.1017/S0014479712000427>
- 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*, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- 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>
- Arunyanark, A., Jogloy, S., Akkasaeng, C., Vorasoot, N., Kesmala, T., Nageswara Rao, R. C., Wright, G. C., & Patanothai, A. (2008). Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00299.x>
- Arvelo, M. A., González León, D., Maroto Arce, S., Delgado López, T., & Montoya López, P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao. Prácticas Latinoamericanas. In *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/6181>
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Baccari, S., Elloumi, O., Chaari-Rkhis, A., Fenollosa, E., Morales, M., Drira, N., Ben Abdallah, F., Fki, L., & Munné-Bosch, S. (2020). Linking Leaf Water Potential, Photosynthesis and Chlorophyll Loss With Mechanisms of Photo- and Antioxidant Protection in Juvenile Olive Trees Subjected to Severe Drought. *Frontiers in Plant*

- Science*, 11(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614144>
- Balasimha, D., Daniel, E. V., & Bhat, P. G. (1991). Influence of environmental factors on photosynthesis in cocoa trees. *Agricultural and Forest Meteorology*, 55, 15–21. <https://doi.org/10.4172/2375-4338.1000e117>
- Baligar, V. C., Bunce, J. A., Machado, R. C. R., & Elson, M. K. (2008). Photosynthetic photon flux density, carbon dioxide concentration, and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica*, 46(2), 216–221. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0035-7>
- Bansal, R., Priya, S., Dikshit, H. K., Jacob, S. R., Rao, M., Bana, R. S., Kumari, J., Tripathi, K., Kumar, A., Kumar, S., & Siddique, K. H. M. (2021). Growth and antioxidant responses in iron-biofortified lentil under cadmium stress. *Toxics*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxics9080182>
- Barraza, F., Schreck, E., Ev ^ Eque, T. L., Uzu, G., Opez, F. L., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>
- Barrera, J., Suárez, D., & Melgarejo, L. (2010). Análisis de crecimiento en plantas. *Experimentos En Fisiología Vegetal*, December, 25–38. <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2019/02/Melgarejo-2010.pdf>
- Bashir, N., Athar, H. U. R., Zafar, Z. U., Ashraf, M., Kalaji, H. M., Wróbel, J., & Mahmood, S. (2021). Is photoprotection of psii one of the key mechanisms for drought tolerance in maize? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413490>
- Bashir, W., Anwar, S., Zhao, Q., Hussain, I., & Xie, F. (2019). Interactive effect of drought and cadmium stress on soybean root morphology and gene expression. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175(November 2018), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.042>
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev), 1–10. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies Summary. *Plant and Soil*, 39, 205–207.
- Bauddh, K., & Singh, R. P. (2012). Growth, tolerance efficiency and phytoremediation potential of *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) in salinity and drought affected cadmium contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.019>
- Berglund, T., & Ohlsson, A. B. (1995). Defensive and secondary metabolism in plant tissue cultures, with special reference to nicotinamide, glutathione and oxidative stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/BF00052169>

- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell and Environment*, 40(1), 4–10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Borjas-Ventura, R., Bello-Medina, N., Bello-Amez, S., Alvarado-Huaman, L., Rabaza-Fernandez, D., Tapia Y Figueroa, L., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2022). Absorción diferenciada de cadmio y su efecto en la fisiología de seis genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en San Ramón, Selva Central del Perú. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4000>
- Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>
- Bunn, C., Lundy, M., Läderach, P., & Castro, F. (2017). Global climate change impacts on cocoa. *Paper Presented at International Symposium on Cocoa Research, 13-17 November 2017, Lima, Peru, November*, 13–17.
- Carpena, R. O., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., De Felipe, M. R., & Zornoza, P. (2003). Cadmium-stress in white lupin: Effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(10), 911–919. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00136-0)
- Castro, A. V., De Almeida, A.-A. F., Pirovani, C. P., Reis, G. S. M., Almeida, N. M., & Mangabeira, P. A. O. (2015). Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003>
- 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>
- Chen, L., Long, X. H., Zhang, Z. H., Zheng, X. T., Rengel, Z., & Liu, Z. P. (2011). Cadmium Accumulation and Translocation in Two Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Cultivars. *Pedosphere*, 21(5), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60159-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60159-8)
- Chen, Y. E., Liu, W. J., Su, Y. Q., Cui, J. M., Zhang, Z. W., Yuan, M., Zhang, H. Y., & Yuan, S. (2016). Different response of photosystem II to short and long-term drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 158(2), 225–235. <https://doi.org/10.1111/ppl.12438>
- Cho, U. H., & Kim, I. T. (2003). Effect of Cadmium on Oxidative Stress and Activities of Antioxidant Enzymes in Tomato Seedlings. In *The Korean Journal of Ecology* (Vol. 26, Issue 3, pp. 115–121). <https://doi.org/10.5141/jefb.2003.26.3.115>
- Cho, U. H., & Seo, N. H. (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168(1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>

- Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., & Verbruggen, N. (2013). Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, 18(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.003>
- De Almeida, J., Tezara, W., & Herrera, A. (2016). Physiological responses to drought and experimental water deficit and waterlogging of four clones of cacao (*Theobroma cacao* L.) selected for cultivation in Venezuela. *Agricultural Water Management*, 171, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.03.012>
- De Almeida, N. M., Furtado De Almeida, A.-A., De Almeida, N. S., Do Nascimento, L. J., De Carvalho Neto, C. H., Pirovani, C. P., Ahnert, D., & Baligar, V. C. (2022). Scion-rootstock interaction and tolerance to cadmium toxicity in juvenile *Theobroma cacao* plants. *Scientia Horticulturae*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111086>
- de Silva, N. D. G., Cholewa, E., & Ryser, P. (2012). Effects of combined drought and heavy metal stresses on xylem structure and hydraulic conductivity in red maple (*Acer rubrum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5957–5966. <https://doi.org/doi:10.1093/jxb/ers241>
- Deng, X., Joly, R. J., & Hahn, D. T. (1990). The influence of plant water deficit on photosynthesis and translocation of ¹⁴C-labeled assimilates in cacao seedlings. *Physiologia Plantarum*, 78(4), 623–627. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05251.x>
- Dietz, K. J. (2016). Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: Why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? *Molecules and Cells*, 39(1), 20–25. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2324>
- Dobrikova, A. G., Apostolova, E. L., Han'c, A. H., Yotsova, E., Borisova, P., Sperdouli, I., Adamakis, I.-D. S., Moustakas, M., & Sibley, P. (2021). Cadmium toxicity in *Salvia sclarea* L.: An integrative response of element uptake, oxidative stress markers, leaf structure and photosynthesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111851>
- Dos Santos, I. C., De Almeida, A. A. F., Anher, D., Da Conceição, A. S., Pirovani, C. P., Pires, J. L., Valle, R. R., & Baligar, V. C. (2014). Molecular, physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to soil water deficit. *PLoS ONE*, 9(12), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115746>
- Dos Santos, J. V., Baligar, V. C., Ahnert, D., & de Almeida, A. A. F. (2023). Transcriptomic, osmoregulatory and translocation changes modulates Ni toxicity in *Theobroma cacao*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 196, 624–633. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2023.01.053>
- Dos Santos Souza, L. M., Furtado De Almeida, A.-A., Martins Da Silva, N., Rafaela, B., Oliveira, M., Victor, J., Silva, S., Olímpio, J., Junior, S., Ahnert, D., & Baligar, V. C. (2020). Mitigation of cadmium toxicity by zinc in juvenile cacao: Physiological, biochemical, molecular and micromorphological responses. *Environmental and Experimental Botany*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104201>
- Drake, J. E., Power, S. A., Duursma, R. A., Medlyn, B. E., Aspinwall, M. J., Choat, B.,

