



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio del efecto de diferentes líneas
monospóricas de *Rhizophagus*
irregularis en la respuesta del cacao
al cadmio bajo condiciones de déficit
hídrico en vivero**

John Cristhian Fernández Lizarazo M.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2018

**Estudio del efecto de diferentes líneas
monospóricas de *Rhizophagus
irregularis* en la respuesta del cacao
al cadmio bajo condiciones de déficit
hídrico en vivero**

John Cristhian Fernández Lizarazo M.Sc.

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

Directora:
Ph.D. Alia Rodríguez Villate

Codirector:
Ph.D. Ian Robert Sanders

Línea de investigación
Fisiología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2018

Dedicatoria

A mi abuelo, siempre
quiso que fuera Doctor.

A Leidy y Juanita,
todo para ellas.

Agradecimientos

A Dios, por la vida y todo lo que esto implica

A Colciencias, por la financiación de mis estudios doctorales

A la facultad de Ciencias Agrarias, por acogerme en su seno

A la doctora Alía Rodríguez, por su acompañamiento e innumerables enseñanzas

Al doctor Ian Sanders, por su orientación y amistad

Al Hermano Carlos Gómez Restrepo, por su inmensa generosidad y sabiduría en cada acto y palabra de apoyo

A la Universidad de La Salle, a la generosidad y fraternidad de los amigos que allí tengo.

A Leidy, mi hermosa compañera de vida, a quien debo las fuerzas, el apoyo y la paciencia sin los cuales no habría logrado esta misión. Gracias por existir amor, sin tu compañía hubiese carecido de sentido este esfuerzo.

A Juanita, porque siendo aún pequeña, es el más grande motor de mi vida.

A mi madre, por sus oraciones.

A mi familia, por su compañía en la cercanía y en la distancia

A cada uno de mis estudiantes del Semillero de investigación SIAT por la confianza que depositaron en mi.

A Isabel Ceballos, Diana Jácome, Julián Cárdenas, Juan Carlos por sus valiosos consejos, amistad y apoyo.

A la profesora Inesita QEPD, al maestro Jaime Pedroza QEPD y a mi amigo Iván Rodrigo Orjuela QEPD cuyas enseñanzas trascendieron el tiempo y el espacio.



**DE LAS ESPADAS FORJARÁN ARADOS,
DE LAS LANZAS PODADERAS.
AQUÍ SE EDUCARÁN PARA LA PAZ.**

(Is. 2, 4)

Inscripción en el muro de la gratitud, Utopía. Universidad de La Salle.



Theobroma cacao L. Fotografía: JCFL.

RESUMEN

El creciente mercado mundial del cacao ha implicado una creciente preocupación por los daños en la salud de los consumidores debido a la presencia de cadmio proveniente de material parental del suelo, a la cercanía de los cultivos a zonas de extracción de minerales y a la utilización de fertilizantes fosforados o abonos orgánicos. El fitomejoramiento necesita un tiempo mayor al requerido por la Unión Europea. El estrés por déficit hídrico debido al cambio climático o a prácticas culturales, se constituye como otra amenaza para el cultivo del cacao en el mundo. Así, las acciones por alcanzar los requerimientos de inocuidad del cacao pueden dificultarse por cuenta del déficit hídrico. La fitoremediación asistida por HFMA, es una alternativa posible que ha demostrado la funcionalidad de los HFMA en la respuesta de las plantas hospederas frente al Cd y al déficit hídrico. No obstante, estas respuestas son muy variables entre otras, por la variabilidad funcional intra-específica de los HFMA limitando su aplicabilidad. Actualmente, no se conocen las respuestas del cacao inoculado con líneas monospóricas genéticamente diferentes de HFMA, frente al estrés por déficit hídrico y al Cd, que permitan identificar genotipos que induzcan respuestas fisiológicas indicadoras de potencial para la fito-remediación. En consecuencia, esta investigación se propuso estudiar el efecto de diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* en la respuesta del cacao al cadmio bajo condiciones de déficit hídrico en condiciones de vivero. Se evaluaron múltiples parámetros para conocer las respuestas fisiológicas de las plantas a cada estrés de forma independiente y combinada. También se evaluó el efecto de la inoculación con un genotipo de HFMA comercial, así como de diferentes líneas monospóricas provenientes de cultivo monoxénico. Se encontraron diferencias funcionales entre las líneas monospóricas evaluadas y se identificaron las que indujeron las respuestas más y menos favorables de las plantas a estrés por déficit hídrico y por Cd, que de forma interesante fueron las mismas para cada estrés. Los resultados obtenidos revisten una alta relevancia porque hacen posible considerar oportunidades para estudios de mejoramiento genético para tolerancia a estrés a partir de búsqueda y selección de genotipos del hongo simbiote y no solamente de la planta hospedera.

Palabras clave: Estrés abiótico, genética, fito-remediación, hongo formador de micorrizas, funcionalidad de la simbiosis.

Abstract

The growing world market of cocoa has implied a growing concern about damages in the health of consumers due to cadmium coming from parental material of the soil, to the proximity of the crops to zones of extraction of minerals and to the use of fertilizers phosphorus or organic fertilizers. Plant breeding needs a longer time than that required by the European Union. Water deficit stress due to climate change or cultural practices constitutes another threat for cocoa cultivation in the world. Thus, actions to meet the requirements of cocoa safety can be complicated by the water deficit. The phytoremediation assisted by HFMA, is a possible alternative that has demonstrated the functionality of HFMA in the response of host plants against Cd and water deficit. However, these responses are very variable due to the intra-specific functional variability of HFMA among others, limiting its applicability. Currently, responses of cocoa inoculated with genetically different single spore lines of AMF fungi are not known, when subjected to water deficit and Cd stress, which allow the identification of genotypes that induce physiological responses with potential for phyto-remediation. Consequently, this research aimed to study the effect of different single spore lines of *Rhizophagus irregularis* on response of cocoa to cadmium under conditions of water deficit in nursery conditions. Multiple parameters were evaluated to know the physiological responses of plants to each stress independently and in combination. The effect of inoculation with a commercial HFMA genotype was also evaluated, as well as different single spore lines from monoxenic culture. Functional differences were found between the single spore lines evaluated and those that induced the most and least favourable responses of plants to water deficit and Cd stress were identified, which interestingly were the same for each stress. The results obtained are highly relevant because they make it possible to consider opportunities for studies on genetic improvement for tolerance to stress by searching and selecting genotypes from the symbiotic fungus and not only from the host plant.

Keywords: Abiotic stress, genetics, phyto-remediation, mycorrhizal fungus, symbiosis functionality.

Contenido

Contenido

1. Introducción	1
2. Objetivos.....	1
2.1 Objetivo general	1
2.2 Objetivos específicos	1
3. Marco de referencia	3
3.1 El cacao	3
3.2 El cadmio	6
3.3 Estrés por Cd en las plantas	8
3.4 El estrés por déficit hídrico en la agricultura	10
3.5 El estrés combinado: Cadmio y déficit hídrico	11
3.6 Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA)	13
3.7 Variabilidad genética intraespecífica en los HFMA	14
4. Respuesta fisiológica de plantas de cacao al déficit hídrico cuando son inoculadas con HFMA.....	19
4.1 Introducción.....	19
4.2 Metodología	21
4.3 Resultados	27
4.4 Discusión	38
4.5 Conclusiones.....	48
4.6 Información suplementaria	50
5. Growth and physiological implications of cadmium dynamic in the continuum substrate-AMF-cocoa plant under realistic conditions	63
5.1 Introduction	63
5.2 Methodology.....	65
5.3 Results	68
5.4 Discussion.....	74
5.5 Supplemental information.....	80
6. 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.....	89
6.1 Introducción.....	89
6.1 Metodología	92
6.2 Resultados	101
6.3 Discusión	115

6.4	Conclusiones	125
6.5	Información suplementaria.....	127
7.	Conclusiones y recomendaciones	131
7.1	Conclusiones	131
7.2	Recomendaciones	132
8.	ANEXOS.....	135
9.	LITERATURA CITADA.....	186

Lista de figuras

Figura 3.1. Dos modelos diferentes que explican la organización nuclear en los HFMA. Tomado de (Pawlowska & Taylor, 2004)	15
Figura 4.1. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo tres.....	28
Figura 4.2. Efecto de la edad de la planta y de la restricción de riego. a) Potencial hídrico foliar; b) Conductancia estomática; c) Índice de clorofila; d) Fv/Fm.	29
Figura 4.3. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo dos.....	30
Figura 4.4. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la conductancia estomática a lo largo del día (24 DRRR – 64 DDS).	31
Figura 4.5. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la Fv/Fm.....	33
Figura 4.6. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo tres.....	34
Figura 4.7. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la concentración foliar de K.	37
Figura 6.1. Efecto de las diferentes líneas monospóricas de <i>R. irregularis</i> en la biomasa foliar de plantas de cacao sometidas a Cd.	103
Figura 6.2. Índice de tolerancia (IT) individual por cada línea monospórica inoculante de plantas de cacao.	104
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).	106
Figura 6.4. Longitud específica de la raíz con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico.	110
Figura 6.5. Eficiencia máxima potencial con base en Fo y phi(Po) de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico (Semana 10 DT).	111
Figura 6.6. Índice de clorofilas de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a estrés combinado.	115

