

2022-12-14

Respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd y en condiciones de déficit hídrico

John Cristhian Fernández Lizarazo
Universidad de La Salle, Bogotá, johfernandez@lasalle.edu.co

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/utopia_working_papers



Part of the [Agriculture Commons](#)

Recommended Citation

Fernández Lizarazo, John Cristhian, "Respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd y en condiciones de déficit hídrico" (2022). *Utopía - Working papers*. 10.
https://ciencia.lasalle.edu.co/utopia_working_papers/10

This Documento de trabajo is brought to you for free and open access by the Utopía at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Utopía - Working papers by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Working Papers
2022

Respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd y en condiciones de déficit hídrico

John Cristhian Fernández Lizarazo¹

RESUMEN

A pesar de que el cadmio se encuentra normalmente en el ambiente, su concentración ha aumentado en los últimos 100 años debido a actividades antrópicas como la minería y el uso de combustibles fósiles. Recientemente se han incluido límites a las concentraciones de cadmio en el grano de cacao con el propósito de evitar que concentraciones de cadmio lleguen a niveles que podrían tener un efecto negativo en los consumidores. Se ha encontrado que los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) son importantes en los procesos de fito-remediación y que pueden facilitar la supervivencia de las plantas que crecen en suelos contaminados por metales pesados disminuyendo su toxicidad a través del mejoramiento de mecanismos antioxidantes, modifican la expresión de genes de tolerancia a metales pesados y aumentando la absorción de nutrientes lo que contribuye a mejorar la eficiencia de la fito-remediación. Varios estudios han establecido la interacción entre el déficit hídrico y el cadmio en la fisiología de plantas. Por tal motivo se buscó identificar la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en un medio enriquecido con Cd y la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al déficit hídrico. Los resultados indican que a concentración de Cd en el sustrato y la identidad de la línea monospórica de HFMA inoculante, modularon su absorción, translocación y concentración en plantas de cacao. Adicionalmente, el déficit hídrico, pero no el Cd tuvieron efectos negativos en la acumulación de biomasa bajo las condiciones evaluadas debido aparentemente a limitaciones estomáticas de la fotosíntesis. Nos obstante, para futuros estudios se deben analizar las posibles limitaciones estomáticas de la fotosíntesis.

Palabras clave: Sustrato, crecimiento, fotosíntesis, estrés abiótico, contaminación.

¹ Director Programa Ingeniería Agronómica. Universidad de La Salle



Working Papers 2022

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Teobroma cacao* L.) es ampliamente valorado en el mundo por su calidad nutricional (ICCO, 2015; Rucker, 2009), sin embargo, en análisis recientes se ha encontrado que su principal subproducto, el chocolate, tiene concentraciones de cadmio en niveles que podrían tener un efecto negativo en los consumidores causando daños a la salud relacionados con el cáncer y el mal funcionamiento renal, lo que es especialmente grave si se considera que el chocolate es ampliamente consumido por la población infantil (European Food Safety Authority, 2009, 2012).

Por esta razón, recientemente se han incluido límites a las concentraciones de cadmio en el grano (ICCO, 2012). Así, la Comisión Europea publicó en 2014 la modificación de la regulación oficial (EC) No. 1881/2006 ajustando los límites máximos de cadmio en productos alimenticios y fijando la fecha límite para su cumplimiento en el año 2019 (European Commission, 2013), lo que tendrá un impacto mundial en el comercio del cacao (Pipitone, 2012).

Se ha considerado que el cadmio es el metal pesado del siglo XXI (Byrne et al., 2009). Esto, debido a, que es uno de los elementos traza más tóxicos en el ambiente (Nordic Council of Ministers, 2003), el más abundante de los metales pesados tóxicos para las plantas (Irfan et al., 2013) y un contaminante ambiental ubicuo porque se encuentra en el aire, en el suelo y en el agua (Filipič, 2012), donde es relativamente soluble lo que, en consecuencia, lo hace más bio-disponible (United Nations, 2010) y con tendencia a bio-acumularse debido a su larga vida media, representando un alto peligro para la salud humana y la vida silvestre (Filipič, 2012).

A pesar de que el cadmio se encuentra normalmente en el ambiente, su concentración ha aumentado en los últimos 100 años debido a actividades antrópicas como la minería y el uso de combustibles fósiles. De forma particular, en los suelos agrícolas, la presencia de cadmio está relacionado con el material parental del suelo, la cercanía de los cultivos a zonas de extracción de minerales y con la utilización de fertilizantes fosfatados o abonos orgánicos (Kirkham, 2006). No obstante, estos valores podrían variar dependiendo la estacionalidad de las lluvias, siendo mayores en época seca (Huamaní-Yupanqui et al.,



Working Papers 2022

2012) lo que indica que existe una interacción entre la oferta ambiental de agua y la disponibilidad de Cd en el suelo.

Lo anterior, sumado a la limitación en la disponibilidad de zonas boscosas para el establecimiento inicial del cacao, la falta de establecimiento de cultivos comerciales que puedan proveer sombra a las plantas de cacao durante su establecimiento inicial y el aumento mundial en la demanda de cacao, hacen que los productores siembren en zonas marginales a libre exposición sometiendo a las plantas a condiciones de déficit hídrico (Läderach et al., 2013). Esto indica que el estrés por exposición de los cultivos de cacao al Cd no es el único estrés al que están sometidos y que otros estreses como el hídrico van en aumento.

Varios estudios han establecido la interacción entre el déficit hídrico y el cadmio en la fisiología de plantas como la ortiga romana (Özyiğit & Akinci, 2009), maní (Liu et al., 2017; Xia et al., 2015), rábano de mar (Ellouzi et al., 2013), maíz (Azizian et al., 2013) e higuera (Shi et al., 2015). Lo que ha demostrado el creciente interés en estudiar la respuesta de las plantas a estreses combinados en un esfuerzo por simular las condiciones ambientales a las que están expuestas normalmente las plantas y particularmente aquellas cultivables (Bai et al., 2018; Pandey et al., 2017; Suzuki et al., 2014).

Los HFMA pueden facilitar la supervivencia de las plantas que crecen en suelos contaminados por metales pesados disminuyendo su toxicidad a través del mejoramiento de mecanismos antioxidantes (Mittler et al., 2004), modifican la expresión de genes de tolerancia a metales pesados (Ouziad et al., 2005) y aumentando la absorción de nutrientes lo que contribuye a mejorar la eficiencia de la fito-remediación (Hassan et al., 2013).

La fito-remediación implica principalmente fito-extracción o fito-estabilización de los metales pesados. En estudios recientes se ha encontrado que los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) son importantes en los procesos de fito-remediación²(Abu-Elsaoud et al., 2017) con efectos diferentes debidos a especies o genotipos de la misma especie de planta o de hongo utilizados (Hassan et al., 2013;

² En cuyo caso se denomina como micorremediación.



Working Papers 2022

Kaldorf et al., 1999; Miransari, 2011; Redon et al., 2009) entre otros factores ambientales (Chen et al., 2003; Leung et al., 2010; Ultra et al., 2006)

Por su parte, la contribución de la simbiosis micorrícica frente al déficit hídrico se debe a una combinación de efectos nutricionales, físicos y celulares (Ruiz-Lozano, 2003), los cuales permiten la evasión al déficit hídrico (Augé, 2001). Los mecanismos que pueden explicar el efecto de la colonización de las raíces en el comportamiento de la planta durante el déficit hídrico incluyen: i) modificación de las relaciones hormonales de la planta (Estrada-Luna & Davies, 2003), ii) mejoramiento del estatus hídrico de la planta por un aumento en la conductividad hidráulica asociado con la absorción de agua por las hifas externas (Augé et al., 2003, 2007; Kyllö et al., 2003; Porcel et al., 2003), y por el ajuste osmótico de la planta (Porcel & Ruiz-Lozano, 2004; Ruiz-Lozano, 2003; Q.-S. Wu & Xia, 2006), iii) incremento en la actividad antioxidante de la planta (Goicoechea et al., 2005) y iv) aumento en la absorción de nutrientes de la planta (Al-Karaki, 2006).

Consecuentemente, dos factores pueden llegar a ser determinantes en las futuras estrategias de fitorremediación y/o mitigación de suelos contaminados por cadmio utilizando hongos FMA: i) la obtención de resultados favorables en la tolerancia al estrés por metales pesados (Mittler et al., 2004) y por déficit hídrico (Aroca, 2012) y ii) las recientemente descubiertas habilidades de segregación e intercambio genético en el hongo FMA *Rhizophagus irregularis* (Angelard et al., 2010; Angelard & Sanders, 2011), especie que ha sido utilizado en numerosas investigaciones para evaluar la tolerancia a metales pesados y a estrés por déficit hídrico pero de la cual, hasta el momento se tiene poca información acerca del efecto de la variación entre líneas monospóricas genéticamente diferentes con respecto a la respuesta de sus plantas hospederas a estos estreses.

En consideración a lo anteriormente expuesto la pregunta de investigación que se desea resolver es ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd en condiciones de déficit hídrico?



Working Papers 2022

Para responder a esta pregunta fue necesario retomar los resultados obtenidos en los capítulos uno y dos en los que se estableció el porcentaje de humedad del sustrato que induce estrés por déficit hídrico no letal, así como la concentración de Cd que permite apreciar diferencias fisiológicas en plantas de cacao inoculadas con el hongo FMA *R. irregularis*.

Adicionalmente, en el presente documento fue necesario abordar dos preguntas previas, i) ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en un medio enriquecido con Cd? y ii) ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al déficit hídrico? La respuesta a estas preguntas permitió determinar las líneas monospóricas que inducen respuestas contrastantes de sus plantas de cacao hospederas del HFMA *R. irregularis* frente al estrés por déficit hídrico y al estrés por Cd, de forma independiente.

METODOLOGÍA

Se desarrollaron tres ensayos dirigidos a responder las tres preguntas mencionadas previamente. A continuación, se describen los aspectos comunes a los tres ensayos y posteriormente las particularidades de cada uno. El lugar de realización de los ensayos fue un vivero del Campus Utopía de la Universidad de La Salle, sede Yopal, ubicado en la Hacienda San José de Mate'pantano con coordenadas 5° 19' 31,5" de latitud norte y 72° 17' 47,6" de longitud oeste. Este lugar cuenta con una temperatura promedio de 25,47 °C, humedad relativa promedio de 84%, punto de rocío promedio de 22,36 °C y una radiación promedio de 4,5 kWh/m² (COLOMBIA. Ministerio de Minas y Energía -Unidad de Planeación Minero Energética (UPME) y Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - Instituto de Hidrología, 2005). Los valores en tiempo real se presentan en <http://www.weatherlink.com/user/utopia/index.php?view=main&headers=1>.

Se utilizó semilla de cacao del genotipo IMC67 como fuente de material vegetal debido a que en Colombia solo se permiten semillas obtenidas de plantaciones híbridas cruce de este material según acuerdo 003 del Consejo Nacional Cacaotero en 2010.



Working Papers 2022

Las semillas de cacao se sembraron previamente en una cama con sustrato compuesto por una proporción de 1:1 de compost y arena con base en ensayos previos y siguiendo el manejo de productores de la zona. Dos semanas después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a bolsas de 15 x 35 cm con sustrato igual al previamente descrito. Se realizó una fertilización foliar con fertilizante comercial Nutrifoliar® y una edáfica a los 30 días después de siembra (DDS) utilizando la dosis sugerida por Fernández, Bohórquez, & Rodríguez, (2016). Las plagas, enfermedades y malezas se manejaron de forma manual o química según presencia, incidencia y severidad y homogéneamente para todas las plantas del ensayo.

La especie de hongo FMA utilizado fue *Rhizophagus irregularis*, previamente descrito como *Glomus intraradices* (Stockinger et al., 2009). El material fúngico para los ensayos uno y dos estuvo constituido por las siguientes líneas monospóricas seleccionadas a partir de los resultados obtenidos por Ropars et al., (2016) y Wyss, Masclaux, Rosikiewicz, Pagni, & Sanders, (2016). Este material fúngico ha sido previamente caracterizado genéticamente y sus diferencias se reportan en (Angelard et al., 2010, 2014; Angelard & Sanders, 2011; Croll et al., 2008; Wyss et al., 2016). Algunas líneas monospóricas fueron obtenidas de un campo en Tanikon (Suiza) (Koch et al., 2004), otras son líneas monospóricas segregantes de las anteriores. A continuación, se describen sus características genéticas más relevantes:

Identificación de la línea	Línea parental	Variabilidad genética	Nucleo(s)
A1	Si	Baja	Monocarionte
A5	Si	Alta	Dicarionte
C2	Si	Media	Monocarionte
C3	Si	Alta	Dicarionte
Z15	C3	nd.	nd.
Z25	A1	nd.	nd.
X38	C2	nd.	nd.

El material fúngico fue amablemente suministrado por el Profesor Ian Sanders, líder del Grupo de investigación en “Ecology and Evolution of Symbiotic Organisms” del Departamento de “Ecology and Evolution” - Universidad de Lausana (Suiza). Las líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* fueron producidas bajo condiciones estériles *in vitro* en cultivo monoxénico (Bécard & Fortin, 1988) del que se



Working Papers 2022

extrajeron esporas limpias y se mezclaron con un portador inerte de diatomita previamente esterilizado con calor a 121 ° C durante 30 minutos antes de mezclarlo. Este proceso fue realizado por la compañía Symbiom® en un proceso idéntico en la producción de inóculo comercial de hongos formadores de micorrizas que realiza la empresa.

Las líneas monospóricas utilizadas en el ensayo tres se seleccionaron a partir de los dos ensayos previos. La identidad de las líneas monospóricas y los detalles de la selección se presentan en la descripción de cada ensayo.

A continuación, se describen las particularidades de cada uno de los tres ensayos que componen el presente capítulo.

Experimento 1: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en un medio enriquecido con Cd?