- Creek, D., Eamus, D., Maier, C., Pfautsch, S., Smith, R. A., Tjoelker, M. G., & Tissue, D. T. (2017). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought: A comparison of model formulations. *Agricultural and Forest Meteorology*, 247(December 2016), 454–466. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.08.026>
- Dutta, A., Patra, A., Singh Jatav, H., Singh Jatav, S., Kumar Singh, S., Sathyanarayana, E., Sudhanshu, V., & Singh, P. (2020). Toxicity of Cadmium in Soil-Plant-Human Continuum and Its Bioremediation Techniques. In *Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94307>
- Dzandu, E., Enu-Kwesi, L., Markwei, C. M., & Ayeh, K. O. (2021). Screening for drought tolerance potential of nine cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes from Ghana. *Heliyon*, 7(11), e08389. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08389>
- El-Mahdy, M. T., Abdel-Wahab, D. A., & Youssef, M. (2021). In vitro morpho-physiological performance and DNA stability of banana under cadmium and drought stresses. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(3), 460–469. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10142-4>
- 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>
- Fernández-Paz, J., Cortés, A. J., Hernández-Varela, C. A., Mejía-de-Tafur, M. S., Rodríguez-Medina, C., & Baligar, V. C. (2021). Rootstock-Mediated Genetic Variance in Cadmium Uptake by Juvenile Cacao (*Theobroma cacao* L.) Genotypes, and Its Effect on Growth and Physiology. *Frontiers in Plant Science*, 12, 2848. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.777842/BIBTEX>
- Florida Rofner, N. (2021). Revision sobre límites máximos de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Granja*, 34(2), 113–126.
- Furcal-Beriguete, P., & Torres-Morales, L. J. (2020). Determination of cadmium concentrations in cocoa plantations (*Theobroma cacao* L.) in Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 33. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i1.5027>
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S., & Becker, D. F. (2020). Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151(December 2019), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.010>
- García Lozano, J., & Moreno Fonseca, L. P. (2016). Respuestas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. En etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agronomica*, 65(1), 44–50. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.48161>
- Garrett, R. G., Porter, A. R. D., Hunt, P. A., & Lalor, G. C. (2008). The presence of anomalous trace element levels in present day Jamaican soils and the geochemistry of Late-Miocene or Pliocene phosphorites. *Applied Geochemistry*, 23(4), 822–834. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.08.008>

- Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: a case study from Colombia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2455–2476. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2011). Cadmium stress tolerance in crop plants: Probing the role of sulfur. *Plant Signaling and Behavior*, 6(2), 215–222. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14880>
- Grant, C. A., Clarke, J. M., Duguid, S., & Chaney, R. L. (2008). Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of the Total Environment*, 390(2–3), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.038>
- Gu, J., Zou, G., Su, S., Li, S., Liu, W., Zhao, H., Liu, L., Jin, L., Tian, Y., Zhang, X., Wang, Y., Zhao, T., Du, L., & Wei, D. (2022). Effects of pH on Available Cadmium in Calcareous Soils and Culture Substrates. *Eurasian Soil Science*, 55(12), 1714–1719. <https://doi.org/10.1134/S1064229322601391>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Gutiérrez-Martínez, P. B., Torres-Morán, M. I., Romero-Puertas, M. C., Casas-Solís, J., Zarazúa-Villaseñor, P., Sandoval-Pinto, E., & Ramírez-Hernández, B. C. (2020). Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress//Evaluación de enzimas antioxidantes en hojas y raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* bajo estrés de cadmio. *Biotecnia*, 22(2), 110–118. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1252>
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- 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*, 134, 135–225. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
- He, S., Yang, X., He, Z., & Baligar, V. C. (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)
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hossain, M. A., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2010). Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0028-4>