List of figures

Figure 5.1. Effect of Cd amendment and AMF inoculation in total and extractable Cd in different substrate fractions in 5 and 17 WAS. a) Total Cd in substrate; b) Cd concentration in fraction 1 (soluble); c) Cd concentration in fraction 2 (reductible); d) Cd concentration in fraction 3 (oxidable); e) Cd concentration in fraction 4 (residual).	70
Figure 5.2. Effect of Cd amendment (Cd12) and AMF inoculation on Cd in plant. a) Plant Cd concentration; b) Cd translocation efficiency; c) Absorption efficiency at 13 WAS.	71
Figure 5.3. Effect of Cd amendment and AMF inoculation on root colonization percentage. a) in 5 WAS at all evaluated Cd concentrations and b) in WAS 5 and 17 at Cd0 and Cd12.	72
Figure 5.4. Effect of Cd amendment and AMF inoculation on root/shoot ratio. a) in WAS 13 at Cd0 and Cd12 and b) all Cd treatments at WAS 13.	73

Lista de tablas

Tabla 4.1. Tratamientos utilizados para la determinación del efecto de la restricción de riego y de la edad de la planta de cacao en vivero.	24
Tabla 4.2. Tratamientos utilizados para la determinación del efecto de la restricción de riego y de la inoculación con hongos MA.....	25
Tabla 4.3. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre parámetros de fluorescencia.	36
Tabla 6.1. Efecto del Cd y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.	101
Tabla 6.2. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia.	107
Tabla 6.3. Efecto del déficit hídrico y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.....	107
Tabla 6.4. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia.	112
Tabla 6.5. Efecto del estrés combinado y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao.	113

Lista de información suplementaria

FIGURAS

Figura S 4.1. Curva de tensión de humedad del sustrato utilizado en los ensayos de este capítulo.	50
Figura S 4.2. Potencial hídrico de la atmósfera a los 24 DRR (64 DDS). Ensayo dos. .	53
Figura S 6.1. Curva de tensión de humedad del sustrato utilizado en los ensayos de este capítulo.	127

FIGURES

Figure S 5.1. Correlation between expected and obtained total substrate Cd concentration.	80
--	----

TABLAS

Tabla S 4.1. Análisis del sustrato utilizado en el ensayo uno.	50
Tabla S 4.2. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la humedad del sustrato. Ensayo uno.	51
Tabla S 4.3. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la conductividad estomática. Ensayo uno.	51
Tabla S 4.4. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el potencial hídrico foliar. Ensayo uno.	51
Tabla S 4.5. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el índice de clorofilas. Ensayo uno.	52
Tabla S 4.6. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la Fv/Fm. Ensayo uno.	52
Tabla S 4.7. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el área foliar. Ensayo uno.	53

Tabla S 4.8. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el número de hojas. Ensayo uno.	53
Tabla S 4.9. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 13 DRR (43 DDS). Ensayo dos.	54
Tabla S 4.10. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 24 DRR (64 DDS). Ensayo dos.	54
Tabla S 4.11. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 68 DRR (98 DDS). Ensayo dos.	55
Tabla S 4.12. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 13 DRR (43DDS). Ensayo dos.	55
Tabla S 4.13. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 24 DRR (64DDS). Ensayo dos.	56
Tabla S 4.14. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 68 DRR (98 DDS). Ensayo dos.	56
Tabla S 4.15. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el área foliar. Ensayo dos.	56
Tabla S 4.16. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la biomasa. Ensayo dos.	57
Tabla S 4.17. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la humedad volumétrica del sustrato. Ensayo tres.	57
Tabla S 4.18. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el potencial hídrico foliar. Ensayo tres.	58
Tabla S 4.19. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática. Ensayo tres.	58
Tabla S 4.20. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la concentración de nutrientes en la hoja. Ensayo tres.	59
Tabla S 4.21. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el área foliar. Ensayo tres.	59
Tabla S 4.22. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre vigor de las plantas. Ensayo tres.	60

TABLES

Table S 5.1. Chemical and physical substrate analysis.	80
Table S 5.2. Total Cd concentration in substrate after stabilization.	80
Table S 5.3. Total substrate Cd concentration across evaluation period.	81
Table S 5.4. Cd concentration in substrate fractions across evaluated period.	81
Table S 5.5. Correlation among total Cd concentration in substrate and Cd concentration in plant.	81
Table S 5.6. Effect of Cd and AMF inoculation on plant Cd concentration across evaluation period.	82

Table S 5.7. Effect of Cd and AMF inoculation on root colonization percentage across evaluation period.....	84
Table S 5.8. Effect of Cd and AMF inoculation on chlorophyll index across evaluation period.....	84
Table S 5.9. Effect of Cd and AMF inoculation on stomatal conductance across evaluation period.....	84
Table S 5.10. Effect of Cd and AMF inoculation on fluoresces parameters across evaluation period.....	85
Table S 5.11. Effect of Cd and AMF inoculation on morphological parameters across evaluation period.....	86
Table S 5.12. Effect of Cd and AMF inoculation on growth parameters across evaluation period.....	87
Table S 6.1. Análisis químico y físico del sustrato.....	127
Table S 6.2. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, considerando parámetros de fluorescencia.	128
Table S 6.3. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, considerando parámetros de fluorescencia.	129

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
ABS/CSo	absorbed photon flux per cross-section
Cd	Cadmio
CdCl ₂	Cloruro de cadmio
CdSO ₄	Sulfato de cadmio
Dl _o /CSm	energy dissipation per cross-section
ET _o /CSm	electron transport flux from Q _A to Q _B per excited cross-section
F _v /F _m	Rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia máxima
F _v /F _o	rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia mínima
Kg	Kilogramo
KPa	Kilopascales
KWh	Kilovatio hora
mg	miligramo
mmol	milimoles
MPa	Megapascales
P _{abs}	Índice de vitalidad con base en la absorción de energía
pH	Potencial de hidrogeniones
PI _{total}	Índice de vitalidad total
PSI	Fotosistema I

PSII	Fotosistema II
Q _A	Quinona A.
RE _o /CS _m	Electron transport flux until PSI end-electron acceptors per cross-section
TR _o /CS	Maximum trapped exciton flux per excited cross-section
μmol	micromoles

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
Θ	Humedad volumétrica
φ _{Eo}	Quantum yield for electron transport
φ _{Po}	Efficiency of photosystem II (PSII) for trapping energy and reduce pheophytin and Q _A ¹ ,
φ _{Ro}	Quantum yield for reduction of photosystem I (PSI) end-electron acceptors
δ(R _o),	Eficiencia del desplazamiento de un electrón hasta su aceptor final en PSI
ψ _{atm}	Potencial hídrico atmosférico

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AMF	Arbuscular micorrhizal fungi
BCR	Bureau of Reference protocol
CC	Capacidad de campo

¹ Quinone A

Cdd	Cadmio disponible
Cdt	Cd total
DDRR	Días después de la restricción de riego
DDS	Días después de siembra
DDT	Después de transplante
DT	Después de transplante
DVP	Déficit de presión de vapor
E_{abs}	Eficiencia de absorción
$E_{tr_{raíz}}$	Eficiencia en la translocación
$E_{tr_{tot}}$	Eficiencia en la translocación
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Food and Agriculture Organization (United Nations)
FCB	Factor de concentración biológica
FMA	Formadores de micorrizas arbusculares
HFMA	Hongos formadores de micorrizas arbusculares
HM	Heavy metal
ICCO	International cocoa organization
IT_{up}	Índice de tolerancia para único parámetro
IT_{mp}	Índice de tolerancia para múltiples parámetros
LER	Longitud específica de la raíz
LOQ	Limit of Quantification
OMS	Organización mundial de la Salud
PA	Biomasa de la parte aérea de la planta
PMP	Punto de marchitez permanente
RSL	Root specific length
UE	Unión Europea

X
XII

Título de la tesis o trabajo de investigación

UPME Unidad de Planeación Minero Energética

WAS Weeks after sowing

1. Introducción

El cacao es ampliamente valorado en el mundo por su calidad nutricional (Rucker 2009; ICCO 2015) y de hecho se predice que el mercado global del chocolate, subproducto del cacao, se duplicará en el año 2025 con respecto al 2015 (Stanisljevic 2018). Sin embargo, en análisis recientes, se ha encontrado que el chocolate, que es ampliamente consumido en países europeos, especialmente por la población infantil, tiene concentraciones de cadmio que podrían tener un efecto acumulativo en los consumidores causando daños en su salud relacionados con cáncer y mal funcionamiento renal (European Food Safety Authority 2009, 2012; European Commission 2018).