Establecimiento del ensayo:

Se estableció un diseño de bloques completamente aleatorizado con cuatro repeticiones considerando dos plantas por unidad experimental y con arreglo factorial 2x8. El primer factor estuvo constituido por la adición de Cd al sustrato. Los niveles de este factor fueron Cd+ (24 mg.kg⁻¹) y Cd- (0 mg.kg⁻¹). De forma previa al trasplante, se adicionó una concentración de Cd con el propósito de obtener la concentración deseada de Cd. Adicionalmente el sustrato se dejó en reposo durante dos semanas para lograr estabilización de la muestra en cuanto a estructura microbiana y fraccionamiento de iones metálicos. El segundo factor estuvo constituido por la inoculación con las líneas monospóricas de *R. irregularis*. Los niveles de este primer factor fueron las siguientes líneas monospóricas: A1, A5, C2, C3, Z15, Z25, X38 y el control sin inoculación. La inoculación se llevó a cabo una semana después del trasplante.

Experimento 2: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al déficit hídrico?



Working Papers 2022

Establecimiento del ensayo:

Se estableció un diseño de bloques completamente aleatorizado con cuatro repeticiones considerando dos plantas por unidad experimental y con arreglo factorial 2x8. El primer factor es el déficit hídrico (con déficit y sin déficit). El déficit hídrico correspondió a una humedad volumétrica de 11,7% (potencial mátrico del sustrato -1,5 MPa) en tanto que la ausencia de déficit hídrico correspondió a una humedad volumétrica de 16,5% (potencial mátrico del sustrato -0,033 MPa) o superior sin llegar a la saturación (Figura S 6.1). La humedad volumétrica se midió con una sonda tipo HH2 Delta T (Devices Ltd). El segundo factor estuvo constituido por la inoculación con las líneas monospóricas de *R. irregularis*. Los niveles de este primer factor fueron las siguientes líneas monospóricas: A1, A5, C2, C3, Z15, Z25, X38 y el control sin inoculación. La inoculación se llevó a cabo una semana después del trasplante y la restricción de riego dos semanas después del trasplante.

Experimento 3: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd en condiciones de déficit hídrico?

Establecimiento del ensayo:

Se estableció un diseño de bloques completamente aleatorizado con cuatro repeticiones considerando dos plantas por unidad experimental y con arreglo factorial 4x4. El primer factor estuvo constituido por el estrés. Los niveles de este factor fueron: estrés por Cd+ (36 mg/kg), estrés hídrico (potencial mátrico del sustrato -1,5 MPa), estrés combinado (estrés por Cd y estrés hídrico) y no estrés (Cd-0 mg.kg⁻¹ y potencial mátrico del sustrato -0,3 MPa). El segundo factor estuvo constituido por la inoculación con las líneas monospóricas de *R. irregularis*. Los niveles de este segundo factor fueron las siguientes líneas monospóricas: C2, C3, X38 y el control sin inoculación.

Las plantas utilizadas en este experimento fueron crecidas durante 12 semanas previas a la aplicación de los tratamientos. Se adicionó una concentración de Cd sobre el sustrato que contenía las plantas con el propósito de obtener la concentración deseada de Cd. La restricción de riego comenzó de forma simultánea a la adición de Cd hasta lograr el potencial mátrico deseado, tiempo en el cual se adicionó el agua suficiente para mantenerlo en este nivel. La humedad volumétrica se midió con una sonda tipo HH2 Delta T (Devices Ltd®).

Los parámetros fisiológicos se evaluaron fueron los siguientes:



Working Papers 2022

Potencial hídrico foliar (Ensayos uno y tres): Para su medición se utilizó una cámara de presión Scholander (PMS Instrument comp.®). Cada medición se efectuó en hojas saludables completamente expandidas en la parte central de la planta. Se realizó una lectura (por hoja) a una hoja por planta en cuatro plantas por tratamiento de acuerdo con protocolo Scholander et al. (1965).

Conductancia estomática (Ensayo tres): Para su medición se utilizó un porómetro CS-1 Decagon Devices®. Cada medición se efectuó en hojas saludables completamente expandidas en la parte central de la planta. Se realizó una lectura (por hoja) a una hoja por planta en cuatro plantas por tratamiento de acuerdo a protocolo de fábrica (Decagon device, 2016).

Índice de contenido de clorofilas (ICC) (Ensayo tres): Para su medición se utilizó un clorofilómetro CM-1000 Spectrum, USA®. Cada medición se efectuó en hojas saludables completamente expandida en la parte central de la planta. Se realizaron 2 lecturas por hoja a 2 hojas por planta en ocho plantas por tratamiento y la lectura se hizo en el centro de la lámina foliar evitando la nervadura central de acuerdo a (Parry et al., 2014).

Fluorescencia de la clorofila (Ensayos uno y dos): Para la determinación de fluorescencia se utilizó un fluorómetro no modulado Handy PEA Hansatech® a $3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron en dos hojas por plantas y en 4 plantas por tratamiento. Se calcularon el rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia mínima (F_v/F_o), el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria ($\phi(P_o)$), la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A ($\psi(E_o)$), la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A ($\phi(E_o)$), la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón hasta su aceptor final en el PSI^3 ($\delta(R_o)$), la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón hasta su aceptor final en el PSI ($\phi(R_o)$), el índice de vitalidad o funcionamiento con base en la absorción de energía (P_{abs}) y el índice de vitalidad o funcionamiento total (PI_{total}) (Strasser et al., 2004).

Crecimiento: Se midió la altura de planta, el número de hojas, la biomasa seca total, por órganos, biomasa de la parte aérea (PA), la relación raíz/PA (experimentos uno, dos y tres 3), la longitud de raíz y la longitud específica de la raíz (LER), calculada como el cociente entre la longitud y el peso de la raíz (experimentos uno y dos). Para su determinación las muestras vegetales fueron sometidas a 70°C por 24 horas o hasta peso constante. También se determinó el área foliar (experimento tres) utilizando un

³ NADPH.



Working Papers 2022

medidor de área foliar LI-COR LI-3100. Dado el carácter destructivo se realizó la medición de este parámetro en el último muestreo de cada ensayo en ocho plantas por tratamiento.

Cd (Experimentos 1 y 3): La concentración de Cd a nivel de planta se determinó en su raíz y en su parte aérea. A nivel del sustrato, se determinó la concentración de Cd total (Cdt) y disponible (Cdd) en el laboratorio de Aguas y Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Con base en estos datos se calcularon valores adicionales de extracción a nivel de raíz y de PA (resultado de la multiplicación de la concentración por la biomasa del órgano correspondiente), eficiencia en la absorción (Eabs) (cociente entre la cantidad de Cd en la planta y la materia seca de la raíz) (Wang et al., 2007), eficiencia en la translocación ($E_{tr_{tot}}$) (cociente entre la concentración de Cd en la parte aérea y la de toda la planta) (Hu et al., 2013; Wang et al., 2007), eficiencia en la translocación ($E_{tr_{raiz}}$) (cociente entre la concentración de Cd en la parte y la de raíz (Stoltz & Greger, 2002) y factor de concentración biológica (FCB) con base en Cdt y Cdd (cociente entre la concentración de Cd en la planta y la del suelo (Hassan et al., 2013).

Colonización radical (Experimentos uno, dos y tres): Su determinación se realizó en el último muestreo de cada ensayo en 8 plantas por tratamiento. Se seleccionaron raíces de menos de 2 cm de diámetro y se lavaron con abundante agua. Posteriormente, se realizó una tinción del micelio de los hongos en estas raíces con tinta Sheaffer según el protocolo modificado de (Vierheilig et al., 1998). Luego de la tinción de las raíces se evaluó el porcentaje de colonización utilizando el método de intersección de la grilla (Giovannetti & Mosse, 1980).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los ensayos uno y dos, se realizaron tres muestreos para los parámetros de fluorescencia en las semanas cuatro, siete y diez después de transplante (DDT) y en la semana 10 para los demás parámetros. En el ensayo 3, se realizó un único muestreo de los parámetros fisiológicos en la semana cuatro después del establecimiento de los tratamientos (16 semanas después de siembra). Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP® (Statistical Analysis Systems Institute, versión 11). Previo al ANOVA, se verificaron todos los datos por normalidad y homocedasticidad. Cuando fue necesario, las variables se transformaron usando funciones logarítmicas o trigonométricas. Los efectos principales



Working Papers 2022

(factores) y su interacción se analizaron con un ANOVA de dos vías; luego se realizaron comparaciones *post hoc* utilizando una prueba de Tukey HSD. Se utilizó un ANOVA de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de valor Z *post-hoc*, para analizar variables que no cumplieran con los supuestos de ANOVA incluso después de la transformación (Doubková et al., 2013).

Para la evaluación funcional de las líneas monospóricas de *R. irregularis* en los experimentos 1 y 2, se calcularon índices de tolerancia para parámetros únicos y para parámetros múltiples según metodología modificada de She et al., (2011):

El índice de tolerancia para un único parámetro (IT_{up}) se calculó según la siguiente fórmula:

$$IT = \frac{\text{Valor del parámetro con estrés} *}{\text{Valor del parámetro sin estrés} *}$$

*: Con un nivel de déficit hídrico o con un nivel de cadmio.

El índice de tolerancia para múltiples parámetros (IT_{mp}) se calculó según las siguientes fórmulas:

$$\hat{X}_{ij} = \frac{X_{ij} - X_{j,min}}{X_{j,max} - X_{j,min}}$$

Donde:

\hat{X}_{ij} : Función dependiente del valor del j ésimo parámetro en la i ésima línea monospórica

X_{ij} : Es el valor observado del j ésimo parámetro en la i ésima línea monospórica

$X_{j,min}$: Es el mínimo valor del j ésimo parámetro

$X_{j,max}$: Es el máximo valor del j ésimo parámetro

$$\bar{X} = \sum_{j=1}^n \hat{X}_{ij} / n$$

Donde:

\bar{X} : Función media dependiente

n : Número de parámetros

Finalmente, se seleccionaron las líneas monospóricas de *R. irregularis* con mayor contraste para su evaluación en el experimento 3.



Working Papers 2022

RESULTADOS

Experimento 1: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en un medio enriquecido con Cd?

Todos los parámetros asociados con la producción de biomasa en las plantas de cacao, a excepción de la relación raíz/PA y la LER, disminuyeron significativamente en respuesta a la adición de Cd al sustrato (Tabla 6.1). Se observó una disminución de 20,10% en la longitud de la raíz en tanto que la disminución promedio de la biomasa total por planta fue de 39,49%. La restricción del crecimiento fue mayor en las hojas (47,13%) que en el tallo (33,76%) y en la parte aérea (PA) (42,19%) que en la raíz (25,76%). En contraste, la relación raíz/PA se incrementó en un 26,86% y la LER en 10,64% con la adición de Cd al sustrato de siembra.



Working Papers 2022

Tabla 1. Efecto del Cd y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.

Parametro	Cd	Orden	Genotipo HFMA	Orden
Long. Raíz ^b	24,78***	Sin Cd>Con Cd	0,37	---
PS Raíz	47,65***	Sin Cd>Con Cd	0,20ns	---
PS Tallo ^a	53,55***	Sin Cd>Con Cd	3,33ns	---
PS Hojas ^f	338,28***	Sin Cd>Con Cd	2,94*	A1=C2=Z15=Z25=X38=A5≥C3≥no inoculación
PSTot ^f	197,41***	Sin Cd>Con Cd	1,31ns	---
PSPA	248,98***	Sin Cd>Con Cd	1,82ns	---
Raíz/PA	17,34***	Con Cd>Sin Cd	1,16ns	---
LER ^a	5,50*	Con Cd>Sin Cd	6,94ns	---
Raíz-ITCd by line		N/A	1,62ns	---
Raíz-ITline		N/A	0,90ns	---
Tallo-ITCd by line		N/A	2,24ns	---
Tallo-ITline		N/A	0,65ns	---
Hojas-ITCd by line		N/A	2,02ns	---
Hojas-ITline		N/A	0,84ns	---
Total-ITCd by line		N/A	3,22*	No inoculación=Z15=A5≥Z25=A1=C3=C2=X38
Total-ITline		N/A	1,03ns	---
PA-ITCd by line		N/A	2,87*	No inoculación≥A5=Z15≥Z25≥C3=A1≥C2=X38
PA-ITline		N/A	0,48ns	---
Concentración de Cd - Raíz (mg/Kg) ^a	34,12***	Con Cd>Sin Cd	14,34*	A1=C3=C2≥Z15=Z25=A5≥X38≥no inoculación
Concentración de Cd - PA (mg/kg) ^a	51,27***	Con Cd>Sin Cd	4,68ns	---
Extracción de Cd - Raíz (mg) ^a	30,54***	Con Cd>Sin Cd	8,61ns	---
Extracción de Cd - PA (mg) ^a	37,14***	Con Cd>Sin Cd	2,77ns	---
Extracción de Cd - Total (mg) ^a	41,47***	Con Cd>Sin Cd	2,97ns	---
Concentración de Cd - Total (mg/Kg) ^a	58,69***	Con Cd>Sin Cd	5,06ns	---
Eabs ^a	38,68***	Con Cd>Sin Cd	6,26ns	---
Etrs ^{tot. a}	1,22ns	---	3,16ns	---
Etrs ^{raíz a}	4,54*	Sin Cd>Con Cd	4,74ns	---
Cdt. (mg/Kg)	81,74***	Con Cd>Sin Cd	4,76ns	---
Cdd. (mg/Kg)	567,62***	Con Cd>Sin Cd	1,90ns	---
FCB (Cdt)	0,58ns	---	1,70ns	---
FCB (Cdd)	56,67***	Sin Cd>Con Cd	2,11ns	---
Fv/Fo (4 sdt)	12,73**	Con Cd>Sin Cd	7,20***	X38=no inoc.=Z15=Z25=A1=C2=A5>C3
φ(Po) (4 sdt)	12,47**	Sin Cd>Sin Cd	6,87***	X38=no inoc.=Z25=Z15=A1=A5=C2>C3
ψ(Eo) (4 sdt)	9,07**	Con Cd>Sin Cd	5,52***	X38=Z25=A1=Z15=no inoc.=A5=C2>C3
φ(Eo) (4 sdt)	9,63**	Con Cd>Sin Cd	5,90***	X38=Z25=A1=Z15=no inoc.=C2=A5>C3
δ(Ro) (4 sdt)	17,52***	Sin Cd>Con Cd	3,97**	C3≥C2≥Z15=no inoc.=A1=A5=Z25=X38
φ(Ro) (4 sdt)	2,34ns	---	1,12ns	---
PI abs (4 sdt)	8,28**	Con Cd>Sin Cd	4,38**	C2=Z25=X38=Z15=no inoc.=A1≥A5≥C3
PI total (4 sdt)	2,96ns	---	0,95ns	---
Fv/Fo (7 sdt)	2,47ns	---	2,95*	no inoc.≥Z25=A5=Z15=C3=C2=X38≥A1
φ(Po) (7 sdt)	1,96ns	---	2,48*	no inoc.≥Z25=A5=Z15=C3=C2=X38≥A1
ψ(Eo) (7 sdt)	0,36ns	---	2,02ns	---
φ(Eo) (7 sdt)	1,17ns	---	2,13ns	---
δ(Ro) (7 sdt)	34,32***	Sin Cd>Con Cd	1,79ns	---
φ(Ro) (7 sdt)	57,55***	Sin Cd>Con Cd	1,70ns	---
PI abs (7 sdt)	13,83**	Sin Cd>Con Cd	1,82ns	---
PI total (7 sdt)	46,99***	Sin Cd>Con Cd	2,14*	Z15≥C3=Z25=X38=no inoc.=A5=A1≥C2
Fv/Fo (10 sdt)	94,64***	Sin Cd>Con Cd	2,39*	no inoc.≥X38=Z25=Z15≥A1=C2=A5≥C3
φ(Po) (10 sdt)	71,97***	Sin Cd>Con Cd	1,89ns	---
ψ(Eo) (10 sdt)	50,26***	Sin Cd>Con Cd	1,05ns	---
φ(Eo) (10 sdt)	69,36***	Sin Cd>Con Cd	1,32ns	---
δ(Ro) (10 sdt)	0,01ns	---	1,02ns	---
φ(Ro) (10 sdt)	107,75***	Sin Cd>Con Cd	1,51ns	---
PI abs (10 sdt)	78,93***	Sin Cd>Con Cd	1,62ns	---
PI total (10 sdt)	110,77***	Sin Cd>Con Cd	1,52ns	---
Colonización	0,09	----	1,95ns	----