- Hu, P. J., Qiu, R. L., Senthilkumar, P., Jiang, D., Chen, Z. W., Tang, Y. T., & Liu, F. J. (2009). Tolerance, accumulation and distribution of zinc and cadmium in hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.02.014>
- Ibrahim, M. H., & Jaafar, H. Z. E. (2012). Primary, secondary metabolites, H₂O₂, malondialdehyde and photosynthetic responses of *Orthosiphon stamineus* benth. to different irradiance levels. *Molecules*, 17(2), 1159–1176. <https://doi.org/10.3390/molecules17021159>
- Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., & Alyemeni, M. N. (2013). Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.004>
- Jaimes, Y., Agudelo, G., Monrealegre, F., Rengifo, G., & Rojas, J. (2022). *Cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) en el departamento de Santander (2a ed.)*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA. <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/view/276/258/1646-1>
- Jaraba, A. B., Buriticá, Á. J., Vega, F. N., Urrego, J. E., Bautista, J. F., Puerta, J. A., & Yepes, J. E. (2021a). Modelo Productivo Para El Cultivo De Cacao (*Theobroma cacao* L.) - Nutrición y Fertilización. In *Campaña Nacional de Chocolates - CNCH*. www.chocolates.com.co
- Jaraba, A. B., Buriticá, Á. J., Vega, F. N., Urrego, J. E., Bautista, J. F., Puerta, J. A., & Yepes, J. E. (2021b). *Modelo productivo para el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) - Origen, Botánica y Generalidades*. Campaña Nacional de Chocolates - CNCH. <https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2021/12/AF-FOLLETO-ORIGEN-BOTANICA-Y-GENERALIDADES-1.pdf>
- Jiménez, S., Dridi, J., Gutiérrez, D., Moret, D., Irigoyen, J. J., Moreno, M. A., & Gogorcena, Y. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiology*, 33(10), 1061–1075. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt074>
- Juby, B., Minimol, J. S., Suma, B., Santhoshkumar, A. V., Jiji, J., & Panchami, P. S. (2021). Drought mitigation in cocoa (*Theobroma cacao* L.) through developing tolerant hybrids. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03352-4>
- Juenger, T. E., & Verslues, P. E. (2023). Time for a drought experiment: Do you know your plants' water status? *Plant Cell*, 35(1), 10–23. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac324>
- Kabata-Pendias, A. (1993). Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry*, 8, 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(09\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(09)80002-4)
- Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137(1–2), 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- Kubier, A., Wilkin, R. T., & Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review EPA Public Access. *Appl Geochem*, 108, 1–16.

- <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>
- Lahive, F., Hadley, P., & Daymond, A. J. (2019). The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(1). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>
- Lahive, F., Handley, L. R., Hadley, P., & Daymond, A. J. (2021). Climate change impacts on cacao: Genotypic variation in responses of mature cacao to elevated CO₂ and water deficit. *Agronomy*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy11050818>
- Lajayer, B. A., Ghorbanpour, M., & Nikabadi, S. (2017). Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(June), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.035>
- Lanza, J. G., Churión, P. C., Liendo, N. J., & López, V. H. (2016). Evaluación del contenido de metales pesados en cacao (*Theobroma cacao* L.) de Sabta Bárbara del Zulia, Venezuela. *Saber, Universidad de Oriente*, 28, 106–115.
- Letten, S., Vandecasteele, B., De Vos, B., Vansteenkiste, D., & Verschelde, P. (2011). Intra- and inter-annual variation of Cd, Zn, Mn and Cu in foliage of poplars on contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2306–2316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.029>
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., Umaharan, P., & Campus, A. (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>
- Lewis, V. R., Farrell, A. D., Umaharan, P., & Lennon, A. M. (2021). Genetic variation in high light responses of *Theobroma cacao* L. accessions. *Heliyon*, 7(6), e07404. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07404>
- Li, R., Guo, P., Baum, M., Grando, S., & Ceccarelli, S. (2006). Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators. *Agricultural Sciences in China*, 5(October), 751–757.
- Li, S., Liu, J., Liu, H., Qiu, R., Gao, Y., & Duan, A. (2021). Role of Hydraulic Signal and ABA in Decrease of Leaf Stomatal and Mesophyll Conductance in Soil Drought-Stressed Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 12(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.653186>
- Li, T., Wang, R., Zhao, D., & Tao, J. (2020). Effects of drought stress on physiological responses and gene expression changes in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Plant Signaling and Behavior*, 15(5). <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1746034>
- Li, Y., Rahman, S. U., Qiu, Z., Shahzad, S. M., Nawaz, M. F., Huang, J., Naveed, S., Li, L., Wang, X., & Cheng, H. (2023). Toxic effects of cadmium on the physiological and biochemical attributes of plants, and phytoremediation strategies: A review.