Por esta razón, se han incluido límites a las concentraciones de cadmio en el grano (ICCO 2012). Así, la Comisión Europea publicó 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). De igual forma el Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos de la FAO/OMS, presentó las propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados (INVIMA 2017). En conjunto, dados los límites impuestos, se prevé un impacto mundial en el comercio del cacao (Pipitone 2012).

En Colombia, se han determinado concentraciones promedio de 4,07 partes por millón (ppm) en chocolates nacionales con alto porcentaje de cacao, lo que supera los límites establecidos por el Codex Alimentarius (2,0 mg/kg) y la Unión Europea (0,8 mg/kg) (Echeverry and Reyes 2016).

En algunas zonas productoras de cacao en Santander (Colombia) se han encontrado concentraciones de cadmio hasta de 12 ppm en suelos y en granos de cacao (Castilla 2009; González 2010; Martínez and Palacio 2010). No obstante, estos valores podrían variar dependiendo la estacionalidad de las lluvias, siendo

mayores en época seca (Huamaní-Yupanqui et al. 2012) lo que sugiere una posible combinación de estreses: el hídrico y el debido a la presencia de cadmio.

El cadmio es un metal pesado que se encuentra normalmente en el ambiente pero cuya 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 se ha 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 (McLaughlin 2016).

En Colombia, los principales suelos cacaoteros tienen cadmio de origen natural, debido a que son de origen sedimentario que contienen mantos de carbón con trazas de metales pesados que, al estar debajo del suelo arable como roca madre, transfieren el cadmio hacia la superficie (González 2010; Martínez and Palacio 2010; Rodríguez 2017).

Otro factor que determina la comercialización del cacao es su producción. La producción del cacao en el mundo se ha caracterizado por los rendimientos bajos e inestables (Clough et al. 2009; FAOSTAT 2018) a pesar de la demanda creciente que se proyecta para los años futuros (Anga 2012; Stanisljevic 2018). En los lugares de mayor siembra de cacao en el mundo como Costa de Marfil o Malasia, el cacao está siendo sembrado de una forma que disminuye la cobertura vegetal de los bosques (Clough et al. 2009).

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 déficit hídrico (Läderach et al. 2013). Asimismo, se calcula que en los próximos años, como consecuencia del cambio climático, se presente una disminución en los rendimientos del grano desde un 40% (Lau et al. 2013) hasta un 89% (Gateau-Rey et al. 2018).

En Colombia, la Federación Nacional de Cacaoteros (Fedecacao) fomenta la siembra de cacao bajo sistemas agroforestales (Fedecacao 2012), sin embargo, debido a la existencia de amplias zonas aptas para el cultivo de cacao que pueden o no tener cobertura de bosque (García Lozano et al. 2005), a que se encuentra un amplio rango de sistemas de cultivo desde agroforestal y sotobosque hasta libre exposición sin sistemas de riego y a que el cacao tiene mayores rendimientos potenciales cuando es sembrado a libre exposición; es posible encontrar este cultivo no solo en sistema agroforestal y en sotobosque sino también a libre exposición con rendimientos habitualmente bajos por falta de sistemas de riego (Gobernación de Casanare 2008; Carr and Lockwood 2011).

En conjunto, este panorama sugiere que, a nivel global y nacional, las acciones para alcanzar los requerimientos de inocuidad del cacao pueden dificultarse por cuenta del déficit hídrico causado por el cambio climático y/o por los manejos culturales. Además, teniendo en cuenta que el cadmio es tóxico para las plantas, es necesario evaluar los efectos combinados de varios estreses sobre las plantas, en suelos contaminados con el propósito de diseñar estrategias futuras de fitoremediación (Rajkumar et al. 2012, 2013).

Se ha encontrado que los metales pesados normalmente agravan los efectos del déficit hídrico en el crecimiento vegetal y viceversa (Suzuki et al. 2014). Por ejemplo, la disminución del crecimiento debido al déficit hídrico puede inducir un aumento en la concentración de cadmio en los tejidos (Xia et al. 2015). Los efectos de estos estreses pueden también ser aditivos, de hecho existe una similitud de las respuestas a los dos estreses a nivel oxidativo y de absorción de agua (Greco et al. 2012). Esta similitud también se ha observado en los efectos positivos de la pre-exposición al déficit hídrico y al cadmio en la subsecuente exposición a estrés salino (Ellouzi et al. 2013). Adicionalmente, los efectos del déficit hídrico y la acumulación de cadmio varía con el tejido, el cultivar, y el estado de desarrollo de las plantas (Xia et al. 2015).

Frente a la acumulación de metales pesados y al déficit hídrico, se ha propuesto implementar procesos de fitomejoramiento (Gallego 2018) que pueden gastar entre

9 y 18 años en el caso del cacao (Glendinning 1966; Zhang et al. 2011). En contraste, la Unión Europea (UE) demandó un plazo prácticamente inmediato para implementar tecnologías que disminuyan las concentraciones de cadmio en el cacao. Así, la fito-remediación se presenta como una alternativa más rápida, relativamente económica y ambientalmente aceptada (Kirkham 2006; Lingua et al. 2008).

En estudios recientes se ha encontrado que los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) son importantes en los procesos de fito-remediación o mejor llamados de “mitigación”, pues pueden aumentar la fito-extracción o contribuir a la inmovilización de metales pesados. Esta diferencia funcional en la fito-remediación ha sido atribuida al efecto de diferentes especies o accesiones de hongos utilizados (Miransari 2011). No obstante, en sistemas agrícolas como los cultivos de cacao, no se conoce el potencial de uso de esta asociación que depende de la respuesta fisiológica de la especie al estrés por Cd y a la especificidad funcional que sustente con el hongo FMA.

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés por Cd está estrechamente relacionada con su potencial para la fito-remediación. Según Lin and Aarts (2012) y Garg et al. (2017), las plantas sensibles a los metales pesados permiten su absorción y carecen de mecanismos para contrarrestar sus efectos nocivos (no útiles en fito-remediación), las plantas resistentes-excluidoras no permiten la absorción de metales pesados (útiles en fito-estabilización), las plantas tolerantes no hiperacumuladoras, permiten la absorción de metales pesados pero no la translocación eficiente a la parte aérea de la planta (útiles en fito-estabilización) y finalmente las plantas tolerantes hiperacumuladoras, permiten la absorción de metales pesados y su translocación a la parte aérea de la planta (útiles en fito-extracción).

De otra parte, se ha reportado alta especificidad funcional en la simbiosis micorrícica arbuscular (MA), lo que implica alta variabilidad en las respuestas observadas debido al genotipo del hongo, al genotipo de la planta y a las condiciones experimentales (ambientales) (Koltai and Kapulnik 2010). Por ejemplo,

en una extensa revisión sobre el efecto de los HFMA en la fito-remediación/mitigación de metales pesados, se encontró que el 33% de los resultados se asociaron con fito-estabilización, el 33% con fito-extracción, el 33% con efectos variables fito-estabilización/fito-extracción) y el 1% con ausencia de efecto (Fernández y Rodríguez, en diagramación).

De forma similar, ahora es bien sabido que los HFMA se constituyen como una alternativa de mitigación del estrés por déficit hídrico en plantas (Augé 2001, 2004; Ruiz-Lozano et al. 2006; Wu and Zou 2017), especialmente ante el escenario actual de cambio climático (Seckbach and Grube 2010). No obstante, son pocos los estudios que evalúan el efecto de HFMA en la tolerancia frente al déficit hídrico en sistemas agrícolas como los cultivos de cacao (Chibuike and Daymond 2015), aunque la planta es considerada como micotrófica (Cuenca and Meneses 1996).

Las variaciones en las respuestas observadas pueden ser atribuibles a factores genéticos o ambientales. Dentro de los factores genéticos se encuentran las variaciones entre especies de plantas (Rivera-Becerril et al. 2002), entre genotipos de plantas de la misma especie (Malcová and Gryndler 2003; Leung et al. 2010a), entre especies de HFMA (Hassan et al. 2013) entre aislamientos diferentes de la misma especie de hongo FMA (Kaldorf et al. 1999; Redon et al. 2009), o diferencias en los factores ambientales como variaciones en el pH (El-Kherbawy et al. 1989), la nutrición (Ultra et al. 2006), la interacción con otros microorganismos (Redon et al. 2009), concentración del metal pesado (Chen et al. 2003) o estrés por déficit hídrico (Leung et al. 2010a).