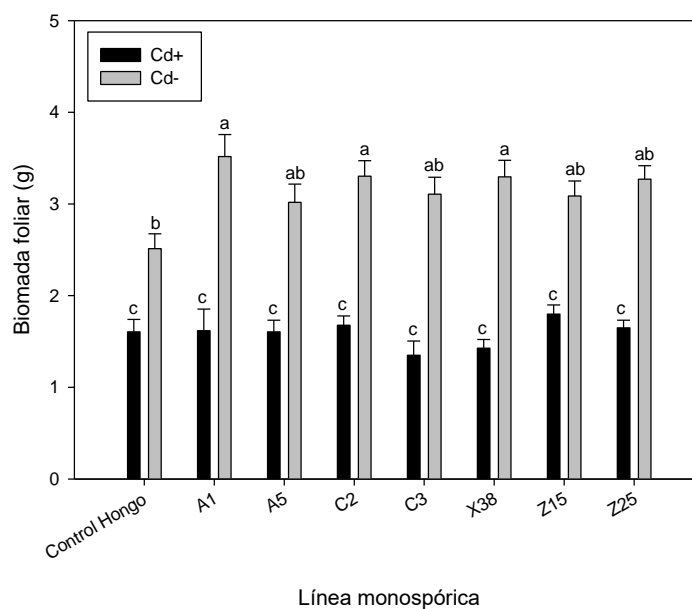
a: análisis no paramétrico
b: Transformación por raíz cuadrada
c: Transformación logarítmica
d: Transformación por coseno
e: Transformación por raíz cúbica
f: Transformación por logaritmo natural
g: Transformación Log (1+x)
h: Transformación por seno
i: Transformación por (1/(1+exp(x)))
ns: No hay significancia
sdt: Semanas después de trasplante
N/A: No aplica



Working Papers 2022

La biomasa foliar varió en respuesta a la inoculación. En general, las plantas que no fueron inoculadas desarrollaron menor biomasa foliar que las que fueron inoculadas, particularmente con los genotipos A1, C2 y X38. No obstante, con la adición de Cd al sustrato la biomasa foliar fue similar en todos los tratamientos, incluyendo el control sin inoculación (Tabla 6.1 y Figura 6.1).

Figura 6.1. Efecto de las diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en la biomasa foliar de plantas de cacao sometidas a Cd.

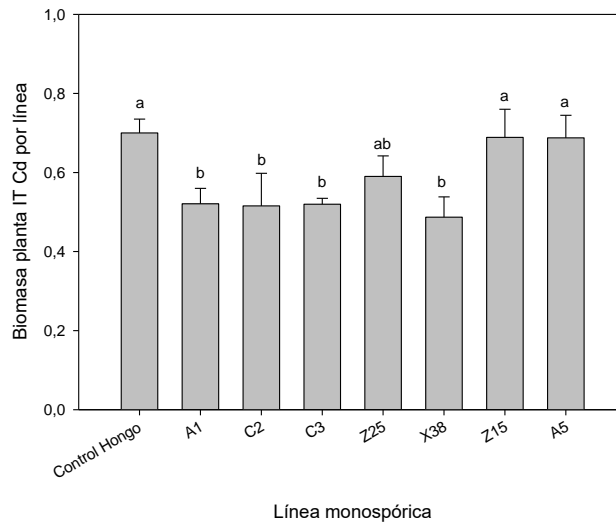


El índice de tolerancia (IT_{up}) con respecto a la biomasa total, fue diferente entre plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA. Como respuesta a la adición de Cd en el sustrato, las plantas inoculadas con líneas A1, C2, C3 y X38 mostraron un menor IT_{up} ($\sim 0,51$), en tanto que mayores IT_{up} se registraron en plantas inoculadas con Z15 y A5 ($\sim 0,65$). Las plantas no inoculadas mostraron el mayor IT_{up} ($\sim 0,70$) sin que este valor fuera significativamente diferente de los de Z15 y A5 (Tabla 6.1 y Figura 6.2).



Working Papers 2022

Figura 2. Índice de tolerancia (IT) individual por cada línea monospórica inoculante de plantas de cacao



Las plantas de cacao tuvieron la capacidad de absorber Cd. La adición de Cd al sustrato de plantas de cacao indujo un incremento altamente significativo en su concentración a nivel de raíz ($151,95 \text{ mg.Kg}^{-1}$), parte aérea ($296,60 \text{ mg.Kg}^{-1}$) y en la planta completa ($266,90 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Lo mismo sucedió con la extracción de Cd ($0,10 \text{ mg}$, $0,84 \text{ mg}$ y $0,94 \text{ mg}$, respectivamente). Por su parte, las plantas sembradas en sustrato sin adición de Cd mostraron en promedio una concentración de $2,07 \text{ mg.Kg}^{-1}$, $8,64 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y $7,44 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y una extracción de $0,002 \text{ mg}$, $0,03 \text{ mg}$ y $0,03 \text{ mg}$, para raíz, parte aérea y planta completa.

La E_{abs} se incrementó, pero la $E_{\text{trs-raíz}}$ disminuyó con la presencia de Cd en el sustrato. En presencia de Cd, las plantas de cacao mostraron en promedio una E_{abs} de $1,42 \text{ mg.g}^{-1}$ y una $E_{\text{trs-raíz}}$ de $2,32$. Mientras que en plantas sin adición de Cd la E_{abs} fue de $0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ y la $E_{\text{trs-raíz}}$ fue de $4,09$.

La concentración de Cd en la raíz fue el único parámetro en el que se observaron diferencias significativas debidas a la inoculación de plantas de cacao con líneas monospóricas diferentes de AMF. Las plantas no inoculadas concentraron menos Cd en su raíz ($96,29 \text{ mg.Kg}^{-1}$) que las inoculadas con las líneas monospóricas C2 ($170,38 \text{ mg.Kg}^{-1}$), C3 ($199,08 \text{ mg.Kg}^{-1}$) y A1 ($182,77 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Las raíces de las



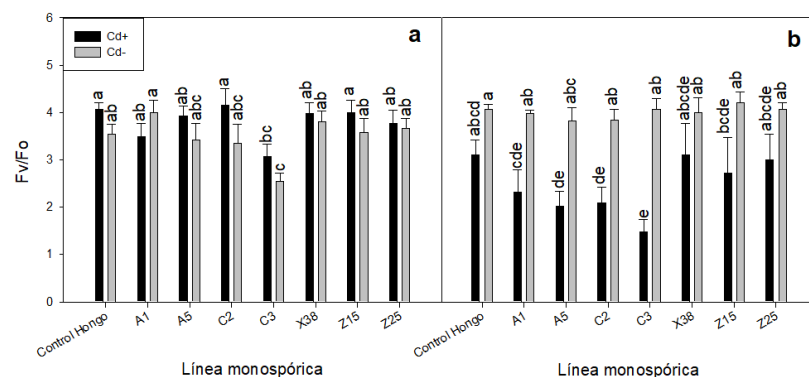
Working Papers 2022

plantas inoculadas con esta última línea concentraron significativamente más Cd que las inoculadas con la línea X38 (131,26 mg.Kg⁻¹).

La concentración total y disponible de Cd en el sustrato fue mayor en aquellos sobre los cuales hubo adición de este metal pesado. El Cdt y Cdd en el sustrato de plantas enriquecidas con Cd fue en promedio de 34,89 mg.Kg⁻¹ y 23,50 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Por su parte, en el sustrato sin enriquecimiento de Cd, el Cdt y Cdd fue en promedio de 0,8 mg.Kg⁻¹ y 0,1 mg.Kg⁻¹, respectivamente (Tabla 6.1). Así, la FCB con base en Cdd fue significativamente menor en sustratos enriquecidos con Cd (11,35) con respecto al control sin Cd (74,43).

Durante el periodo evaluado, el efecto principal de la aplicación de Cd al sustrato de plantas en los parámetros de fluorescencia Fv/Fo, $\phi(Po)$, $\psi(Eo)$, $\phi(Eo)$ y PI_{abs} , cambió radicalmente. Estos cinco parámetros mostraron valores más altos en plantas sometidas a Cd en la semana cuatro después de trasplante (DT), no obstante, en la semana siete DT (PI_{abs}) y en la 10 DT, presentaron los valores más bajos (Tabla 6.1 y Figura 6.3). Por su parte, la adición de Cd al sustrato de plantas de cacao disminuyó los valores de $\delta(Ro)$ desde la semana cuatro DT. También se observó la disminución de $\phi(Ro)$ y PI_{total} en respuesta al Cd solamente en las semanas siete y 10 DT (Tabla 6.1).

Figura 6.3. Eficiencia máxima potencial con base en Fo de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a Cd. A) Muestreo 1 (4 semanas DT) y b)



Muestreo 3 (10 semanas DT).

De forma similar, los parámetros de fluorescencia Fv/Fo, $\phi(Po)$, $\psi(Eo)$, $\phi(Eo)$ y PI_{abs} cambiaron de forma significativa en los diferentes tratamientos de inoculación con líneas monospóricas diferentes de HFMA, particularmente, en la semana cuatro DT. En general, para los parámetros mencionados las plantas



Working Papers 2022

inoculadas con X38 tuvieron los mayores valores y las inoculadas con C3 los menores valores. Por el contrario, los valores de $\delta(Ro)$ mostraron una tendencia opuesta que sólo se observó en la semana cuatro DT (Tabla 6.1).

Con respecto a los parámetros de fluorescencia en general, los efectos principales de la aplicación de Cd al sustrato y de la inoculación de las plantas, cambiaron a lo largo del periodo evaluado. Por esta razón, el índice compuesto de tolerancia (IT) se calculó con y sin estos parámetros. Sin los parámetros de fluorescencia el mayor índice lo obtuvieron las plantas inoculadas con la línea monospórica X38 y el menor, las plantas inoculadas con la línea monospórica C3 (Tabla 6.2). El mismo índice considerando los parámetros de fluorescencia, mostró que las plantas inoculadas con la línea monospórica C2 tuvieron mayores valores mientras que las inoculadas con la línea monospórica A1, los menores (Tabla S 6.2).

Tabla 6.2. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia.

Línea	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	Índice (Promedio)
A1	0,41	0,16	0,51	0,16	0,00	0,24	0,15	0,17	0,00	0,22	0,32	0,92	0,00	0,35	0,29	0,19	0,47	0,60	0,39	0,62	0,13	0,30
A5	0,66	0,00	0,00	0,56	0,25	0,60	0,15	0,23	0,34	0,40	0,04	0,60	0,11	0,92	0,73	0,80	1,00	0,55	0,84	0,91	0,74	0,50
C2	0,00	0,37	0,09	0,28	0,74	0,35	0,66	0,65	0,67	0,44	0,50	1,00	0,57	1,14	1,00	0,55	0,41	0,72	0,59	0,68	0,44	0,56
C3	0,01	0,81	0,57	0,00	0,03	0,41	0,39	0,42	0,01	0,00	0,53	0,92	0,18	0,00	0,32	0,00	0,71	0,00	0,08	0,29	0,00	0,27
X38	0,66	0,74	0,50	0,66	1,00	0,66	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	0,37	0,51	0,00	0,34	0,00	0,00	1,00	0,68
Z15	0,97	1,00	0,37	0,40	0,23	0,00	0,00	0,00	0,28	0,59	0,16	0,78	0,56	0,29	0,79	1,00	0,47	1,00	1,00	1,00	0,83	0,56
Z25	0,51	0,95	0,24	0,61	0,25	0,76	0,18	0,28	0,30	0,31	0,14	0,68	0,75	0,52	0,96	0,70	0,45	0,67	0,57	0,65	0,59	0,53
No inoculación	1,00	0,35	1,00	1,00	0,71	1,00	0,39	0,52	0,82	0,77	0,00	0,00	0,68	0,94	0,00	0,91	0,98	0,82	0,54	0,61	0,94	0,67

- A : LER
- B : Cdt. (mg/Kg)
- C : Cdd. (mg/Kg)
- D : Root Cd (mg/Kg)
- E : Shoot Cd (mg/Kg)
- F : Extracción de Cd -Raíz (mg)
- G : Extracción de Cd -PA (mg)
- H : Extracción de Cd -Total (mg)
- I : Concentración de Cd en Total (mg/Kg)
- J : Eabs
- K : Etrs.(PA/tot)
- L : Etrs.(PA/Raiz)
- N : FCB (Cdt)
- N : FCB (Cdd)
- O : Long. Raiz
- P : PS Raiz
- Q : PS Tallo
- R : PS Hojas
- S : PSTot
- T : PSPA
- U : Raiz/PA

Experimento 2: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al déficit hídrico?