- Environmental Pollution*, 121433. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121433>
- Lisar, S., Seyed, Y., Motafakkerazad, R., Mosharraf, M., Rahm, M., & Ismail, M. (2012). Introductory Chapter: Water Stress. *Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses*, 1–15. www.intechopen.com
- Liu, C., Yu, R., & Shi, G. (2016). Effects of drought on the accumulation and redistribution of cadmium in peanuts at different developmental stages. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(8), 1049–1057. <https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1271120>
- Liu, X., Peng, K., Wang, A., Lian, C., & Shen, Z. (2010). Cadmium accumulation and distribution in populations of *Phytolacca americana* L. and the role of transpiration. *Chemosphere*, 78(9), 1136–1141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.030>
- Liu, Y., Xiao, T., Perkins, R. B., Zhu, J., Zhu, Z., Xiong, Y., & Ning, Z. (2017). Geogenic cadmium pollution and potential health risks, with emphasis on black shale. *Journal of Geochemical Exploration*, 176, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.04.004>
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., & Navari-Izzo, F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, 119(3), 1091–1099. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.1091>
- Lorentzen, E. M. L., & Kingston, H. M. (1996). Comparison of microwave-assisted and conventional leaching using EPA method 3050B. *Analytical Chemistry*, 68(24), 4316–4320. <https://doi.org/10.1021/ac960553l>
- 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>
- Maddela, N. R., Kakarla, D., García, L. C., Chakraborty, S., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2020). Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. *Science of the Total Environment*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137645>
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C., & Sohrabi, E. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8), 580–585.
- Makholwa, K., Malambane, G., Moseki, B., & Nthupisang, B. (2021). Water Stress Response in Different *Jatropha curcas* Accessions from Different Geographical Zones of Botswana: Biochemical & Physiological Perceptive. *American Journal of Plant Sciences*, 12(09), 1305–1318. <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.129091>
- Maréchaux, I., Bartlett, M. K., Sack, L., Baraloto, C., Engel, J., Joetzjer, E., & Chave, J. (2015). Drought tolerance as predicted by leaf water potential at turgor loss point varies strongly across species within an Amazonian forest. *Functional Ecology*, 29(10), 1268–1277. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12452>
- Martínez-Ferri, E., Moreno-Ortega, G., Van Den Berg, N., & Pliego, C. (2019). Mild water

- stress-induced priming enhance tolerance to *Rosellinia necatrix* in susceptible avocado rootstocks. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2016-3>
- Mattina, M. J. I., Lannucci-Berger, W., Musante, C., & White, J. C. (2003). Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution*, 124(3), 375–378. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00060-5)
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty P. (2002). *Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants on JSTOR*. Current Science Association. Vol. 82, No. 5. <https://www.jstor.org/stable/24105959>
- Medina, V., & Laliberte, B. (2017). *A review of research on the effects of drought and temperature stress and increased CO2 on Theobroma cacao L., and the role of genetic diversity to address climate change*. Bioversity International.
- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., Yadav, M., & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, e02952. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
- Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). *Cadmium in Cacao from Latin America and the Caribbean – A Review of Research and Potential Mitigation Solutions*. Bioversity International.
- Mingorance, M. D., Valdés, B., & Oliva, S. R. (2007). Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. *Environment International*, 33(4), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.01.005>
- Moore, R. E. T., Ullah, I., de Oliveira, V. H., Hammond, S. J., Streckopytov, S., Tibbett, M., Dunwell, J. M., & Rehkämper, M. (2020). Cadmium isotope fractionation reveals genetic variation in Cd uptake and translocation by *Theobroma cacao* and role of natural resistance-associated macrophage protein 5 and heavy metal ATPase-family transporters. *Horticulture Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0292-6>
- Mori, S., Uruguchi, S., Ishikawa, S., & Arao, T. (2009). Xylem loading process is a critical factor in determining Cd accumulation in the shoots of *Solanum melongena* and *Solanum torvum*. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.006>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Llor, 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>
- Mukherjee, M. (2017). Lead and Cadmium Toxicity on Seedling Growth and Metabolism of *Trigonella foenum-graecum* L. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(7), 1685–1689. <https://doi.org/10.21275/art20175574>
- Nadarajah, K. K. (2020). Ros homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 15, pp. 1–29). MDPI AG.