Es importante resaltar dos fuentes de variaciones mencionadas, por cuanto no han sido exploradas suficientemente. La primera es la variación intra-específica de HFMA. Varias investigaciones han mostrado resultados favorables en fito-remediación/mitigación utilizando aislamientos de HFMA provenientes de zonas contaminadas por metales pesados (Janoušková et al. 2005; Janousková et al. 2006) probablemente porque estos aislamientos han adquirido tolerancia adaptativa (Sánchez Viveros et al. 2004). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que existe segregación en aislamientos del HFMA *R. irregularis*

(Sanders and Croll 2010; Angelard and Sanders 2011) y que las líneas monospóricas producidas durante este proceso varían en cuanto a su efecto sobre la acumulación de biomasa de sus plantas hospederas (Angelard et al. 2010; Ceballos Rojas 2016).

Esta especie de hongo ha sido utilizada en varias investigaciones de fito-remediación/mitigación (Fernández y Rodríguez, en diagramación), pero no se ha reportado investigación alguna sobre la variación de la respuesta de fito-remediación/mitigación, entre líneas monospóricas de esta especie ni se han realizado estudios para la obtención de líneas genéticamente diferentes a partir de suelos contaminados. No obstante, esta especie es particularmente interesante porque, a diferencia de otras especies de HFMA, se ha convertido en un modelo de estudio a causa de que su genoma ha sido secuenciado completamente (Tisserant et al. 2013) y de que puede ser producido de forma eficiente bajo condiciones *in vitro* (Bécard and Fortin 1988) lo que, sumado a su capacidad de segregación, abre la posibilidad de realizar procesos de mejoramiento genético (Sanders 2010; Orrell and Bennett 2013) dirigidos, entre otros, hacia la fito-remediación/mitigación.

La segunda variación es la debida al efecto del déficit hídrico. Es posible esperar una gran influencia de los estreses climáticos (como la disminución de humedad en el suelo debido al calentamiento global), en los procesos de fito-remediación (Rajkumar et al. 2012, 2013), sin embargo, son pocos los reportes que indagan por su efecto sobre la tolerancia a ambos estreses de forma combinada (Rajkumar et al. 2012) y no se registran reportes para el caso específico de cacao. A saber, sólo se ha reportado la interacción negativa entre la disponibilidad de agua en el suelo con respecto a la fito-extracción en *Pteris vittata* y *Cynodon dactylon* (Leung et al. 2010a).

Finalmente, en consideración a lo anteriormente expuesto la pregunta de investigación que se aborda en este estudio es ¿ocurre variación en la respuesta fisiológica de plantas de cacao sometidas a estrés por cadmio y a déficit hídrico, cuando son inoculadas con diferentes líneas de *R. irregularis*?

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de diferentes líneas monospóricas de *Rhizophagus irregularis* en la respuesta del cacao al cadmio bajo condiciones de déficit hídrico en vivero.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con HFMA, cuando son sometidas a déficit hídrico en vivero.

Estudiar la dinámica del Cd y su efecto fisiológico en el sistema sustrato-HFMA-planta en vivero.

Determinar la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis*, frente al Cd y al déficit hídrico, en vivero.

3. Marco de referencia

3.1 El cacao

El cacao es un árbol semi-caducifolio propio del piso inferior de la selva húmeda tropical que alcanza una altura entre 12 y 20 metros en condiciones naturales y entre 4 y 8 metros en condiciones de cultivo con un sistema radical pivotante que alcanza una profundidad entre 1,2 y 2 metros (Carr and Lockwood 2011; Dostert et al. 2012).

Theobroma pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae (antes Sterculiaceae) y comprende 22 especies en seis secciones (Whitkus et al. 1998) de las cuales *Theobroma cacao* es la especie más conocida (CacaoNet 2012). Tradicionalmente, el cacao se ha clasificado de acuerdo a la percepción de su calidad física y sensorial y características botánicas asociadas, aunque de manera imperfecta (ICCO 2013). Esta clasificación incluye a tres grupos: criollos, forasteros y trinitarios. No obstante, la literatura botánica sistemática solo reconoce paralelamente dos subespecies dentro de *Theobroma cacao*: *Theobroma cacao* L. subsp. *cacao* y *Theobroma cacao* L. subsp. *sphaerocarpum* (Chev.) que corresponden a los grupos genéticos principales criollo (de América Central) y forastero (de América del Sur), respectivamente (Motamayor et al. 2008; Dostert et al. 2012; Yee et al. 2018). Recientemente, Motamayor et al. (2008) han propuesto una nueva clasificación que diferencia 10 grupos genéticos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana.

Es considerada una planta hidro-mega-terma, debido a que requiere altas temperaturas y humedad relativa (HR), con oscilaciones mínimas de ambos factores (Fedecacao 2009; CEPLAC 2012). El rango de temperatura se encuentra entre 18 y 32°C con mejor desarrollo entre 24 a 28 °C (Fedecacao 2012). Las temperaturas mínimas medias son de 18—21 °C, las máximas de 30—32 °C (Dostert et al. 2012). El árbol de cacao requiere HR mayor a 75% y precipitaciones que oscilan entre 1500 y 3000 mm (Fedecacao 2004), con un mejor desarrollo en el rango entre 1800 y 2600 mm con distribución uniforme a lo largo de todo el año (Fedecacao 2009; Dostert et al. 2012).

A nivel edáfico, el cacao requiere una profundidad efectiva del suelo de 1,5 m para que la raíz pivotante y todo el sistema radicular pueda formarse bien (Fedecacao 2004; Dostert et al. 2012). Las plantas de cacao toleran un pH de 5.0—7.5 (óptimo 6.5—7.5) en suelos idealmente permeables arcillo-arenosos, con 50% arena, 30—40% arcilla, 1—2 % limo y una proporción relativamente alta de materia orgánica (> 3.5%). Para una disponibilidad de fósforo de al menos 8 ppm y una concentración suficiente de nutrientes como calcio (8 ppm), potasio (0.24 ppm) y magnesio (2 ppm), relaciones de nutrientes ser C:N de >9 y una relación N:P de 1.5 (Dostert et al. 2012).

Las plantas de cacao son más sensibles a algunos estreses abióticos que otros cultivos tropicales. Tienen una tolerancia baja a la sequía, al anegamiento y a los vientos fuertes (Dostert et al. 2012). Recientemente se ha determinado que la cantidad de luz como un factor adicional importantes que influyen los montos de cosecha por su relación con la tasa fotosintética y la respiración (Müller and Valle 2012).

En Colombia, se cultiva cacao desde la época de la Colonia, especialmente por pequeños propietarios (3,3 ha en promedio) que actualmente abarcan más 30.000 familias (Fedecacao 2009, 2013). En el 2016, en Colombia había sembradas más de 170000 ha de cacao, con una producción anual de 87.266 Ton y un rendimiento de 0,53 Ton/ha. El promedio histórico desde 1987 hasta 2016 para área cosechada fue de 117996 ha, para producción fue de 59,384Ton al año y para rendimiento fue de 0,50 Ton/ha, con una tasa de crecimiento de 0,4% en el área cosechada, de 0,51% en la producción y de 0,37% en los rendimientos (Agronet, 2019).

A nivel mundial hay un estimado de seis millones de productores de cacao (ICCO 2015) (3 ha en promedio) (CacaoNet 2012) con un área mundial destinada al cultivo de 9.915.969 ha que producen 4,6 millones de toneladas con rendimientos promedio de 4,6 t/ha (FAOSTAT 2018).

En términos generales, El 75% de los granos de cacao seco que se comercializan hoy en el mundo provienen de África Central y Occidental, el 12,2% se produce en el Sureste asiático y Oceanía, y América aporta el 13%. El mayor productor individual es Costa de Marfil (1,51 millones de toneladas), seguido de Ghana (1,025 t), Indonesia (440000 t), Nigeria (240000 t), Camerún (229000 t) y Brasil (200000 t) (ICCO 2015).

Los países que reportan mayor consumo son Estados Unidos, (800 mil toneladas) seguido de Alemania, Francia y Reino Unido y el mayor consumo por persona se presenta en Europa con cerca de 2 Kg al año por persona (Bélgica y Luxemburgo con 5,4 y 4,5 Kg por persona año), seguido por el continente americano (1,3 Kg año) (Aranzazu et al. 2009; Fedecacao 2013).

3.2 El cadmio

El cadmio es considerado como uno de los elementos traza más tóxicos en el ambiente (Page et al. 1987; Nordic Council of Ministers 2003) porque además de su naturaleza ubicua (Filipič 2012), tiene efectos tóxicos en plantas (Siedlecka A 1996) y carcinogénicos, embriotóxicos, teratogénicos, y mutagénicos en humanos (Byrne et al. 2009; Joseph 2009; Filipič 2012) y animales (Kirkham 2006).

El cadmio en los suelos agrícolas se presenta a partir de fuentes naturales y antrópicas. Las concentraciones de cadmio en suelos agrícolas dependen parcialmente de las cantidades presentes en la roca madre de las que se forma el suelo (Page et al. 1987; Robson et al. 2014). Se ha estimado que la concentración natural promedio de cadmio en la litósfera es de 0.098 mg.kg^{-1} (Han 2007). Las rocas sedimentarias contienen mayores concentraciones de cadmio que las ígneas o metamórficas y en consecuencia, se cree que suelos recientes derivados de roca sedimentaria, como los presentes en muchas regiones de Colombia, podrían tener mayores concentraciones de cadmio que las derivadas de rocas ígneas o metamórficas (Page et al. 1987).