Todos los parámetros asociados con la producción de biomasa en las plantas de cacao, a excepción de la LER, disminuyeron significativamente en respuesta al déficit hídrico (Tabla 6.3). Se observó que las



Working Papers 2022

plantas sometidas a este estrés disminuyeron la longitud de su raíz (11,40%), así como la biomasa en raíz (61,66%), en tallo (58,72%), en hojas (65,30%), en la parte aérea (62,89%) y en la planta total 76,81%. Por su parte, la relación raíz/PA no tuvo una variación significativa.



Working Papers 2022

Tabla 3. Efecto del déficit hídrico y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.

Parametro	Estrés hídrico	Orden	Genotipo HFMA	Orden	Esgrés hídrico x genotipo HFMA
Long. Raíz	7,48*	hidratadas>estresadas	0,59ns	----	0,51ns
PS Raíz	177,46***	hidratadas>estresadas	0,49ns	----	0,48ns
PS Tallo	155,72***	hidratadas>estresadas	0,54ns	----	0,40ns
PS Hojas ^e	636,91***	hidratadas>estresadas	1,33ns	----	1,79ns
PSTot	366,72***	hidratadas>estresadas	1,81ns	----	
PSPA	324,29***	hidratadas>estresadas	1,91ns	----	1,89ns
Raíz/PA	0,96ns		0,82ns	----	1,53ns
LER	104,92***	estresadas>hidratadas	1,92ns	----	2,79*
Potencial hídrico	11,68**	hidratadas>estresadas	0,33ns	----	0,23ns
Raíz-IT Estr. by line	NA	----	1,02ns	----	NA
Raíz-IT line	NA	----	0,53ns	----	NA
Tallo-IT Estr. by line	NA	----	0,39ns	----	NA
Tallo-ITline	NA	----	0,21ns	----	NA
Hojas-IT Estr.by line	NA	----	0,80ns	----	NA
Hojas-ITline	NA	----	0,57ns	----	NA
Total-IT Estr. by line	NA	----	0,57ns	----	NA
Total-ITline	NA	----	0,34ns	----	NA
PA-IT Estr. by line	NA	----	0,56ns	----	NA
PA-ITline	NA	----	0,36ns	----	NA
Fv/Fo (4 sdt)	0,05ns	----	9,25***	X38=A1=Z25=Z15=control=A5=C2>C3	0,94ns
φ(Po) (4 sdt)	0,38ns	----	5,77***	X38=Z25=Z15=A5=control=C2>C3	0,77ns
ψ(Eo) (4 sdt)	2,02ns	----	5,09***	A1=X38=Z25=C2=A5=control=Z15>C3	2,10*
φ(Eo) (4 sdt)	1,94ns	----	6,54***	A1=X38=Z25=C2=A5=control=Z15>C3	1,97ns
δ(Ro) (4 sdt)	1,54ns	----	2,95**	C3>Z15=C2>control=A1=A5=Z25=X38	0,79ns
φ(Ro) (4 sdt)	0,04ns	----	1,12ns	----	1,65ns
PI abs (4 sdt)	5,53*	estresadas>hidratadas	6,15***	A1=X38=Z25=C2=A5=Z15=control>C3	
PI total (4 sdt)	1,86ns	----	0,49ns	----	0,97ns
Fv/Fo (7 sdt)	22,66***	hidratadas>estresadas	1,47ns	----	1,08ns
φ(Po) (7 sdt)	20,26***	hidratadas>estresadas	1,16ns	----	1,37ns
ψ(Eo) (7 sdt)	32,04***	hidratadas>estresadas	2,20*	A5>C3=Z15=A1=Z25=control=X38>C2	0,55ns
φ(Eo) (7 sdt)	35,32***	hidratadas>estresadas	2,22*	A5>C3=Z15=Z5=A1=control=X38>C2	0,58ns
δ(Ro) (7 sdt)	4,33*	estresadas>hidratadas	0,70ns	----	0,43ns
φ(Ro) (7 sdt)	109,04***	hidratadas>estresadas	1,17ns	----	1,03ns
PI abs (7 sdt)	30,02***	hidratadas>estresadas	1,80ns	----	0,99ns
PI total (7 sdt)	63,90***	hidratadas>estresadas	1,32ns	----	2,46*
Fv/Fo (10 sdt)	20,40***	hidratadas>estresadas	2,28*	Z15=A5=C2=control>A1=Z25>X38=C3	3,14**
φ(Po) (10 sdt)	15,06**	hidratadas>estresadas	3,23**	Z15=A5=C2=control>A1>Z25>C3>X38	3,72**
ψ(Eo) (10 sdt)	15,38***	hidratadas>estresadas	1,70ns	----	1,91ns
φ(Eo) (10 sdt)	18,79***	hidratadas>estresadas	1,96ns	----	2,26*
δ(Ro) (10 sdt)	30,61***	hidratadas>estresadas	1,00ns	----	1,43ns
φ(Ro) (10 sdt)	58,61***	hidratadas>estresadas	0,84ns	----	1,98ns
PI abs (10 sdt)	27,06***	hidratadas>estresadas	1,70ns	----	1,59ns
PI total (10 sdt)	58,79***	hidratadas>estresadas	1,06ns	----	1,37ns
Colonización	0,47ns	----	0,70ns	----	1,02ns

a: análisis no paramétrico
 b: Transformación por raíz cuadrada
 c: Transformación logarítmica
 d: Transformación por coseno
 e: Transformación por raíz cúbica
 f: Transformación por logaritmo natural
 g: Transformación Log (1+x)
 h: Transformación por seno
 i: Transformación por $(1/(1+\exp(x)))$
 ns: No hay significancia
 sdt: Semanas después de trasplante

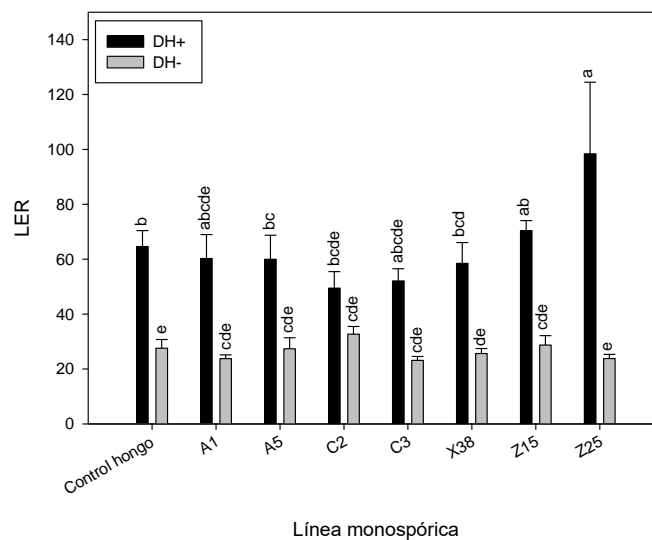
La LER varió en respuesta al déficit hídrico y a su interacción con la inoculación con hongos formadores de micorrizas. En general, la LER aumentó (140,49%) en plantas de cacao sometidas a déficit hídrico y



Working Papers 2022

particularmente en plantas inoculadas con las líneas monospóricas Z25 con respecto a la inoculadas con X38, C2, A5 (Tabla 6.3 y Figura 6.4). Por su parte, el potencial hídrico foliar disminuyó significativamente en 74,08% en plantas sometidas a déficit hídrico (-1,29 MPa) con respecto a las que no lo estuvieron (-0,74 MPa) (Tabla 6.3). No se observó el efecto de la inoculación sobre la variación en el potencial hídrico foliar.

Figura 4. Longitud específica de la raíz con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico.



A partir de la semana siete después de transplante (DT), la mayoría de los parámetros de eficiencia fotosintética calculados a partir de la fluorescencia la clorofila a, fueron significativamente menores en las plantas sometidas a déficit hídrico. Estos parámetros fueron F_v/F_o , $\phi_i(P_o)$, $\psi_i(E_o)$, $\phi_i(E_o)$, $\phi_i(R_o)$, PI_{tot} y PI_{abs} . No obstante, $\Delta(R_o)$ fue mayor en plantas estresadas en la semana siete DT y cambió a ser mayor en las plantas no sometidas a este estrés en la semana 10 DT (Tabla 6.3). En la semana cuatro DT solamente PI_{abs} fue significativamente mayor en plantas sometidas a déficit hídrico.

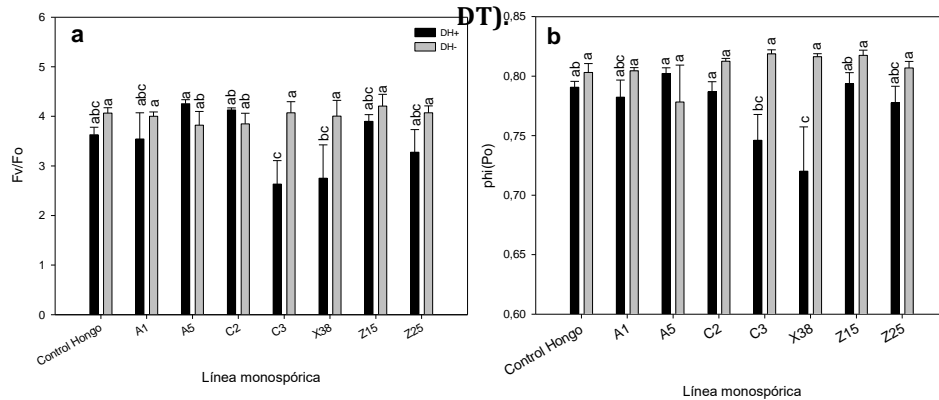
En las semanas siete y 10 DT, algunos parámetros de eficiencia calculados a partir de la fluorescencia de la clorofila a, cambiaron en respuesta a la inoculación con diferentes líneas monospóricas de HFMA. En la semana siete DT, los parámetros $\psi_i(E_o)$ y $\phi_i(E_o)$ fueron menores en las plantas inoculadas con la



Working Papers 2022

línea monospórica C2 con respecto a las inoculadas con A5. En la semana 10 DT, los parámetros F_v/F_o y $\phi_i(P_o)$ fueron menores en las plantas inoculadas con las líneas X38 y C3 con respecto a las inoculadas con Z15, A5, C2 y a las no inoculadas (Figura 6.5a-b).

Figura 5. Eficiencia máxima potencial con base en F_o y $\phi_i(P_o)$ de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico (Semana 10 DT)



Debido a que los parámetros de fluorescencia variaron en el tiempo, el índice de tolerancia (IT) compuesto se calculó con y sin estos parámetros. Sin los parámetros de fluorescencia el mayor índice lo obtuvieron las plantas inoculadas con la línea monospórica X38 y el menor, las plantas inoculadas con la línea monospórica C3 (Tabla 6.4). El mismo índice considerando los parámetros de fluorescencia, mostró que las plantas inoculadas con la línea monospórica C2 tuvieron mayores valores mientras que las inoculadas con la línea monospórica C3, los menores (Tabla S 6.3).



Working Papers 2022

Tabla 4. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia.

Líneas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Índice (Promedio)
A1	0,78	0,43	0,88	0,72	0,20	0,23	0,22	0,17	0,82	0,49
A5	0,79	0,51	0,04	0,27	0,43	0,04	0,01	0,09	0,66	0,31
C2	1,00	0,69	0,20	1,00	0,78	0,45	0,64	0,52	1,00	0,70
C3	0,95	0,17	0,00	0,54	0,21	0,00	0,00	0,00	0,76	0,29
X38	0,82	0,00	0,65	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	0,29	0,72
Z15	0,57	1,00	0,58	0,00	0,19	0,31	0,05	0,23	0,24	0,35
Z25	0,00	0,69	1,00	0,06	0,00	0,64	0,26	0,42	0,00	0,34
No inoculación	0,78	0,11	0,65	0,66	0,23	0,72	0,54	0,54	0,51	0,53

A : LER
B : Pot. Hídrico
C : Long. Raíz
D : PS Raíz
E : PS Tallo
F : PS Hojas
G : PSTot
H : PSPA
I : Raíz/PA



Working Papers 2022

Experimento 3: ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd en condiciones de déficit hídrico?

Durante el periodo evaluado, el diámetro y la biomasa del tallo de las plantas de cacao disminuyeron principalmente al estrés por déficit hídrico y al estrés combinado, respectivamente. Las plantas de cacao sin estrés tuvieron un diámetro de tallo de 6,68 mm en promedio. Este valor no varió cuando las plantas estuvieron sometidas a Cd, pero si lo hizo al someter las plantas a estrés combinado (8,24%) y déficit hídrico (12,20%). Este último estrés indujo la disminución del diámetro de forma significativa (Tabla 6.5). La biomasa del tallo de plantas de cacao sin estrés (2,54g) no tuvo diferencias significativas con la de plantas de cacao sometidas a Cd o a déficit hídrico. Por el contrario, el estrés combinado indujo una reducción significativa de 8,05%.