<https://doi.org/10.3390/ijms21155208>

- Najeeb, U., Jilani, G., Ali, S., Sarwar, M., Xu, L., & Zhou, W. (2011). Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.037>
- Nguyen, H. M., Kim, M., Ralph, P. J., Marín-Guirao, L., Pernice, M., & Procaccini, G. (2020). Stress Memory in Seagrasses: First Insight Into the Effects of Thermal Priming and the Role of Epigenetic Modifications. *Frontiers in Plant Science*, 11(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00494>
- Niether, W., Glawe, A., Pfohl, K., Adamtey, N., Schneider, M., Karlovsky, P., & Pawelzik, E. (2020). The effect of short-term vs. long-term soil moisture stress on the physiological response of three cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. *Plant Growth Regulation*, 92(2), 295–306. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00638-9>
- Nirola, R., Megharaj, M., Palanisami, T., Aryal, R., Venkateswarlu, K., & Ravi Naidu. (2015). Evaluation of metal uptake factors of native trees colonizing an abandoned copper mine – a quest for phytostabilization. *Journal of Sustainable Mining*, 14(3), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jsm.2015.11.001>
- Oguz, M. C., Aycan, M., Oguz, E., Poyraz, I., & Yildiz, M. (2022). Drought Stress Tolerance in Plants: Interplay of Molecular, Biochemical and Physiological Responses in Important Development Stages. *Physiologia*, 2(4), 180–197. <https://doi.org/10.3390/physiologia2040015>
- Oliveira, R. B. M., Furtado De Almeida, A.-A., De Almeida Santos, N., & Pirovani, C. P. (2022). Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. *Scientia Horticulturae*, 293, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110733>
- Oono, Y., Yazawa, T., Kawahara, Y., Kanamori, H., Kobayashi, F., Sasaki, H., Mori, S., Wu, J., Handa, H., Itoh, T., & Matsumoto, T. (2014). Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096946>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Osorio Zambrano, M. A., Castillo, D. A., Rodríguez Pérez, L., & Terán, W. (2021). Cacao (*Theobroma cacao* L.) Response to Water Stress: Physiological Characterization and Antioxidant Gene Expression Profiling in Commercial Clones. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700855>
- Palencia, G., Gómez, R., & Mejía, L. A. (2007). *Patrones de cacao* (Vol. 1, pp. 1–24). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2222/42973_48680.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Parmar, P., Kumari, N., & Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies*, *54*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-45>
- Pasricha, S., Mathur, V., Garg, A., Lenka, S., Verma, K., & Agarwal, S. (2021). Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environmental Challenges*, *4*, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100197>
- Pereira de Araújo, R., Furtado De Almeida, A.-A., Pereira, L. S., Mangabeira, P. A. O., Souza, J. O., Pirovani, C. P., Ahnert, D., & 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*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
- Pereira, M. P., Rodrigues, L. C. de A., Corrêa, F. F., de Castro, E. M., Ribeiro, V. E., & Pereira, F. J. (2015). Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. *Trees - Structure and Function*, *30*(3), 807–814. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1322-0>
- Pompelli, M. F., Barata-Luís, R., Vitorino, H. S., Gonçalves, E. R., Rolim, E. V., Santos, M. G., Almeida-Cortez, J. S., Ferreira, V. M., Lemos, E. E., & Endres, L. (2010). Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*, *34*(8), 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.011>
- Rada, F., Jaimez, R. E., García-Nuñez, C., Azócar, a, & Ramírez, M. E. (2005). Relaciones hídricas e intercambio de gases en *Theobroma cacao* var. Guasare bajo períodos de deficit hídrico. *Rev. Fac. Agron*, *22*(April), 120.
- Ramalho, J. C., Rodrigues, A. P., Lidon, F. C., Marques, L. M. C., Leitão, A. E., Fortunato, A. S., Pais, I. P., Silva, M. J., Scotti-Campos, P., Lopes, A., Reboredo, F. H., & Ribeiro-Barros, A. I. (2018). Stress cross-response of the antioxidative system promoted by superimposed drought and cold conditions in *Coffea* spp. *PLoS ONE*, *13*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198694>
- Redjala, T., Sterckeman, T., & Morel, J. L. (2009). Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environmental and Experimental Botany*, *67*(1), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.012>
- Rellán-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández, A., Campo, F. F. D., & Hernández, L. E. (2006). Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant and Soil*, *279*(1–2), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3900-1>
- Roberts, T. L. (2014). Cadmium and phosphorous fertilizers: The issues and the science. *Procedia Engineering*, *83*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.09.012>
- Romero, A. P., Alarcón, A., Valbuena, R. I., & Galeano, C. H. (2017). Physiological assessment of water stress in potato using spectral information. *Frontiers in Plant Science*, *8*(September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01608>