Por su parte, los suelos agrícolas están continuamente expuestos al cadmio por la aplicación de lodos y particularmente fertilizantes fosfatados ($140 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ P}$ (European Commission 2000), que elevan las concentraciones de cadmio en cultivos y en suelos hasta 20 veces (Mann et al. 2002; Bonomelli et al. 2003).

Se estima que el rango de liberación de cadmio a los suelos se encuentra entre 9,9 y 45 toneladas aproximadamente cada año en el mundo (Kabata-pendias and Pendias 2001; Han 2007). En el suelo, el cadmio puede combinarse con otros elementos y formar compuestos tales como cloruros, óxidos y sulfuros, los cuales se unen fuertemente a las partículas del suelo permaneciendo en él entre 15 y 30 años (Maruthi et al. 2005; Dharmawardana 2018). Así, una concentración de cadmio en los suelos entre 0 y 1 mg.kg^{-1} se considera normal, entre 1 y 3 mg.kg^{-1} se considera ligeramente contaminado y de 3 mg.kg^{-1} en adelante se considera contaminado (Irfan et al. 2013).

No obstante, la disponibilidad del metal en el suelo, más que su concentración total, es la principal preocupación, porque la concentración disponible es un indicador de la cantidad disponible para la absorción de la planta (Davis 1984; Kirkham 2006). Los factores que afectan la biodisponibilidad de los metales incluyen: 1) el pH del suelo y potencial redox, 2) las propiedades químicas del metal, 3) las propiedades biológicas del suelo, y 4) el clima (Fischerová et al. 2006; Mclaughlin 2016).

Las raíces son la principal vía a través de la cual el cadmio entra a la planta (Ge et al. 2012). Esta absorción de cadmio puede ocurrir como complejos inorgánicos de CdCl^+ , CdCl_2 , CdSO_4 o como complejos orgánicos tales como los fitometaloforos (Irfan et al. 2013). La absorción de cadmio a través de la membrana plasmática de las células de la raíz se controla por las diferencias en el potencial electroquímico entre la actividad de Cd^{2+} en el citosol y la del apoplasto de la raíz (Song et al. 2017).

No se ha reportado un mecanismo específico de absorción o transporte de cadmio (Irfan et al. 2013) por lo que se considera que el cadmio puede utilizar los mismos transportadores usados para la absorción de nutrientes vegetales esenciales (Mendoza-Cózatl et al. 2011). Adicionalmente, el cadmio puede penetrar utilizando transportadores de otros metales tales como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} . (Clemens et al. 2002; Irfan et al. 2013). Es por esto que el cadmio es un potente antagonista de otros cationes como Zn y Cu; por ejemplo, en cacao, el cadmio afecta la absorción de Zn, Mn y Fe (Cryer and Hadley 2012).

Las concentraciones de cadmio en los cultivos de la cadena alimentaria varían entre y dentro especies. Las investigaciones conducidas en el pasado han demostrado que las variaciones observadas son debidas a diferencias en las concentraciones de cadmio presentes en el suelo, diferencias en las condiciones de crecimiento entre las regiones donde los cultivos crecen, en la estación de crecimiento, diferencias en los cultivares de un cultivo particular, y diferencias en las propiedades físicas y químicas del suelo (Page et al. 1987; Mclaughlin 2016). De igual forma, existen variaciones en las concentraciones de metales pesados entre órganos de la misma planta (Moral et al. 1994; Ramtahal et al. 2016), por ejemplo, la planta de cacao absorbe ligeramente los metales pesados que existen por naturaleza en los suelos y los concentra en sus semillas (Augstburger et al. 2000; Arévalo-Gardini et al. 2017).

3.3 Estrés por Cd en las plantas

El cadmio produce varios tipos de efectos en las plantas que están sometidas a este metal pesado. La literatura refiere efectos como los hormonales y los enzimáticos (Seregin and Ivanov 2001). A nivel hormonal, se ha demostrado en varias plantas que hay un aumento en la concentración de ácido jasmónico, de etileno (Irfan et al. 2013), de ABA (Hsu and Kao 2008), y de ácido salicílico (López-Climent et al. 2011).

A nivel bioquímico, el cadmio restringe el metabolismo primario, particularmente a nivel de las enzimas del ciclo de Krebs y de la fotosíntesis (Irfan et al. 2013). Este efecto obedece a la modificación en la funcionalidad de las enzimas debido a la modificación de su estructura nativa o de la sustitución de un elemento esencial (Miransari 2011).

Otras respuestas relacionadas con el efecto del cadmio en la fotosíntesis incluyen alteraciones en la división y expansión del cloroplasto, daño la forma del organelo y en la disposición del sistema tilacoidal, variaciones en la relación clorofila/carotenoides y efectos negativos en el proceso de fijación de carbono e intercambio gaseoso (Andrade et al. 2010; Irfan et al. 2013; Hussain et al. 2019). Adicionalmente, el cadmio ha sido relacionado con alteraciones en el estado hídrico de las plantas (Seregin and Ivanov 2001). Consecuentemente, estos daños en los procesos fotosintéticos y en el estado hídrico causan aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en tejidos fotosintéticamente activos (Siedlecka A 1996).

Uno de los principales efectos del cadmio en las plantas es el estrés oxidativo causado por el aumento en la producción de ERO y la disminución de la capacidad antioxidante debido a la inhibición de enzimas antioxidantes lo que produce peroxidación de lípidos, desintegración de membranas, aumento en la permeabilidad membranal, degradación de ácidos nucleicos, y eventualmente la muerte celular (Liu et al. 2011; Ge et al. 2012; Grobelak et al. 2019).

A nivel de crecimiento, el cadmio produce aberraciones de la mitosis causando inhibición de la proliferación y división celular en meristemos lo que trae como consecuencia el retraso en el crecimiento de la parte aérea y especialmente de la raíz, por lo que se considera como el primer síntoma macroscópico de toxicidad por cadmio en las plantas (Seregin and Ivanov 2001; Shah et al. 2019).

Otros síntomas de toxicidad por cadmio incluyen clorosis, necrosis, enrojecimiento de las venas y síntomas de deficiencia de nutrientes esenciales, especialmente Fe, Zn, Mn, Cu, P, K, Ca, Mg y S porque disminuye su absorción lo que, en algunos casos, es debido a su competencia por similitud de características químicas con el cadmio o a inhibición de enzimas relacionadas con la asimilación de nutrientes (Lin and Aarts 2012; Irfan et al. 2013; Hussain et al. 2019).

Las plantas pueden responder de varias formas a la presencia de cadmio en el sistema. Entre estas respuestas están la inmovilización, la exclusión citoplasmática, la síntesis de glutatión, fitoquelatinas y metalotioneínas, la compartimentalización y la disminución del estrés oxidativo.

La inmovilización se presenta principalmente a nivel de la raíz; allí, por cuenta de la gran cantidad de cargas negativas presentes, el cadmio puede ser inmovilizado por la pared celular y por carbohidratos extracelulares (mucílago y calosa) (Sun et al. 2013; Huybrechts et al. 2017). La glutatión (GSH) contribuye al mantenimiento del potencial redox a través de la oxidación reversible de su grupo tiol. Las fitoquelatinas (PC) se sintetizan en respuesta a la presencia de cadmio. Su función se basa en la formación de complejos, particularmente entre los grupos tiol y el Cd para evitar que este circule de forma libre dentro del citoplasma (Sun et al. 2013). Tanto la GSH como las FC son péptidos compuestos principalmente por glutamina y cisteína. De hecho, las FC son sintetizadas a partir de la adición continua de GSH acompañada de la exclusión de glicina por parte de la enzima Fitoquelatina Sintetasa. Las metalotioneínas son proteínas con alto contenido de cisteína que, al contener grupos tiol, confiere la capacidad de quelación de metales y protección frente a estrés oxidativo.

La exclusión citoplasmática consiste en facilitar que el cadmio salga del citoplasma a través de la síntesis de proteínas transportadoras que facilitan su salida de este hacia el apoplasto o la vacuola (Brunetti et al. 2015; Lu et al. 2017; Song et al. 2017). Este último fenómeno se denomina compartimentalización vacuolar o secuestro de cadmio. Esto también evita la libre circulación del cadmio en el citoplasma. De hecho, los complejos Cd^{2+} -PC y se transportan en contra de gradiente a través del tonoplasto hacia la vacuola a través de transportadores específicos. El cadmio libre también puede ingresar a la vacuola a través de un antiporte $Cd^{2+}/2H^{+}$. Una vez en la vacuola el cadmio es quelatado por citrato, oxalacetato o malato.