Tabla 6.5. Efecto del estrés combinado y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.

Parametro	Estrés	Orden	Genotipo HFMA	Orden	Estrés x genotipo HFMA
Altura de la planta (cm)	0,99ns	---	1,28ns	---	0,13ns
Diámetro del tallo (mm)	4,80*	Cd=No estrés>estrés combinado>déficit hídrico	0,28ns	---	0,44ns
Peso seco del tallo ^a	7,18*	Cd=No estrés>déficit hídrico>estrés combinado	1,05ns	---	0,85ns
Peso seco de la raíz	2,93*	No estrés>Cd=estrés combinado>déficit hídrico	0,52ns	---	1,33ns
Peso seco foliar	0,65ns	---	0,45ns	---	0,56ns
Peso seco parte aérea	0,31ns	---	0,17ns	---	0,50ns
Peso seco total	0,56ns	---	0,19ns	---	0,48ns
Relación raíz/parte aérea	2,06ns	---	0,53ns	---	1,23ns
Índice de clorofila	2,39ns	---	3,26*	X38>C3=C2>no inoc.	2,29*
Área foliar (cm ²)	0,29ns	---	0,39ns	---	0,38ns
Temperatura (°C) ^a	31,02***	Estrés combinado=déficit hídrico>Cd=no estrés	0,06ns	---	---
Conductancia estomática ^c	37,26***	No estrés=Cd>déficit hídrico=estrés combinado	2,05ns	---	0,62ns
Potencial hídrico foliar	7,17**	No estrés=Cd>estrés combinado=déficit hídrico	0,05ns	---	0,95ns
Permeabilidad de la membrana	0,76ns	---	4,44**	No inoc.>C3>C2>X38	2,47*
Conc. Cd PA (mg.Kg ⁻¹) ^a	25,97***	Cd=estrés combinado>déficit hídrico=no estrés	1,10ns	---	---
Conc. Cd Raíz (mg.Kg ⁻¹) ^a	37,59***	Estrés combinado>Cd>no estrés=déficit hídrico	0,69ns	---	---
Etrs raíz ^a	36,1***	Déficit hídrico=no estrés>estrés Cd>estrés combinado	---	---	---
Cdt (mg.Kg ⁻¹) ^a	72,38***	Estrés combinado=Cd>no estrés=déficit hídrico	2,22ns	---	---
Cdd (mg.Kg ⁻¹) ^a	76,40***	Estrés combinado=Cd>no estrés=déficit hídrico	1,89ns	---	---
Colonización	0,33ns	---	0,16ns	---	0,57ns

a: análisis no paramétrico
 b: Transformación por raíz cuadrada
 c: Transformación logarítmica
 d: Transformación por coseno
 e: Transformación por raíz cúbica
 f: Transformación por logaritmo natural
 g: Transformación Log (1+x)
 h: Transformación por seno
 i: Transformación por (1/(1+exp(x)))
 ns: No hay significancia

La conductancia estomática, el potencial hídrico y la biomasa de raíz tuvieron un patrón similar de respuesta en tanto que la temperatura foliar el patrón contrario. La temperatura promedio de las hojas de cacao bajo las condiciones de estudio descritas, fue de 26,58 °C la cual se incrementó de forma



Working Papers 2022

significativa con el estrés combinado (7,06%) y el déficit hídrico (5,87%) pero no por el Cd (1,32%). La conductancia estomática que, en hojas de cacao sin estrés fue de (56,06 s.m²), disminuyó significativamente en estrés combinado (71,35%) y en déficit hídrico (69,53%) pero no por con Cd (9,38%). El potencial hídrico foliar en las plantas sin estrés fue de -0,59 MPa pero disminuyó significativamente en estrés combinado (39,68%) y en déficit hídrico (37,71%) pero no por Cd (3,70%) (Tabla 6.5).

La concentración de Cd a nivel de la parte aérea y de raíz fue mayor en plantas de cacao sometidas a estrés combinado y a Cd. A nivel de la parte aérea, las plantas sometidas a estrés combinado y a Cd, tuvieron una concentración de 8,85 mg.Kg⁻¹ y 9,41mg.Kg⁻¹, respectivamente; en contraste, las plantas sometidas a estrés por déficit hídrico o a ningún estrés tuvieron una concentración de 4,62 mg.Kg⁻¹ y 3,55mg.Kg⁻¹, respectivamente. A nivel de raíz, las plantas sometidas a estrés combinado y a Cd, tuvieron una concentración de 366,09 mg.Kg⁻¹ y 148,31mg.Kg⁻¹, respectivamente; en contraste, las plantas sometidas a estrés por déficit hídrico o a ningún estrés tuvieron una concentración de 3,12 mg.Kg⁻¹ y 3,40mg.Kg⁻¹, respectivamente (Tabla 6.5). Así, la Etrs_{raíz} fue de 1,59 para plantas en déficit hídrico, de 1,18 para plantas sin estrés, de 0,14 para plantas con Cd y de 0,03 para plantas con estrés combinado.

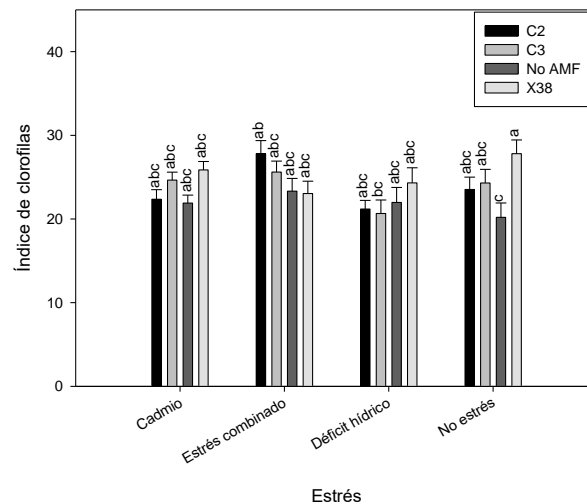
La concentración de Cd total (Cdt) y Cadmio disponible (Cdd) en sustrato fue mayor en los sustratos enriquecidos con Cd. Los sustratos a los cuales se les adicionó Cd, sólo o combinado con el estrés por déficit hídrico, tuvieron una concentración de Cdt de 28,84 mg.Kg⁻¹ y 35,23 mg.Kg⁻¹, respectivamente; en contraste, la concentración de Cdt en el sustrato de plantas con estrés por déficit hídrico o sin estrés fue de 0,8 mg.Kg⁻¹ en ambos casos. La concentración de Cdd en el sustrato de plantas sometidas a estrés por Cd o combinado fue de 27,11 mg.Kg⁻¹ y 30,31 mg.Kg⁻¹, respectivamente; por su parte, los sustratos a los que no se les adicionó Cd, tuvieron una concentración de Cdd de 0,1 mg.Kg⁻¹.

El índice de clorofila y la permeabilidad de membrana de plantas de cacao varió entre los tratamientos de forma estadísticamente significativa, pero con patrones opuestos. Las plantas de cacao inoculadas con la línea monospórica X38 tuvieron un mayor índice de clorofila que las plantas no inoculadas a diferencia de las inoculadas con C2 y C3. En contraste, las plantas no inoculadas y las inoculadas con las líneas C2 y C3 mostraron mayor permeabilidad de membrana que las inoculadas con X38 (Tabla 6.5 y Figura 6.6).



Working Papers 2022

Figura 6. Índice de clorofilas de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a estrés combinado.



DISCUSIÓN

La respuesta fisiológica de las plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en un medio enriquecido con Cd se caracterizó por la modificación del crecimiento, modulación de la capacidad de absorción, translocación y concentración de Cd y de la alteración de desempeño de la fotosíntesis, en la fase fotoquímica.

El Cd indujo modificaciones diferenciales en el crecimiento de los órganos de la misma planta de cacao, de hecho, el órgano con mayor disminución en crecimiento fueron las hojas. Precisamente la biomasa foliar, fue el parámetro de crecimiento que, en este experimento, resultó más sensible a la inoculación de tres de las líneas monospóricas. Esto indica que el crecimiento foliar de cacao es un parámetro potencialmente sensible para evaluar la respuesta de esta especie al Cd y a la inoculación con HFMA. Sin embargo, en el segundo experimento no se detectaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas a nivel de área foliar pero si un patrón similar, lo que



Working Papers 2022

sugiere la existencia de otros factores que pudieron afectar la simbiosis con HFMA, especialmente, la variabilidad genotípica de las plantas de cacao por cuanto provinieron de semilla sexual.

Adicionalmente, los resultados ponen en evidencia, en primer lugar, que los HFMA utilizados pueden contribuir al aumento de biomasa destinada a la fotosíntesis en condiciones no estresantes y en segundo lugar, que este incremento varía según el genotipo de hongo FMA utilizado. Si se considera que la mayor acumulación de nutrientes en las plantas de cacao se da en las hojas (Fernández et al., 2016) (Anexo A) y que los HFMA contribuyen a la absorción de varios nutrientes esenciales para las plantas (Bucking et al., 2012; S. E. Smith et al., 2011; Sally E Smith & Smith, 2011) es posible que los HFMA indujeran el aumento en la biomasa (Mohammadi et al., 2011), particularmente de las hojas. Así, los resultados podrían constituirse como una evidencia de la variabilidad funcional de los HFMA en plantas de cacao.

De otra parte, en condiciones de estrés por Cd, los valores de biomasa foliar entre plantas no inoculadas e inoculadas con las diferentes líneas monospóricas de HFMA fueron similares lo cual indica que el IT_{up} debe ser analizado con precaución en la medida en que las líneas de HFMA que menos estimulen el crecimiento en condiciones no estresantes, podrían parecer mejores al considerar el IT. De hecho, todas las líneas monospóricas de HFMA que estimularon el crecimiento foliar, se encuentran dentro del grupo de HFMA que promovieron un menor IT.

En las plantas sometidas a Cd, este metal se acumuló principalmente en la parte aérea de la planta lo que pudo inducir mayor toxicidad y por lo tanto, menor crecimiento de tallo y hojas como efectivamente se observó. Si bien, la concentración de Cd en los sustratos que no fueron enriquecidos con este metal fue relativamente baja ($0,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$), el rápido crecimiento de las plantas de cacao a nivel de vivero probablemente implicó una rápida absorción de elementos desde el suelo, incluyendo los tóxicos como el Cd, como lo confirma el hecho de que la $E_{\text{tr}}_{\text{raíz}}$ y la FCB (Cdd) fueran mayores en plantas no sometidas a Cd.

Las bolsas utilizadas en el experimento almacenaron 3 Kg de sustrato, es decir, es probable que en cada bolsa hubiera alrededor de 2,4 mg de Cd, lo que puede explicar su extracción (0,03 mg) en las plantas que no fueron sometidas a la adición de Cd en el sustrato. Una vez en la planta, el Cd se transloca hacia



Working Papers 2022

la parte aérea de la planta, sin embargo, la magnitud de la translocación parece variar con la concentración de Cd en el sustrato así, la $E_{\text{trs-raiz}}$ en plantas sin adición de Cd casi duplica a la de las plantas con adición de Cd.

De otra parte, si se considera que el P (macroelemento) tiene una E_{abs} de 18,23 mg.g⁻¹ en cacao (Fernández et al., 2016) y que el Cd es un metal pesado y tóxico, es posible afirmar que el Cd puede ingresar con relativa facilidad a la planta (E_{abs} , 1,42 mg.g⁻¹) cuando el sustrato está enriquecido por este metal.

Las diferencias en la concentración de Cd en la raíz como respuesta a la inoculación de plantas de cacao con diferentes líneas monospóricas de HFMA, describen un patrón similar a las diferencias entre líneas monospóricas de HFMA con respecto a la biomasa foliar de sus plantas hospederas (Tabla 6.1), es decir, los HFMA utilizados pueden contribuir al aumento de la concentración de Cd en la raíz y este incremento puede variar según el genotipo utilizado. Dado que este efecto pudo deberse a la absorción diferencial de nutrientes como se explicó anteriormente, es posible que las líneas monospóricas tengan efectos diferentes sobre la capacidad de la planta para translocar a la parte aérea los elementos nutricionales esenciales para la planta y para restringir parcialmente el de elementos tóxicos como el Cd (González-Guerrero, 2005). No obstante, esta posibilidad es objeto de futuras investigaciones, particularmente dirigidas a la utilización potencial de los HFMA en procesos de fito-estabilización de Cd.

El Cdd constituyó, en el primer experimento, el 67% del Cdt, lo que sugiere que, a consecuencia de la implementación del tiempo de la estabilización de la muestra, parte del Cd adicionado al sustrato se dirigió a otras fracciones del sustrato, tal como se describe en el capítulo segundo de este documento.

Los parámetros de fluorescencia evaluados en este capítulo, corresponden a las relaciones de flujo o eficiencias cuánticas (González Moreno et al., 2008). Cada uno de ellos describe un segmento del conjunto de reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis a través del cual el excitón mueve los electrones (Strasser et al., 2000). Así, el primer segmento está asociado con la oxidación del centro de reacción, es decir, con el atrapamiento de la energía lumínica absorbida o fotoquímica primaria dirigida a la



Working Papers 2022

reducción de la feofitina y la Q_A^4 . Los parámetros asociados a este segmento son el rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia mínima o inicial (F_v/F_o) y el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria ($\varphi(P_o)$).

El segundo segmento está asociado con la eficiencia del transporte de electrones, es decir, con la capacidad de que un excitón absorbido para reducir los aceptores de electrones en el intersistema (PSII-PSI). Los parámetros asociados a este segmento son la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q_A^- ($\psi(E_o)$), la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- ($\varphi(E_o)$).

El tercer segmento está asociado con la capacidad de reducción del aceptor final en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Los parámetros asociados a este segmento son la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón hasta su aceptor final en el PSI⁵ ($\delta(R_o)$) y la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón hasta su aceptor final en el PSI ($\varphi(R_o)$).