- Romero Navarro, J. A., Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, A., Mata-Quirós, A., Haiminen, N., Mustiga, G., Livingstone, D., Van Bakel, H., Kuhn, D. N., Parida, L., Kasarskis, A., & Motamayor, J. C. (2017). Application of genome wide association and genomic prediction for improvement of cacao productivity and resistance to black and frosty pod diseases. *Frontiers in Plant Science*, 8(November). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01905>
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Schwarz, D., Franken, P., & Colla, G. (2012). Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crops. In *Plant Responses to Drought Stress* (pp. 171–195). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., & Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, 13(5), 468–474. <https://doi.org/doi:10.1038/nbt0595-468>
- Savvas, D., Colla, G., Rouphael, Y., & Schwarz, D. (2010). Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.011>
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/plants10020259>
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Antunes, P. M. C. (2016). Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. *How to Recruit Voluntary Donors in the Third World?*, 241, 73–137. https://doi.org/10.1007/398_2016_8
- Sharma, S. S., Schat, H., & Vooijs, R. (1998). In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry*, 49(6), 1531–1535. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00282-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00282-9)
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., De Groot, S., Soole, K., & Langridge, P. (2017). Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production? *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01950>
- Shawon, R. A., Kang, B. S., Kim, H. C., Lee, S. G., Kim, S. K., Lee, H. J., Bae, J. H., & Ku, Y. G. (2018). Changes in Free Amino Acid, Carotenoid, and Proline Content in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*) in Response to Drought Stress. *Korean Journal of Plant Resources*, 31(6), 622–633.
- Shi, G., Xia, S., Ye, J., Huang, Y., Liu, C., & Zhang, Z. (2015). PEG-simulated drought stress decreases cadmium accumulation in castor bean by altering root morphology. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.008>
- Singh, S., & Prasad, S. M. (2014). Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: Mechanism of toxicity amelioration by kinetin. *Scientia Horticulturae*, 176, 1–10.

<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2014.06.022>

- Solís-Domínguez, F. A., González-Chávez, M. C., Carrillo-González, R., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *Journal of Hazardous Materials*, *141*(3), 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.014>
- Song, C., Shen, W., Du, L., Wen, J., Lin, J., & Li, R. (2019). Development and chemical characterization of Casparian strips in the roots of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Trees - Structure and Function*, *33*(3), 827–836. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01820-x>
- 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>
- Standtman, E. R., Moskovitz, J., & Levine, R. L. (2003). Oxidation of Methionine Residues of Proteins: Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, *5*(5), 577–582.
- Stankovic, S., Baptista, P., Carillo, P., & Bandurska, H. (2022). Drought Stress Responses: Coping Strategy and Resistance. *Plants*, MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11070922>
- Su, Y., Wang, X., Liu, C., & Shi, G. (2013). Variation in cadmium accumulation and translocation among peanut cultivars as affected by iron deficiency. *Plant and Soil*, *363*(1–2), 201–213. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1310-8>
- Suchithra, M., Suma, B., Js, M., & Mathew, D. (2023). Biochemical Response of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Genotypes to Water Deficit Stress Condition Biochemical Response of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Genotypes to Water Deficit Stress Condition. *Environment and Ecology*, *41*(2), 824–830.
- Suh, N. N., & Molua, E. L. (2022). Cocoa production under climate variability and farm management challenges: Some farmers' perspective. *Journal of Agriculture and Food Research*, *8*(February), 100282. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100282>
- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, *2*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2>
- Telfer, A. (2005). Too much light? How β -carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *4*(12), 950–956. <https://doi.org/doi:10.1039/b507888c>
- Terzi, R., & Kadioglu, A. (2006). Drought stress tolerance and the antioxidant enzyme system in *Ctenanthe setosa*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *48*(2), 89–96.
- Tran, T. A., & Popova, L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: Recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, *37*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3906/bot-1112-16>

- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi, Y., Inukai, Y., Ono, K., Kanno, N., Inoue, H., Takehisa, H., Motoyama, R., Nagamura, Y., Wu, J., Matsumoto, T., Takai, T., Okuno, K., & Yano, M. (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, *45*(9), 1097–1102. <https://doi.org/10.1038/ng.2725>
- Umar, M., & Siddiqui, Z. S. (2018). Physiological performance of sunflower genotypes under combined salt and drought stress environment. *Acta Botanica Croatica*, *77*(1), 36–44. <https://doi.org/10.2478/botcro-2018-0002>
- Ünyayar, S., Keleş, Y., & Çekiç, F. Ö. (2005). The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant, Soil and Environment*, *51*(2), 57–64. <https://doi.org/10.17221/3556-pse>
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of the Total Environment*, *781*, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Varone, L., Ribas-Carbo, M., Cardona, C., Gallé, A., Medrano, H., Gratani, L., & Flexas, J. (2012). Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in seedlings and saplings of Mediterranean species pre-conditioned and aged in nurseries: Different response to water stress. *Environmental and Experimental Botany*, *75*, 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.07.007>
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, *35*(4), 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(3), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>
- Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLoS ONE*, *17*(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>
- Wang, H. zheng, Zhang, L. he, Ma, J., Li, X. yi, Li, Y., Zhang, R. ping, & Wang, R. quan. (2010). Effects of Water Stress on Reactive Oxygen Species Generation and Protection System in Rice During Grain-Filling Stage. *Agricultural Sciences in China*, *9*(5), 633–641. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60138-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60138-3)
- Warren, C. R. (2008). Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *Journal of Plant Nutrition*, *31*(7), 1321–1332. <https://doi.org/10.1080/01904160802135092>
- White, P. J., & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, *105*(7), 1073–1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Wilkinson, S., & Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*, *33*(4), 510–525.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x>
- Xia, S., Wang, X., Su, G., & Shi, G. (2015). Effects of drought on cadmium accumulation in peanuts grown in a contaminated calcareous soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23), 18707–18717. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5063-9>
- Xiao, X., Xu, X., & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42(5), 705–719. <https://doi.org/10.14214/sf.224>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. In *Horticulturae* (Vol. 7, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Yilmaz, D. D., & Parlak, K. U. (2011). Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecological Indicators*, 11(2), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.06.012>
- Zakariyya, F., & Indradewa, D. (2018). Drought Stress Affecting Growth and Some Physiological Characters of Three Cocoa Clones at Seedling Phase. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 34(3), 156–165. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v34i3.330>
- Zakariyya, F., Setyawan, B., & Wahyu Susilo, A. (2017). Stomatal, Proline, and Leaf Water Status Characters of Some Cocoa Clones (*Theobroma cacao* L.) on Prolonged Dry Season. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 33(2), 109–117. <https://doi.org/10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v33i2.264>
- Zhao, H., Guan, J., Liang, Q., Zhang, X., Hu, H., & Zhang, J. (2021). Effects of cadmium stress on growth and physiological characteristics of sassafras seedlings. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89322-0>
- Zhou, W., & Qiu, B. (2005). Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Science*, 169(4), 737–745. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.030>
- Živanović, B., Komić, S. M., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., & Jovanović, S. V. (2020). Leaf soluble sugars and free amino acids as important components of abscisic acid—mediated drought response in tomato. *Plants*, 9(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9091147>
- Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M. F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F. U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2022). Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils; A Comprehensive Review. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>