La disminución del estrés oxidativo está determinada por la síntesis de moléculas y enzimas antioxidantes (Huybrechts et al. 2017). Las moléculas de mayor importancia son la GSH y el ascorbato, en tanto que las enzimas con actividad antioxidante son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la ascorbato peroxidasa. Estas últimas contribuyen a la reducción de las especies libres de oxígeno a través de su reducción secuencial para disminuir el daño potencial en el ADN, en proteínas y en membranas.

3.4 El estrés por déficit hídrico en la agricultura

Actualmente, la escasez de agua es un factor común en el mundo y se espera que el cambio climático acelere la severidad de los episodios de déficit hídrico (Omirou et al. 2013), en especial, por el incremento en la concentración atmosférica del CO₂ que posiblemente se duplicará en el próximo siglo (IPCC 2001; Li et al. 2017).

En este escenario, el uso del agua para la agricultura es limitado (Omirou et al. 2013) produciéndose un aumento de las áreas afectadas por el déficit hídrico, lo que causa pérdidas importantes en los cultivos, reduciendo los rendimientos promedio en más de un 50% (Maggio et al. 2000; Zlatev and Yordanov 2005; Araújo 2015). Este efecto en la agricultura se debe a que el déficit hídrico es el estrés abiótico que más afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yang *et al.* 2008).

En las plantas, el agua cumple un papel preponderante por diferentes razones. Su carácter polar le confiere la posibilidad de disolver y movilizar iones y metabolitos orgánicos (Taiz and Zeiger 2010). De igual forma, es esencial para el transporte de nutrientes, carbohidratos y hormonas (Marschner 2011). Tiene un papel estructural tanto en la integridad de la membrana plasmática como en la presión de turgor (1 ~ 5Mpa) que genera a nivel celular y que permite la expansión celular y el soporte en plantas herbáceas (Kirkham 2005; Bacelar et al. 2012).

El estrés por déficit hídrico tiene efectos a diferentes niveles. A nivel fisiológico, hay cambios en la turgencia y en el potencial hídrico, lo que causa variaciones en la conductancia estomática, reduce la difusión, la absorción y el transporte de nutrientes desde la raíz a la parte aérea debido a la disminución en la tasa de transpiración, al daño en el transporte activo y a la alteración de la permeabilidad de las membranas (Sardans et al. 2007), también hay disminución en las concentraciones internas de CO₂ y por lo tanto,

menor actividad de carboxilación en la fotosíntesis (Castro et al. 2015; Pirovani et al. 2017). A nivel bioquímico, disminuye la actividad fotoquímica de la fotosíntesis, la respiración, la translocación de asimilados, la actividad de rubisco y se modifican las concentraciones de metabolitos secundarios asociados con el estrés (Jaleel et al. 2008). A nivel molecular, varios genes se expresan, principalmente los asociados a la síntesis de ácido abscísico y de proteínas específicas de respuesta al estrés (Yoshida et al. 2014). Consecuentemente, y como resultado de la intensidad o duración del déficit hídrico, las respuestas de las plantas en términos de crecimiento, puede ser severamente afectado (Tardieu et al. 2011).

Las adaptaciones de las plantas al estrés por déficit hídrico se pueden clasificar en escape, evasión y tolerancia. El escape consiste en la capacidad de la planta de completar su ciclo de vida en un periodo de tiempo en el que no se presenta la sequía (Farooq et al. 2012), así las plantas pueden tener un desarrollo fenológico rápido o una dormancia extendida (Nilsen and Orcutt 1996). La evasión consiste en una serie de mecanismos dirigidos a mantener el potencial hídrico alto y por lo tanto de posponer la deshidratación (Bacelar et al. 2012); así, las plantas pueden disminuir la conductancia estomática, disminuir el área foliar, moderar la temperatura foliar, incrementar la densidad, profundidad y conductividad de raíces. La tolerancia implica mecanismos que permiten la sobrevivencia de la planta manteniendo un potencial hídrico bajo; así, las plantas pueden realizar ajuste osmótico, aumentar o disminuir el modulus elasticus y disminución del volumen celular y de plasmodesmos (Nilsen and Orcutt 1996). Por otra parte, se considera que la verdadera resistencia al estrés por déficit hídrico se presenta en las plantas cultivables que son capaces de mantener altos rendimientos aun en condiciones de restricción en el suministro de agua (Farooq et al. 2012).

3.5 El estrés combinado: Cadmio y déficit hídrico

En la naturaleza, las plantas están sometidas a una combinación de estreses, los cuales pueden suceder de forma simultánea o en diferentes momentos a lo largo del ciclo de vida (Ellouzi et al. 2013). De hecho, se considera que los estudios de estreses combinados son más realista que aquellos enfocados en estreses individuales, sin embargo, estos últimos son más abundantes en razón a que

permiten un manejo estadístico y una interpretación más sencilla (Nilsen and Orcutt 1996).

Se han desarrollado varias investigaciones que estudian de forma particular el efecto combinado del cadmio y del déficit hídrico. A pesar de no haber un número abundante de estos estudios, el interés por este tema ha venido creciendo en los últimos años, justamente motivado en su uso potencial en procesos de fitoremediación (Azizian et al. 2013). En general, se ha encontrado que en las primeras etapas de crecimiento en ciclos de vida cortos, el déficit hídrico puede reducir la translocación de Cd hacia la parte aérea de la planta; sin embargo, cuando se consideran periodos de tiempo mayores, esta respuesta inicial puede cambiar (Liu et al. 2017).

Un aspecto interesante de la interacción entre estos dos estreses radica en que hay mecanismos de respuesta de las plantas a estos dos estreses que parecen converger. Oono et al. (2014) determinaron que la señalización del estrés por cadmio controla la expresión de genes en las vías de señalización del estrés por déficit hídrico en estrés. Los autores sugieren que las respuestas al Cd en el arroz, han sido desarrolladas como resultado de adaptación a otros estreses. De hecho, actualmente se ha acuñado los términos “memoria del estrés” o “tolerancia cruzada” al fenómeno por el cual la pre-exposición de una planta a un estrés, por ejemplo, al déficit hídrico, al cadmio o a la salinidad, resulta en un menor estrés oxidativo en la subsecuente exposición a la salinidad (Ellouzi et al. 2013). De hecho, las plantas halófitas parecen tener una tolerancia aumentada a otros estreses (Shiri et al. 2015).

3.6 Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA)

Los HFMA son hongos simbiotes obligados que necesitan de la planta hospedera para completar su ciclo de vida (Borde et al. 2011), colonizan aproximadamente el 90% de las especies vegetales de la tierra (Gadkar et al. 2001) y la mayoría de especies cultivables (Smith and Read 2008). Pertenecen al phylum Glomeromycota cuyo origen se presume fue hace al menos 460 millones de años (Gadkar et al. 2001; Schüßler et al. 2001; Redecker 2002; Strullu-Derrien et al. 2018) por lo que son considerados como el grupo más antiguo de organismos que viven en simbiosis con las plantas terrestres (Redecker 2002).

Las micorrizas se definen como las asociaciones entre los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y las raíces de las plantas y son conocidas por ser una de las estrategias de la planta, más antigua y extendida, para aumentar la absorción de nutrientes y enfrentar estreses bióticos y abióticos, incluyendo el déficit hídrico (Augé 2001; Porcel and Ruiz-Lozano 2004; Yang et al. 2008; Navarro García et al. 2011; Gholamhoseini et al. 2013; Wu et al. 2013). La interacción se basa principalmente en el intercambio de azúcares hexosas (y xilosa), suministrado, por la planta hospedera y de nutrientes suministrados por el hongo (Bago et al. 2000; Brundrett 2002; Wu and Xia 2006; Deressa and Schenk 2008; Atul-Nayyar et al. 2009). Recientemente se ha encontrado los HFMA dependen de la planta hospedera para la adquisición de lípidos (Bravo et al. 2017; Jiang et al. 2017; Keymer et al. 2017)) lo cual indica que el establecimiento de la simbiosis no solo requiere de azúcares sino también de la transferencia de lípidos desde la planta hospedera.

Los HFMA pueden facilitar la supervivencia de plantas en suelos contaminados por metales pesados disminuyendo su toxicidad a través del mejoramiento de mecanismos antioxidantes (Ferrol et al. 2016), modificando 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; Garg et al. 2017).

De forma particular, los HFMA mejoran la fito-estabilización y la fito-extracción (Leung et al. 2013) debido a que pueden quelatar los metales pesados en su estructura o aumentar el suministro de metales pesados hacia la planta, respectivamente (Hassan et al. 2013). La función de aumento o disminución de la absorción de metales pesados parece depender de la especie de la planta y/o del hongo involucrado, así como de la concentración, especiación del metal pesado en el suelo y las condiciones de crecimiento (Audet and Charest 2007, 2008; Lingua et al. 2008).