Adicionalmente se analizaron otros dos parámetros que integran todos los anteriores. El índice de vitalidad o funcionamiento con base en la absorción de energía (P_{abs}) que incluye: i) la densidad de los centros de reacción completamente activos, ii) la eficiencia del movimiento de electrones por cada excitón atrapado dentro de la cadena de transporte de electrones más allá de la Q_A , y iii) la probabilidad de que un fotón absorbido sea atrapado en el centro de reacción. El índice de vitalidad o funcionamiento total (PI_{total}), por su parte, incluye los anteriores más la eficiencia del excitón para reducir el aceptor final del PSI (Živčák et al., 2008).

De forma interesante, en la semana cuatro DT, las plantas sometidas a Cd, fueron más eficientes desde la absorción de energía lumínica hasta la reducción de los aceptores de electrones en el intersistema. La literatura reporta extensamente los efectos negativos del Cd sobre las plantas, incluyendo sus efectos sobre la fotosíntesis. Pero son pocos los reportes que han explicado las posibles causas de efectos positivos de agentes tóxicos sobre las plantas.

⁴ Quinona A.

⁵ NADPH.



Working Papers 2022

La estimulación de algunos parámetros fisiológicos o de crecimiento han sido previamente reportados principalmente a bajas concentraciones de Cd en tomate (Jing et al., 2005), cebada (F. Wu et al., 2003) y repollo (Paschalidis et al., 2013). Es un fenómeno conocido como hornesis (Barcelo & Poschenrieder, 2002). Según estos autores, la hornesis puede estar asociada a efectos terapéuticos dirigidos a aliviar una enfermedad no detectada, a la disminución de la deficiencia latente de un elemento esencial, a la estimulación de reacciones de defensa dirigiendo a la activación general del metabolismo, al mejoramiento de la nutrición de P y Fe (mayor solubilidad), a alteraciones en la distribución de reguladores de crecimiento y a la prevención de la toxicidad por P, Cu, Mn e H⁺.

Justamente, el pH del sustrato utilizado en estos ensayos, que implementa las mismas prácticas de los productores de la región, indica acidez (Tabla S 6.1), así que es probable que el Cd, al ser un catión divalente hubiera contribuido inicialmente a reducir la superficie celular cargada negativamente y consecuentemente a reducir la actividad del H⁺ en la superficie de la membrana celular de forma similar a lo propuesto como explicación para la hornesis en Al³⁺ (Kinraide, 1994).

En contraste, la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón hasta su aceptor final en el PSI δ(Ro), a diferencia de los otros parámetros, fue menor en plantas sometidas a Cd desde la cuarta DT y en los muestreos sucesivos. Esto sugiere que el efecto tóxico del Cd sobre la fotosíntesis en su fase fotoquímica comienza con el bloqueo del flujo electrónico dirigido a la reducción de NADPH y posteriormente del CO₂. La fuerte disminución en el crecimiento de la parte aérea de las plantas de cacao en respuesta a la alta concentración de este metal descritos previamente, podría obedecer a la limitación temprana para reducir el CO₂ a carbohidratos.

En los muestreos posteriores, especialmente en la décima semana DT, el Cd afectó todos los segmentos de la cadena de transporte de electrones que constituyen las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis acentuando su efecto negativo sobre la acumulación de biomasa. De hecho, el Cd es un inhibidor efectivo de la fotosíntesis (Shanying et al., 2017). Estos autores citan numerosas investigaciones que reportan los efectos inhibitorios del Cd sobre la fotosíntesis como disminución de la síntesis de clorofila,



Working Papers 2022

disminución en el tamaño del cloroplasto, inactivación de las enzimas involucradas en la fijación de CO₂, disminución de rubisco, disminución de los complejos cosechadores de luz, del PS I y PSI, disminución del rendimiento cuántico del fotosistema II.

La diferencia en los parámetros de fluorescencia entre los tratamientos de inoculación en la cuarta semana DT, incluyendo el control, indican que las plantas inoculadas con la línea monospórica C3 disminuyeron la eficiencia cuántica y el transporte de electrones en el intersistema (PSII y PSI). No obstante, estas plantas mantuvieron su capacidad para reducir el aceptor final en el PSI.

Se han reportado efectos de los HFMA sobre sus plantas hospederas que van desde el parasitismo hasta la simbiosis mutualista. De hecho, estos efectos pueden depender del genotipo de los dos simbiosiontes, de la presencia de otras plantas u hongos FMA en el sistema (intercambio de recursos), de las condiciones ambientales (estrés) o del ciclo de vida de la planta hospedera (Johnson et al., 1997; Klironomos, 2016; F. A. Smith & Smith, 2013). Este es el primer reporte en el que líneas monospóricas de la misma especie de hongos micorrícicos inducen diferencias en el flujo energético de la fotosíntesis de plantas de cacao en respuesta al Cd. Fernández (2017) (Anexo C), encontró diferencias significativas en el flujo energético de la fotosíntesis de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* en sustrato estéril bajo condiciones de invernadero.

Las plantas de cacao utilizadas en estos experimentos fueron sembradas individualmente en un sustrato no estéril y fueron inoculadas en su etapa de vivero. Este contexto implica que las plantas tienen alta sensibilidad frente a estreses ambientales debido a que carecen de las reservas propias de su especie en edad adulta (Niinemets, 2010). Estas plantas estuvieron expuestas a dos presiones ambientales casi de forma simultánea, el Cd y la inoculación con HFMA. Para este último caso es sabido que los hongos FMA, en condiciones experimentales de campo, pueden inducir un efecto inicialmente negativo de la planta que, luego de cierto tiempo podría cambiar a ser neutro o positivo (Ceballos Rojas, 2016).

Los valores menores de Fv/Fo en las plantas inoculadas con la línea monospórica C3 son un indicador de estrés y posiblemente de un efecto inicialmente negativo de la inoculación con C3 sobre el cacao. Así, es necesario plantearse si existe variabilidad en el beneficio de la inoculación a lo largo del ciclo de vida



Working Papers 2022

de las plantas hospederas. De otra parte, el efecto acumulativo del Cd en estas plantas indujo una disminución aún más fuerte en su eficiencia cuántica. Esto mismo sucedió con las plantas inoculadas con las líneas monospóricas A1, A5 y C2 en la semana 10 DT (Tabla 6.1 y Figura 6.3)

Los únicos parámetros evaluados a lo largo del tiempo fueron los de fluorescencia. Los demás parámetros se evaluaron a partir de la semana 10 DT. De forma interesante, el índice compuesto de tolerancia (IT) sin considerar los parámetros de fluorescencia, señalan a la línea X38 y a la línea C3 como las de mayor y menor desempeño, respectivamente. Estos resultados son consistentes con el desempeño fotosintético a nivel de las reacciones fotoquímicas, observado en la semana cuatro DT. En conjunto, los resultados sugieren que la variabilidad genética de las líneas monospóricas de los HFMA, también pueden implicar variabilidad funcional en respuesta a estrés por Cd.

La respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al déficit hídrico se caracterizó por una disminución del crecimiento general de la planta de cacao y por la alteración del desempeño de la fotosíntesis, en la fase fotoquímica.

En respuesta al déficit hídrico, las plantas de cacao disminuyeron su crecimiento de forma relativamente similar en todos sus órganos. El agua es un constituyente estructural ubicuo en las plantas, adicionalmente participa como solvente y reactante en reacciones bioquímicas en toda la planta (Kirkham, 2005). Así, su deficiencia en plantas de cacao en vivero indujo una disminución significativa en el potencial hídrico apoplástico y afectó el crecimiento de la planta en general. Como se mencionó previamente con el estrés por Cd, en vivero, las plantas son pequeñas y carecen de reservas para hacer frente a condiciones desfavorables. Consecuentemente, el efecto del estrés afectó el crecimiento de toda la planta.

La longitud específica de la raíz (LER) en condiciones de déficit hídrico, al igual que lo sucedido en respuesta al Cd, aumentó. La LER representa una relación entre la unidad estándar de adquisición (longitud de la raíz) sobre la inversión del recurso en esa unidad (masa) (Pérez-Harguindeguy et al., 2013). Según estos autores, se considera que una LER alta implica tasas de adquisición de nutrientes y



Working Papers 2022

agua, y de crecimiento relativo más altas (por unidad de masa seca), pero con menor sobrevivencia que las plantas con baja LER.

Así, el incremento de la LER indica que dentro de los mecanismos de tolerancia al déficit hídrico está el aumentar la eficiencia en la absorción de agua a expensas de la biomasa destinada a la raíz. De otra parte, la interacción significativa entre el déficit hídrico y la inoculación con las diferentes líneas monospóricas de HFMA resultó del aumento de la LER en algunas de estas líneas en condiciones de déficit hídrico, principalmente de la línea Z25.

Finalmente, la falta de significancia estadística en el IT_{up} indica que la disminución en el crecimiento de las plantas sometidas a déficit hídrico fue similar en respuesta a la inoculación de las diferentes líneas monospóricas de HFMA.

La ausencia de un efecto observable de la inoculación de líneas monospóricas diferentes de HFMA sobre la tolerancia de plantas de cacao frente al estrés hídrico no es una evidencia absoluta acerca de la ausencia de variabilidad funcional en este sentido. La razón que hay evidencia reciente que ha demostrado que hay variabilidad en la respuesta de plantas de yuca frente al estrés por déficit hídrico en condiciones de campo, inclusive con algunos de los mismos genotipos utilizados en esta investigación (Peña, en preparación).

En la semana 4 DT, el índice de vitalidad con base en la absorción de energía (PI_{abs}) fue ligeramente mayor en plantas sometidas a déficit hídrico. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en los otros parámetros. Si se considera que la imposición del déficit hídrico sucedió en la semana dos DT, es posible que para el momento de la evaluación (semana cuatro DT), la intensidad del estrés no fuera lo suficientemente alta o que las plantas desplegaron mecanismos iniciales para mantener la eficiencia en el uso del agua (Lozano & Fonseca, 2016) o para conservar el balance entre moléculas antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Alguacil et al., 2006; Caravaca et al., 2005). Luego de la semana cuatro DT, el PI_{abs} fue mayor en las plantas hidratadas indicando que las plantas se estresaron posteriormente.



Working Papers 2022

En los muestreos posteriores, tanto la absorción como el transporte de electrones disminuyeron su eficiencia. La restricción de agua tiene varios efectos sobre la fotosíntesis en su fase fotoquímica. Dentro de estos efectos se encuentra i) la disminución de la fotólisis del agua para donar los electrones destinados a reducir los centros de reacción previamente oxidados, ii) el aumento en la producción de ERO por cuenta de la sobre-exitación del sistema, iii) la pérdida de la estructura nativa de las proteínas y el aumento en la permeabilidad de las membranas causados por las ERO (Gururani et al., 2015; Murata et al., 2012; Pinheiro & Chaves, 2011; Zlatev & Yordanov, 2005). La capacidad para reducir los aceptores finales en el PSI fue mayor en plantas estresadas y sólo se redujo en la semana 10 DT en estas plantas indicando que probablemente en este segmento de la fase fotoquímica de la fotosíntesis hubo un efecto asociado con la tolerancia a la deshidratación como el mantenimiento el balance de especies reactivas de oxígeno (ERO) mencionado previamente.

De forma similar a lo sucedido en el experimento uno de este capítulo, se observó tanto variabilidad en los parámetros de eficiencia fotosintética a nivel de la fase fotoquímica en respuesta a la inoculación con diferentes líneas monospóricas de HFMA, como variabilidad a lo largo del tiempo dentro del marco de medición de esta investigación, lo cual es especialmente interesante en la medida de que el análisis de estos experimentos factoriales permitió ver el efecto principal de la inoculación (y su patrón de variabilidad) a pesar de que el factor estrés (hídrico o por Cd) fuera diferente en cada experimento.

El índice compuesto de tolerancia (IT) sin considerar los parámetros de fluorescencia señaló a las líneas X38 y C3 como las de mayor y menor desempeño, respectivamente. Estas dos líneas también fueron identificadas en el experimento 1. Este resultado es interesante en la medida en que i) si bien no consideran la fluorescencia dentro del cálculo, son coincidentes con la mayoría de parámetros de eficiencia fotosintética a nivel de las reacciones fotoquímicas en la semana cuatro DT, ii) corresponden a respuestas frente a dos estreses diferentes, es decir, deben haber patrones de respuesta similares frente a estreses diferentes y estos patrones pueden ser modulados por la identidad del hongo FMA inoculante; y iii) estos efectos se pudieron apreciar a pesar de que el sustrato no fue estéril y a que no hubo diferencias significativas en la colonización de raíces, lo que sugiere un efecto funcional independiente del porcentaje de colonización. Ceballos et al. (2013) tampoco encontró una relación



Working Papers 2022

significativa entre el porcentaje de colonización de raíces y la funcionalidad de los HFMA inoculados en condiciones de campo.

Al considerar los parámetros de fluorescencia de la semana 10 DT dentro del cálculo del IT_{mp} , tanto en el experimento 1 como en el experimento 2, se observó que la línea monospórica de hongo FMA C2, tuvo el mejor desempeño. Esto sugiere que dentro de los patrones de respuesta frente a los estreses puede haber mecanismos de tolerancia a largo plazo estimulados de forma diferencial por diferentes genotipos de HFMA.

La respuesta fisiológica de las plantas de cacao inoculadas con líneas monospóricas contrastantes de *Rhizophagus irregularis* frente al estrés por Cd en condiciones de déficit hídrico se caracterizó por los efectos negativos en la acumulación de biomasa, por la translocación de Cd en plantas de cacao de forma dependiente a su concentración en el sustrato y por el aparente efecto de la línea monospórica X38 sobre la clorofila y la permeabilidad de membrana.

Dentro de las funciones del agua en la planta, la estructural y la de donador de electrones para la fotosíntesis, son determinantes (Kirkham, 2005). En este experimento, la función estructural, particularmente en lo concerniente al incremento del volumen o expansión celulares pudo afectarse negativamente debido a la ausencia de agua resultando en la disminución del diámetro del tallo. Por su parte, la disminución en la producción de biomasa a nivel de tallo y raíz, estuvo principalmente asociada con el déficit hídrico por cuanto en presencia de Cd, las plantas no presentaron diferencias significativas con respecto a la ausencia de estrés. Consecuentemente, no hay evidencia de una interacción de los estreses manejados bajo las condiciones descritas.

El estado hídrico de las plantas solo disminuyó en los tratamientos que tenían restricción de riego, lo cual es consistente con la disminución de la conductancia estomática, que presentó un patrón similar. Esta disminución se constituye como una limitante estomática de la fotosíntesis, disminuyendo el



Working Papers 2022

ingreso de CO₂ a los cloroplastos para su reducción en el ciclo de Calvin (Dalal & Tripathy, 2018). El resultado de esta limitante es la restricción del crecimiento (Pinheiro & Chaves, 2011) tal como se observó.

De forma similar al experimento uno de este capítulo, el Cd se acumuló más en la raíz o en la parte aérea dependiendo de la concentración del metal en el sustrato. De hecho, el valor de $E_{\text{tr}}_{\text{raíz}}$ en las plantas con adición de Cd o con estrés combinado, estuvo por debajo de 1, mientras que, sin adición de Cd, lo estuvo por encima de 1. Esto indica una respuesta radicalmente diferente de la capacidad de translocación de Cd en la planta dependiendo de su concentración en el sustrato. Este efecto de la concentración de Cd en el sustrato sobre su dinámica en la planta de cacao ya había sido identificado en el experimento uno, pero en el presente experimento es aún más notorio, probablemente porque la concentración de Cd disponible es mayor a razón de que fue adicionado al sustrato con la planta sembrada en él.

El efecto de la inoculación con las líneas contrastantes de HFMA fue coherente con lo hallado en los experimentos 1 y 2 a nivel de parámetros asociados con la bioquímica de la planta. Las plantas inoculadas con la línea monospórica X38, tuvieron un mayor índice de clorofilas, lo que pudo ser resultado de un incremento en la síntesis de clorofilas o a una disminución en la tasa de degradación (Yooyongwech et al., 2016). El patrón opuesto se encontró en la permeabilidad de las membranas de tejido foliar. La menor permeabilidad se encuentra en las plantas inoculadas con X38. Esto indica que X38 podría estimular el sistema antioxidante y así contribuir a un mejor desempeño fotosintético. A raíz de que estas diferencias solamente fueron significativas en ausencia de estrés, y de que X38 y C3 indujeron respuestas contrastantes frente a dos estreses de forma independiente (experimentos 1 y 2 de este capítulo), es importante, para futuros experimentos, analizar la dinámica tempo-espacial del Cd en el sistema sustrato-hongo-planta para comprender las bases fisiológicas que sustentan la funcionalidad de estas dos líneas contrastantes promisorias para estudios de genómica funcional y así, entender las características susceptibles de análisis para futuros estudios de señal filogenética dirigidos a programas de mejoramiento genético, posteriores.

CONCLUSIONES



Working Papers 2022

La acumulación de biomasa de diferentes órganos de las plantas de cacao en respuesta al Cd, es diferente y particularmente las hojas tienden a acumular menos biomasa que los otros órganos de la planta. A pesar de la variabilidad funcional de las líneas de HFMA en la promoción de crecimiento de hojas en condiciones de no estrés, no hay evidencia de esta variabilidad en condiciones de estrés por Cd.

La concentración de Cd en el sustrato y la identidad de la línea monospórica de HFMA inoculante, modularon su absorción, translocación y concentración en plantas de cacao. Al incrementarse la concentración de Cd, se incrementa la eficiencia en su absorción, pero se disminuye la eficiencia de su translocación a la parte aérea. Esto sucedió en estrés por Cd o en estrés combinado. Por su parte, la inoculación con diferentes líneas monospóricas de HFMA tiende a aumentar la concentración de Cd en la raíz en diferente magnitud según el genotipo inoculado. No obstante, esto debe ser objeto de futuras investigaciones.

El desempeño de la fotosíntesis, en la fase fotoquímica, de plantas de cacao depende del Cd, de la inoculación con diferentes líneas monospóricas de HFMA y del tiempo de exposición a Cd. La disminución del desempeño fotosintético frente al estrés por Cd sucedió inicialmente a nivel de la reducción del NADPH⁺ para luego extenderse a todo el flujo energético en la fase fotoquímica. En respuesta a la inoculación, particularmente, la línea monospórica C3 indujo una respuesta diferente (menor) en el desempeño fotoquímico de plantas de cacao sometidas a Cd con respecto a otras líneas monospóricas.

El déficit hídrico, pero no la inoculación con líneas monospóricas de HFMA diferentes, indujo una disminución del crecimiento general de la planta de cacao. No obstante, la arquitectura de la raíz, representado en la LER si cambió, particularmente en respuesta a la inoculación con la línea Z25 sugiriendo efectos que el efecto puede estar dirigido hacia mecanismos de tolerancia al déficit hídrico que requieren mayor estudio a futuro.

El desempeño de la fotosíntesis, en la fase fotoquímica, de plantas de cacao depende del déficit hídrico y de la inoculación con diferentes líneas monospóricas de HFMA. Así, el déficit hídrico disminuye el



Working Papers 2022

desempeño fotosintético en general y de forma similar a lo sucedido en plantas de cacao sometidas a Cd, adicionalmente esta respuesta varía a lo largo del tiempo.

El déficit hídrico, pero no el Cd tuvieron efectos negativos en la acumulación de biomasa bajo las condiciones evaluadas debido aparentemente a limitaciones estomáticas de la fotosíntesis. Nos obstante, para futuros estudios se deben analizar las posibles limitaciones estomáticas de la fotosíntesis.

Las líneas X38 y C3 indujeron el mayor y menor desempeño, respectivamente tanto en la respuesta de las plantas de cacao al estrés por déficit hídrico, como en la de Cd (en experimentos independientes), resultado que coincidió con los obtenidos a partir de la fluorescencia de la clorofila a. De forma consistente, la línea monospórica X38 parece ser la línea que contribuye a un mayor contenido de clorofilas y a una menor permeabilidad de membranas a sus plantas de cacao hospederas.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Table S ;Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..1. **Análisis químico y físico del sustrato.**

pH	CO	N	Ca	K	Mg	Na	Al	CICE	P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
	%		meq / 100g					mg/kg					%						
4,92	1,3	0,1	1,13	0,09	0,28	0,05	1,2	2,75	50,8	16,7	0,4	53,7	7,5	5,38	<0,12	11	14	75	FA

Figura S ;Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..1. **Curva de tensión de humedad del sustrato utilizado en los ensayos de este capítulo.**



Working Papers 2022

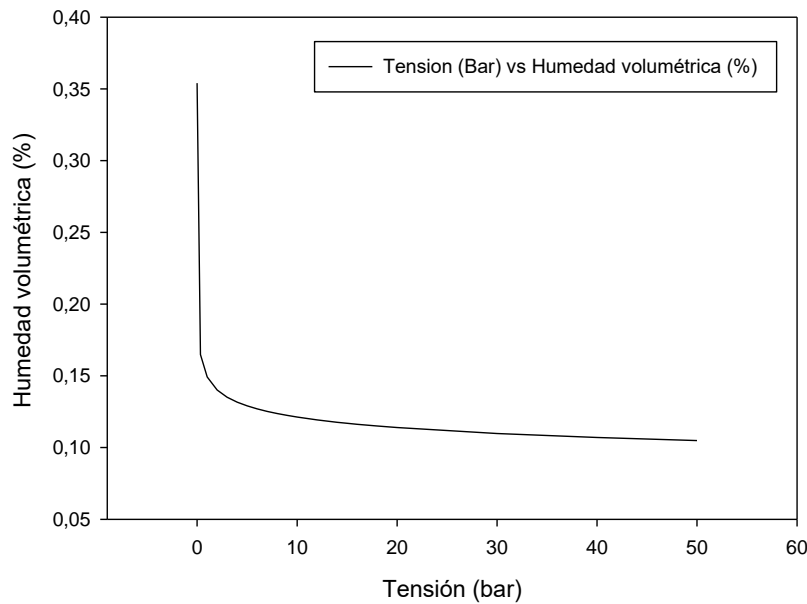


Table S Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..2. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, considerando parámetros de fluorescencia.

Línea	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	Índice (Promedio)
A1	0,51	0,87	0,69	0,70	0,58	0,73	0,69	0,68	0,41	0,16	0,51	0,16	0,00	0,24	0,15	0,17	0,00	0,22	0,32	0,92	0,00	0,35	0,29	0,19	0,47	0,60	0,39	0,62	0,13	0,41
A5	0,33	0,94	0,92	0,92	0,75	0,97	0,84	0,86	0,66	0,00	0,00	0,56	0,25	0,60	0,15	0,23	0,34	0,40	0,04	0,60	0,11	0,92	0,73	0,80	1,00	0,55	0,84	0,91	0,74	0,59
C2	0,38	0,76	0,69	0,66	1,00	0,82	0,56	0,69	0,00	0,37	0,09	0,28	0,74	0,35	0,66	0,65	0,67	0,44	0,50	1,00	0,57	1,14	1,00	0,55	0,41	0,72	0,59	0,68	0,44	0,60
C3	0,00	1,00	1,00	1,00	0,58	1,00	1,00	1,00	0,01	0,81	0,57	0,00	0,03	0,41	0,39	0,42	0,01	0,00	0,53	0,92	0,18	0,00	0,32	0,00	0,71	0,00	0,08	0,29	0,00	0,42
X38	1,00	0,38	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,66	0,74	0,50	0,66	1,00	0,66	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00	1,00	0,37	0,51	0,00	0,34	0,00	0,00	1,00	0,55
Z15	0,76	0,00	0,12	0,03	0,71	0,15	0,16	0,19	0,97	1,00	0,37	0,40	0,23	0,00	0,00	0,00	0,28	0,59	0,16	0,78	0,56	0,29	0,79	1,00	0,47	1,00	1,00	1,00	0,83	0,48
Z25	0,94	0,36	0,08	0,07	0,00	0,02	0,13	0,11	0,51	0,95	0,24	0,61	0,25	0,76	0,18	0,28	0,30	0,31	0,14	0,68	0,75	0,52	0,96	0,70	0,45	0,67	0,57	0,65	0,59	0,44
No inoculación	1,00	0,12	0,03	0,00	0,18	0,07	0,12	0,18	1,00	0,35	1,00	1,00	0,71	1,00	0,39	0,52	0,82	0,77	0,00	0,00	0,68	0,94	0,00	0,91	0,98	0,82	0,54	0,61	0,94	0,54



Working Papers 2022

A : Fv/Fo
 B : phi(Po)
 C : psi(Eo)
 D : phi(Eo)
 E : delta(Ro)
 F : phi(Ro)
 G : PI abs
 H : PI total
 I : LER
 J : Cdt. (mg/Kg)
 K : Cdd. (mg/Kg)
 L : Root Cd (mg/Kg)
 M : Shoot Cd (mg/Kg)
 N : Extracción de Cd -Raíz (mg)
 O : Extracción de Cd -PA (mg)
 P : Extracción de Cd -Total (mg)
 Q : Concentración de Cd en Total (mg/Kg)
 R : Eabs
 S : Etrs (PA/tot)
 T : Etrs (PA/Raiz)
 U : FCB (Cdt)
 V : FCB (Cdd)
 W : Long. Raiz
 X : PS Raiz
 Y : PS Tallo
 Z : PS Hojas
 AA : PSTot
 AB : PSPA
 AC : Raiz/PA

Table S ¡Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento..3. **Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, considerando parámetros de fluorescencia.**

Líneas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	Índice (Promedio)
A1	0,56	0,63	0,59	0,58	0,57	0,66	0,55	0,47	0,78	0,43	0,88	0,72	0,20	0,23	0,22	0,17	0,82	0,53
A5	1,00	1,00	0,83	0,89	0,25	0,86	0,90	0,90	0,79	0,51	0,04	0,27	0,43	0,04	0,01	0,09	0,66	0,56
C2	0,92	0,96	0,88	0,93	0,37	1,00	0,95	1,00	1,00	0,69	0,20	1,00	0,78	0,45	0,64	0,52	1,00	0,78
C3	0,00	0,07	0,08	0,03	1,00	0,22	0,00	0,00	0,95	0,17	0,00	0,54	0,21	0,00	0,00	0,00	0,76	0,24
X38	0,07	0,00	0,00	0,00	0,79	0,00	0,11	0,08	0,82	0,00	0,65	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	0,29	0,44
Z15	0,78	0,86	1,00	1,00	0,00	0,74	1,00	0,84	0,57	1,00	0,58	0,00	0,19	0,31	0,05	0,23	0,24	0,55
Z25	0,40	0,52	0,28	0,30	0,18	0,01	0,32	0,13	0,00	0,69	1,00	0,06	0,00	0,64	0,26	0,42	0,00	0,31
No inoculación	0,61	0,74	0,54	0,57	0,45	0,62	0,49	0,52	0,78	0,11	0,65	0,66	0,23	0,72	0,54	0,54	0,51	0,55

A : Fv/Fo
 B : phi(Po)
 C : psi(Eo)
 D : phi(Eo)
 E : delta(Ro)
 F : phi(Ro)
 G : PI abs
 H : PI total
 I : LER
 J : Pot. Hídrico
 K : Long. Raiz
 L : PS Raiz
 M : PS Tallo
 N : PS Hojas
 O : PSTot
 P : PSPA
 Q : Raiz/PA

REFERENCIAS

Abu-Elsaoud, A. M., Nafady, N. A., & Abdel-Azeem, A. M. (2017). Arbuscular mycorrhizal strategy for zinc mycoremediation and diminished translocation to shoots and grains in wheat. *PLoS ONE*, *12*(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188220>