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; Fernández-Lizarazo and Moreno-Fonseca 2016). 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 and 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 (Ruiz-Lozano 2003; Porcel and Ruiz-Lozano 2004; Wu and Xia 2006), iii) incremento en la actividad antioxidante de la planta (Goicoechea et al. 2005) (Goicoechea et al. 2005) y iv) aumento en la absorción de nutrientes de la planta (Al-Karaki 2006).

3.7 Variabilidad genética intraespecífica en los HFMA

El estancamiento morfológico por más de 400 millones de años (Redecker 2000; Strullu-Derrien et al. 2018) y la falta de un estado sexual observado en los miembros del filo Glomeromycota dirige a la suposición controversial de que los HFMA son organismos completamente asexuales (Croll and Sanders 2009; Halary et al. 2011) y que no tienen ninguna manera para realizar intercambio genético o recombinación (Sanders and Croll 2010). La evidencia de recombinación en HFMA es contradictoria (Croll and Sanders 2009), lo que ha producido cuestionamientos importantes acerca de la variación genética en HFMA. Uno de los principales, es precisamente el relacionado su organización genética intranuclear.

Dos modelos pueden explicar la organización de la variación genética en los HFMA (Figura 3.1). En el primero, se plantea que todas las variantes de ADNr pueden estar contenidas en cada uno de los cientos de núcleos que pueden tener estos hongos con hifas cenocíticas². Esto implica la organización homocariótica de la variación genética producto de una relajación de la evolución concertada del ADNr en el linaje. Adicionalmente, en la ausencia de la reproducción sexual en Glomeromicota, la poliploidización del genoma acompañada por cambios periódicos en el nivel de ploidía, podría ser el mecanismo responsable de su persistencia evolutiva en el largo plazo (Pawlowska and Taylor 2004). Finalmente, se ha asumido que los mecanismos de incompatibilidad evitan la fusión entre HFMA genéticamente diferentes (Judson and Normark 1996).

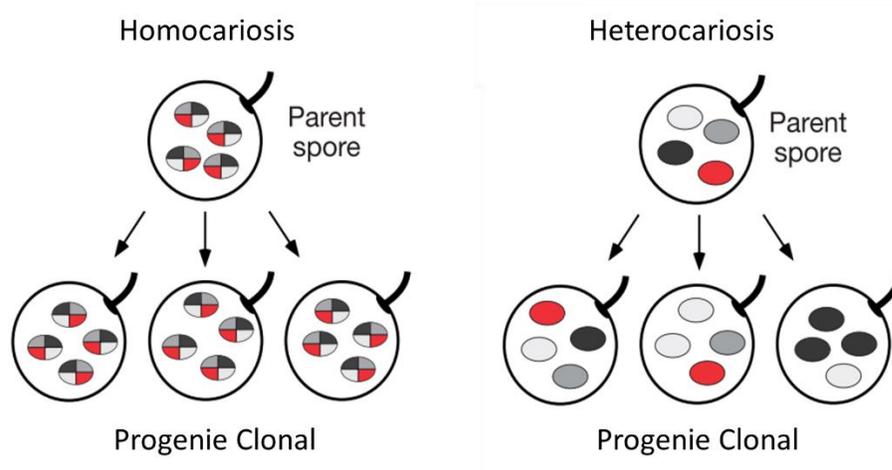


Figura 3.1. Dos modelos diferentes que explican la organización nuclear en los HFMA. Tomado de (Pawlowska & Taylor, 2004)

Este primer modelo ha sido cuestionado por diferentes hallazgos que demuestran que ocurre la fusión de hifas, que la progenie exhibe herencia biparental y que se puede detectar la recombinación en HFMA (Sanders and Croll 2010; Nadimi et al. 2016; Corradi and Brachmann 2017; Chen et al. 2018). Por consiguiente, el segundo modelo se basa en que las diversas variantes de ADNr pueden estar distribuidas entre diferentes núcleos (heterocariosis), así el hongo mantiene un ensamblaje estable de varios diferentes

² Estado en el cual los núcleos no están separados en compartimentos por septos y co-existen en un citoplasma común (Sanders and Croll 2010).

genomas durante su ciclo de vida y los transmite de generación en generación (Bever and Morton 1999; Kuhn et al. 2001; Chagnon 2014).

Recientemente se han demostrado los dos principales procesos relacionados con la variación genética entre individuos de la especie *R. irregularis* que pueden afectar el contenido de nucleotipos³ de un hongo FMA en un muy corto lapso de tiempo (Croll et al. 2009; Angelard et al. 2010; Wyss et al. 2016). El primero consiste en el intercambio genético entre dos líneas del HFMA genéticamente diferentes que pueden producir nuevas esporas con una mezcla de nucleotipos parentales (Croll et al. 2009). El segundo es la segregación, en el que una espora madre puede producir esporas nuevas con diferente contenido de nucleotipos (Angelard et al. 2010).

³ Definido como el genotipo de un núcleo dado (Sanders and Croll 2010).



4. Respuesta fisiológica de plantas de cacao al déficit hídrico cuando son inoculadas con HFMA

4.1 Introducción

El cacao (*Teobroma cacao* L.), es una especie vegetal de sotobosque que ha evolucionado en la Amazonía desde hace millones de años (Motamayor et al. 2008; CacaoNet 2012; Lim 2012). Esta planta hidromegaterma, (Fedecacao 2009; CEPLAC 2012) se puede establecer bajo sombra plantada, en bosques raleados o en remanentes de bosque con poca inversión de capital durante las fases de establecimiento y mantenimiento (Gockowski and Sonwa 2008; Sonwa and Weise 2008). También puede ser establecido en monocultivo (Carr and Lockwood 2011) lo que se asocia generalmente con mayores rendimientos a corto plazo pero también con una reducción en los beneficios ecológicos y con un aumento en los costos que hace que este sistema no sea viable para los pequeños productores (Clough et al. 2009).

Actualmente, la escases de agua es predominante en el mundo y se espera que el cambio climático acelere la severidad de los episodios de déficit hídrico en la agricultura (Omirou et al. 2013), que actualmente causa pérdidas importantes en los cultivos, reduciendo los rendimientos promedio en más de un 50% (Maggio et al. 2000; Wang et al. 2003; Zlatev y Yordanov 2005). Este efecto en la agricultura se debe a que el déficit hídrico es el estrés abiótico que más afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yang et al. 2008).

La producción del cacao en el mundo se ha caracterizado por rendimientos bajos e inestables (Clough et al. 2009; FAOSTAT 2018). 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 (Anga 2012), hacen que los productores siembren en zonas marginales a libre exposición sometiendo a las plantas a déficit hídrico (Läderach et al. 2013). Consecuentemente, se espera que en los próximos

años, a causa del cambio climático, se presente una disminución en los rendimientos del grano de hasta un 40% (Lau et al. 2013).

Debido a la existencia en Colombia de amplias zonas aptas para el cultivo de cacao que pueden tener o no cobertura de bosque (García Lozano et al. 2005) y a que el cacao tiene mayores rendimientos potenciales cuando es sembrado a libre exposición, es posible encontrar este cultivo no solo en sistema agroforestal y en sotobosque sino también a libre exposición con rendimientos bajos, y en el caso particular de Colombia porque los productores de cacao normalmente carecen de recursos económicos para establecer sistemas de riego que permitan superar las carencias hídricas de las plantaciones de cacao sembradas a libre exposición o incluso bajo sombrero en épocas secas (Gobernación de Casanare 2008).

Según García, (2014), la información sobre los requerimientos hídricos, los mecanismos de tolerancia, aclimatación o adaptación a condiciones críticas de sequía temporal de clones de cacao en Colombia, es limitada a experiencias no documentadas en plantaciones comerciales. El mismo autor resalta la importancia de realizar trabajos de investigación que contribuyan a su entendimiento.

Los hongos FMA son simbioses obligados que necesitan de la planta hospedera para completar su ciclo de vida (Borde et al. 2011), colonizan aproximadamente el 90% de las especies vegetales de la Tierra (Gadkar et al. 2001) y la mayoría de especies cultivables (Smith and Read 2008). Pertenecen al phylum Glomeromycota cuyo origen se presume fue hace al menos 460 millones de años (Gadkar et al. 2001; Schüßler et al. 2001; Redecker 2002) por lo que son considerados como el grupo más antiguo de organismos que viven en simbiosis con las plantas terrestres (Redecker 2002).

Las micorrizas se definen como las asociaciones entre los hongos FMA y las raíces de las plantas (Wu and Xia 2006) y son conocidas por ser una de las estrategias de la planta, más antigua y extendida, para aumentar la absorción de nutrientes y enfrentar los estreses ambientales (Caravaca et al. 2005; Brachmann and Parniske 2006). La interacción se basa principalmente en el intercambio de carbono suministrado por la planta hospedera y de nutrientes suministrados por el hongo (Bago et al. 2000; Brundrett 2002; Wu and Xia 2006; Deressa and Schenk 2008; Atul-Nayyar et al. 2009) . Recientemente se ha reportado que los HFMA dependen de la planta para el suministro de lípidos (Bravo et al. 2017; Jiang et al. 2017; Keymer et al. 2017) dado que no los pueden sintetizar.