Working Papers 2022

- Al-Karaki, G. N. (2006). Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.019>
- Alguacil, M., Caravaca, F., Díaz-Vivancos, P., Hernández, J. a., & Roldán, a. (2006). Effect of Arbuscular Mycorrhizae and Induced Drought Stress on Antioxidant Enzyme and Nitrate Reductase Activities in *Juniperus oxycedrus* L. Grown in a Composted Sewage Sludge-amended Semi-arid Soil. *Plant and Soil*, 279(1–2), 209–218. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-1238-3>
- Angelard, C., Colard, A., Niculita-Hirzel, H., Croll, D., & Sanders, I. R. (2010). Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Current Biology : CB*, 20(13), 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.031>
- Angelard, C., & Sanders, I. R. (2011). Effect of segregation and genetic exchange on arbuscular mycorrhizal fungi in colonization of roots. *The New Phytologist*, 189(3), 652–657. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03602.x>
- Angelard, C., Tanner, C., Fontanillas, P., Niculita-Hirzel, H., Masclaux, F. G., & Sanders, I. R. (2014). Rapid genotypic change and plasticity in arbuscular mycorrhizal fungi is caused by a host shift and enhanced by segregation. *The ISME Journal*, 8, 284–294. <http://www.nature.com/ismej/journal/v8/n2/abs/ismej2013154a.html>
- Aroca, R. (2012). *Plant responses to drought stress* (Ricardo Aroca (ed.)). Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg.
- Augé, R. M. (2001). Water relations , drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11, 3–42.
- Augé, R. M., Moore, J. L., Cho, K., Stutz, J. C., Sylvia, D. M., al-Agely, A. K., & Saxton, A. M. (2003). Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *Journal of Plant Physiology*, 160(10), 1147–1156. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01154>
- Augé, R. M., Toler, H. D., Moore, J. L., Cho, K., & Saxton, A. M. (2007). Comparing contributions of soil versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *Journal of Plant Physiology*, 164(10), 1289–1299. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.08.005>



Working Papers 2022

- Azizian, A., Amin, S., Maftoun, M., Emam, Y., & Noshadi, M. (2013). Response of corn to cadmium and drought stress and its potential use for phytoremediation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(2), 357–368.
- Bai, Y., Kissoudis, C., Yan, Z., Visser, R. G. F., & van der Linden, G. (2018). Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. *Plant Journal*, 93(4), 781–793. <https://doi.org/10.1111/tpj.13800>
- Barcelo, J., & Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses , root exudates , and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48, 75–92.
- Bécard, G., & Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108, 211–218.
- Bucking, H., Liepold, E., & Ambilwade, P. (2012). The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. In *Plant Science* (pp. 107–138). In Tech. <https://doi.org/10.5772/52570>
- Byrne, C., Divekar, S. D., Storch, G. B., Parodi, D. a, & Martin, M. B. (2009). Cadmium--a metallohormone? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.025>
- Caravaca, F., Alguacil, M. M., Hernández, J. A., & Roldán, A. (2005). Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. *Plant Science*, 169(1), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.013>
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A., & Sanders, I. R. (2013). The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PloS One*, 8(8), e70633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070633>
- Ceballos Rojas, I. C. (2016). *Funcionalidad de la interacción simbiótica entre variedades de yuca y genotipos de Rhizophagus irregularis en la Orinoquía Colombiana* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/54313/>



Working Papers 2022

- Chen, B. D., Li, X. L., Tao, H. Q., Christie, P., & Wong, M. H. (2003). The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, 50(6), 839–846. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688500>
- COLOMBIA. Ministerio de Minas y Energía -Unidad de Planeación Minero Energética (UPME) y Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - Instituto de Hidrología, M. y E. A. (IDEAM). (2005). *Atlas de Radiación Solar de Colombia*. <https://www.siac.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=668&conID=1293>
- Croll, D., Wille, L., Gamper, H., Mathimaran, N., Lammers, P. J., Corradi, N., & Sanders, I. R. (2008). Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal. *New Phytologist*, 178, 672–687. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2008.02381.x/full>
- Dalal, V. K., & Tripathy, B. C. (2018). Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Scientific Reports*, 8(1), 10–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14419-4>
- Doubková, P., Vlasáková, E., & Sudová, R. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant and Soil*, 370(1–2), 149–161. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1610-7>
- Ellouzi, H., Ben Hamed, K., Asensi-Fabado, M. A., Müller, M., Abdelly, C., & Munné-Bosch, S. (2013). Drought and cadmium may be as effective as salinity in conferring subsequent salt stress tolerance in *Cakile maritima*. *Planta*, 237(5), 1311–1323. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1847-7>
- Estrada-Luna, A. A., & Davies, F. T. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Journal of Plant Physiology*, 160(9), 1073–1083. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00989>
- European Commission. (2013). *Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs* (Issue 1881). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>.



Working Papers 2022

- European Food Safety Authority. (2009). Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *The EFSA Journal*, 980, 1–139.
- European Food Safety Authority. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(1), 1–37. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>.
- Fernández, J. C., Bohórquez, W., & Rodríguez, A. (2016). Dinámica nutricional del cacao bajo diferentes tratamientos de fertilización con N , P y K en vivero Cocoa nutritional dynamics under different fertilization treatments of N , P and K in nursery. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 367–380. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.4702>
- Filipič, M. (2012). Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research*, 733(1–2), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.09.002>
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489–500.
- Goicoechea, N., Merino, S., & Sánchez-Díaz, M. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi can contribute to maintain antioxidant and carbon metabolism in nodules of *Anthyllis cytisoides* L. subjected to drought. *Journal of Plant Physiology*, 162(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.03.011>
- González-Guerrero, M. (2005). *Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares Glomus intraradices*. Universidad de Granada.
- González Moreno, S., Perales Vela, H., & Salcedo Alvarez, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119–129.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., & Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9), 1304–1320. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- Hassan, S. E., Hijri, M., & St-Arnaud, M. (2013). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *New Biotechnology*, 30(6), 780–787. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.07.002>



Working Papers 2022

- Hu, J., Wu, S., Wu, F., Leung, H. M., Lin, X., & Wong, M. H. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance both absorption and stabilization of Cd by Alfred stonecrop (*Sedum alfredii* Hance) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in a Cd-contaminated acidic soil. *Chemosphere*, *93*(7), 1359–1365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.089>
- Huamaní-Yupanqui, H. A., Huauya-Rojas, M. A., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012). Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) orgánico. *Acta Agronómica*, *4*, 339–344.
- ICCO. (2012). *ICCO Workshop on Cd* (Issue May).
- ICCO. (2015). *Quarterly bulletin of ICCO statistics*.
- 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>
- Jing, D., Fei-bo, W. U., & Guo-ping, Z. (2005). Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *Journal of Zhejiang University*, *6*(10), 974–980. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0974>
- Johnson, N., Graham, J., & Smith, F. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism – parasitism continuum *. *New Phytologist*, *135*, 575–585.
- Kaldorf, M., Kuhn, a. J., Schröder, W. H., Hildebrandt, U., & Bothe, H. (1999). Selective Element Deposits in Maize Colonized by a Heavy Metal Tolerance Conferring Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Journal of Plant Physiology*, *154*(5–6), 718–728. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80250-8](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80250-8)
- Kinraide, T. B. (1994). Use of a Gouy-Chapman-Stern Model for Membrane-Surface Electrical Potential to Interpret Some Features of Mineral Rhizotoxicity. *Plant Physiol*, *106*, 1583–1592.
- Kirkham, M. B. (2005). Principles of Soil and Plant Water Relations. In *Principles of Soil and Plant Water Relations*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409751-3.X5000-2>
- 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>



Working Papers 2022

- Klironomos, J. N. (2016). Variation in Plant Response to Native and Exotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Ecology*, 84(9), 2292–2301.
- Koch, A. M., Kuhn, G., Fontanillas, P., Fumagalli, L., Goudet, J., & Sanders, I. R. (2004). High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2369–2374. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356957&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Kyllo, D. a., Velez, V., & Tyree, M. T. (2003). Combined effects of arbuscular mycorrhizas and light on water uptake of the neotropical understory shrubs, Piper and Psychotria. *New Phytologist*, 160(2), 443–454. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00896.x>
- Läderach, P., Martinez-Valle, a., Schroth, G., & Castro, N. (2013). Predicting the future climatic suitability for cocoa farming of the world's leading producer countries, Ghana and Côte d'Ivoire. *Climatic Change*, 119(3–4), 841–854. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-0774-8>
- Leung, H. M., Wu, F. Y., Cheung, K. C., Ye, Z. H., & Wong, M. H. (2010). The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate amendment on arsenic uptake, accumulation and growth of *Pteris vittata* in As-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 12(4), 384–403. <https://doi.org/10.1080/15226510903051740>
- Liu, C., Yu, R., & Shi, G. (2017). 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>
- Lozano, J. G., & Fonseca, L. P. M. (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>
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6), 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., & Gollery, M. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9, 490–498.



Working Papers 2022

- Mohammadi, K., Khalesro, S., Sohrabi, Y., & Heidari, G. (2011). A Review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Science*, 1(9), 310–319.
- Murata, N., Allakhverdiev, S. I., & Nishiyama, Y. (2012). The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(8), 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.020>
- Niinemets, Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*, 260(10), 1623–1639. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.07.054>
- Nordic Council of Ministers. (2003). *Cadmium Review* (Issue January).
- Ouziad, F., Hildebrandt, U., Schmelzer, E., & Bothe, H. (2005). Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162, 634–649.
- Özyiğit, I. I., & Akinci, Ş. (2009). Effects of some stress factors (aluminum, cadmium and drought) on stomata of roman nettle (*Urtica pilulifera* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 108–115. <https://doi.org/10.15835/nbha3713191>
- Page, A. L., Chang, C., & El-Amamy, M. (1987). Cadmium Levels in Soils and Crops in the United States. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537>
- Parry, C., Blonquist, J. M., & Bugbee, B. (2014). In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: Analysis of the optical / absolute relationship In situ measurement of leaf chlorophyll concentration : analysis of the optical/absolute relationship. In *Plant Cell and Environment* (Issue 37, pp. 2508–2520). <https://doi.org/10.1111/pce.12324>



Working Papers 2022

- Paschalidis, C., Kavvadias, V., Dimitrakopoulou, S., & Koriki, A. (2013). Accumulation in CabbagEffects of Cadmium and Lead on Growth , Yield , and Metale. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(1–4), 632–644. <https://doi.org/10.1080/00103624.2013.745373>
- Pérez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S. S., Cornwell, W. K. K., Craine, J. M. M., Gurvich, D. E. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J. J., Reich, P. B. B., Poorter, L., Wright, I. J. J., Etc., Ray, P., Etc., Díaz, S., ... Cornelissen, J. H. C. (2013). New Handbook for standardized measurment of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 61(34), 167–234. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/BT12225>
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Pipitone, L. (2012). Impact of EU legislation on cadmium on EU cocoa trade. *World Cocoa Conference 2012, May*, 1–8.
- Porcel, R., Barea, J. M., & Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, 157(1), 135–143. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00658.x>
- Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1743–1750. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh188>
- Redon, P.-O., Béguiristain, T., & Leyval, C. (2009). Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza*, 19(3), 187–195. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0230-9>
- Ropars, J., Toro, K. S., Noel, J., Pelin, A., Charron, P., Farinelli, L., Marton, T., Krüger, M., Fuchs, J., Brachmann, A., & Corradi, N. (2016). Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology*, March, 16033. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.33>
- Rucker, R. (2009). *Nutritional Properties of Cocoa* (pp. 943–946).



Working Papers 2022

- Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0237-6>
- Shanying, H. E., Xiaoe, Y., He, Z., & Baligar, V. C. (2017). Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity : A Review. *Pedosphere: An International Journal*, 27(3), 421–438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- She, W., Jie, Y.-C., Xing, H.-C., Lu, Y.-W., Huang, M., Kang, W.-L., & Wang, D. (2011). Tolerance to Cadmium in Ramie (*Boehmeria nivea*) Genotypes and Its Evaluation Indicators. *Acta Agronomica Sinica*, 37(2), 348–353. [https://doi.org/10.1016/S1875-2780\(11\)60010-2](https://doi.org/10.1016/S1875-2780(11)60010-2)
- 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>
- Smith, F. A., & Smith, S. E. (2013). How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant and Soil*, 363(1–2), 7–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1583-y>
- Smith, S. E., Jakobsen, I., Gronlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*, 156(3), 1050–1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>
- Smith, Sally E, & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Stockinger, H., Walker, C., & Schüßler, A. (2009). “Glomus intraradices DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not Glomus intraradices. *New Phytologist*, 183(4), 1176–1187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x>
- Stoltz, E., & Greger, M. (2002). Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 47(3), 271–280. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00002-3)



Working Papers 2022

- Strasser, R. J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation* (pp. 443–480). <http://www.hansatech-instruments.com/docs/the-fluorescence-transient.pdf>
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 19*. (pp. 1–47). Springer, Dordrecht.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *The New Phytologist*, 203(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>
- Ultra, V. U., Tanaka, S., Sakurai, K., & Iwasaki, K. (2006). Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 290(1–2), 29–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9087-2>
- United Nations. (2010). *Final review of scientific information on cadmium* (Issue December).
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5004-5007.1998>
- Wang, F. Y., Lin, X. G., & Yin, R. (2007). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia*, 51(2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.02.003>
- Wu, F., Zhang, G., & Dominy, P. (2003). Four barley genotypes respond differently to cadmium : lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00113-2)
- Wu, Q.-S., & Xia, R.-X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.024>
- Wyss, T., Masclaux, F. G., Rosikiewicz, P., Pagni, M., & Sanders, I. R. (2016). Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The ISME Journal*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.29>



Working Papers 2022

- 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>
- Yooyongwech, S., Samphumphuang, T., Tisarum, R., Theerawitaya, C., & Cha-Um, S. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved water deficit tolerance in two different sweet potato genotypes involves osmotic adjustments via soluble sugar and free proline. *Scientia Horticulturae*, 198, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.002>
- Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., & Slamka, P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment*, 54, 133–139.
- Zlatev, Z. S., & Yordanov, I. T. (2005). *Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants*. 30, 3–18.