Los hongos FMA permiten a las plantas hospederas establecerse y crecer más eficientemente aún en condiciones de diferentes estreses bióticos y abióticos, incluyendo el déficit hídrico (Augé 2001; Porcel and Ruiz-Lozano 2004; Cho et al. 2006; Yang et al. 2008; Navarro García et al. 2011; Gholamhoseini et al. 2013) debido a que aumentan la tolerancia a estas condiciones y así minimizan sus efectos adversos en el crecimiento vegetal (Barea et al. 2011; Mardukhi et al. 2011; Asensio et al. 2012).

La pregunta de investigación que se abordó en este capítulo es ¿Cuál es la respuesta fisiológica de plantas de cacao inoculadas con HFMA, cuando son sometidas a déficit hídrico? No obstante, para responder a esta pregunta es necesario resolver tres preguntas parciales cuya respuesta contribuirá a dar una respuesta sólida a la pregunta inicial. Estas preguntas son: i) ¿Cómo varía el efecto del estrés hídrico en plantas de cacao, a lo largo del periodo de vivero?; ii) ¿Existen diferencias en la sensibilidad de los parámetros asociados con la determinación del estrés hídrico en plantas de cacao asociadas con HFMA en vivero a lo largo del día?; iii) ¿Cuáles son los parámetros más sensibles para estudiar el efecto del estrés hídrico en plantas de cacao inoculadas con hongos MA en vivero?. La respuesta a esta última pregunta es especialmente importante porque adicionalmente ofrece información para facilitar la posterior evaluación del estrés hídrico en plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA.

4.2 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. En todos los casos se buscó simular las características generales del establecimiento en vivero de plantas de cacao y de la forma como realizan esta actividad. 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. El vivero fue construido específicamente para la realización de los experimentos. Se utilizó una polisombra de 60% y adicionalmente un plástico para invernadero calibre 6. Durante la realización de los experimentos, este vivero tuvo una temperatura promedio de 26,27 °C, una humedad relativa promedio de 84%, punto de rocío promedio de 22,36 °C. La radiación instantánea promedio al exterior del vivero oscila entre

175 y 225 Wm⁻² (Castro and Sosa 2016) y la radiación al interior del vivero se redujo en un 70% aproximadamente. Los valores en tiempo real al exterior del vivero se presentan en:

<https://www.weatherlink.com/embeddablePage/show/87626777376541e5b4fb2b2c813d34ba/wide>

Se utilizó semilla de cacao del genotipo IMC67 (Iquitos Mixed Calabacillo-67) como fuente de material vegetal debido a que en Colombia solo se permiten semillas obtenidas de plantaciones híbridas de este material según acuerdo 003 del Consejo Nacional Cacaotero en 2010. Este genotipo es un clon auto-incompatible que y tiene niveles muy bajos de inter-compatibilidad como madre y como padre (Phillips-mora et al. 2012). Adicionalmente es muy utilizado como patrón, debido a su buena adaptación a suelos con pH bajo, buena transmisión de vigor vegetativo a la copa y a poseer tolerancia a enfermedades (Palencia and Mejía 2004; Palencia et al. 2007) como *Phytophthora palmivora* (Butler) (Cárdenas 2017).

Las plantas de cacao se sembraron en bolsas de 15 x 35 cm con sustrato compuesto por una proporción de 1:1 de compost y arena con base en ensayos previos e imitando el manejo de productores de la zona. Se realizó una fertilización foliar con fertilizante comercial Nutrifoliar® y una edáfica a los 30 días después de siembra (DDS) con base en el análisis de suelo (Tabla S 4.1) y en la dosis sugerida por Fernández et al. (2016) (Anexo A). 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.

Como inoculante micorrícico se utilizó un gel estéril patentado (patente sostenida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, España) y producido con una concentración media total de 2000 propágulos por ml de *Rhizophagus irregularis* (ecotipo 009) (esporas, hifas extra-radicales y piezas de raíces micorrizadas) previamente producido en condiciones *in vitro* (Ceballos et al. 2013; Rasmussen et al. 2016).

En los experimentos del presente capítulo y del capítulo número cinco, no se implementó un tratamiento control a base del gel estéril sin hongo FMA debido a que no se conoce la composición química de este gel y a que los experimentos fueron realizados en condiciones reales de campo, lo que implica factores ambientales adicionales. Así, la interacción entre estos factores no haría posible un análisis que respondiera a la pregunta que motivó esta investigación.

La inoculación consistió en la adición una solución de 10 ml de agua destilada que contenía 250 propágulos. Esto se realizó 15 días después de la siembra (DDS) de la semilla. El criterio para el tiempo de inoculación se basa en que, por una parte, los productores de cacao normalmente no adicionan productos al momento de la siembra de la semilla; y por otra parte, el costo del producto comercial (Glomygel®) es alto lo que restringe su disponibilidad a semillas germinadas. Dado que las semillas se mantuvieron en almacenamiento entre 3 y 5 días, la reducción en su poder germinativo era probable. El tiempo aproximado para identificar las semillas que efectivamente germinaron fue 15 DDS porque en este tiempo al menos el 50% de las semillas han germinado o han mostrado síntomas de crecimiento (Olaiya 2016; Bahri 2018).

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

Ensayo 1: ¿Cómo varía el efecto del estrés hídrico en plantas de cacao, a lo largo del periodo de vivero?

Establecimiento del ensayo:

Se estableció un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x2. El primer factor incluyó la edad de las plantas evaluadas (2 meses y 7 meses) y el segundo factor incluyó el manejo del riego (con y sin riego) (Tabla 4.1). Cada tratamiento tuvo 20 unidades experimentales. Todas las plantas fueron sometidas a dos riegos consecutivos hasta capacidad de campo y luego, solamente a las del tratamiento *sin riego* se les restringió el suministro de agua de forma progresiva hasta llegar a un valor mínimo constante de humedad volumétrica previo a la muerte de las plantas. La humedad volumétrica se midió con una sonda tipo HH2 Delta T (Devices Ltd®). Simultáneamente se determinó el punto de marchitez permanente (PMP) a través de la realización de una curva que relacionó la tensión del suelo con su humedad volumétrica (Figura S 4.1). La medición de los parámetros fisiológicos se realizó semanalmente entre las 11 am y la 1 pm desde la primera semana y durante tres semanas, de acuerdo a la curva de tensión previamente mencionada.

Tabla 4.1. Tratamientos utilizados para la determinación del efecto de la restricción de riego y de la edad de la planta de cacao en vivero.

Tratamiento	Edad	Manejo
1	7 meses	Con riego
2	7 meses	Sin riego
3	2 meses	Con riego
4	2 meses	Sin riego

Ensayo 2: ¿Existen diferencias en la sensibilidad de los parámetros relacionados con el estrés hídrico en plantas de cacao asociadas con HFMA en vivero a lo largo del día?

Se estableció un diseño en bloques completamente aleatorizados con cuatro tratamientos en un arreglo factorial 2 x 2 (Tabla 4.2). El primer factor es la inoculación con hongos FMA (con inoculación y sin inoculación) y el segundo factor es el déficit hídrico (con déficit y sin déficit). El déficit hídrico correspondió a una humedad volumétrica de 6% (potencial mátrico del sustrato -1,5 MPa) en tanto que la ausencia de déficit hídrico correspondió a una humedad volumétrica de 12% (potencial mátrico del sustrato -0,033 MPa) o superior sin llegar a saturación con base en la curva de retención de humedad realizada previamente (Figura S 4.1). La restricción de riego comenzó a los 30 días después de siembra (DDS). Cada tratamiento tuvo 84 unidades experimentales distribuidos en cuatro bloques. Se realizaron mediciones independientes a los 43, 64 y 98 DDS y realizando registros cada tres horas durante el día (7:00 am, 10:00 am, 1:00 pm, 4:00 pm; 7:00 pm) con el propósito de evitar solapamiento entre los muestreos y así observar los contrastes potenciales durante el día.

Tabla 4.2. Tratamientos utilizados para la determinación del efecto de la restricción de riego y de la inoculación con hongos MA.

Tratamiento	Inoculación	Potencial mátrico del sustrato (MPa)
1	Con inoculación	-0,033 MPa
2		-1,5 MPa
3	Sin inoculación	-0,033 MPa
4		-1,5 MPa

Ensayo 3: ¿Cuáles son los parámetros descriptores de estrés, más sensibles para estudiar el efecto del estrés hídrico en plantas de cacao inoculadas con HFMA en vivero?

El planteamiento del ensayo fue el mismo del ensayo 2. No obstante varió en cuanto a que se utilizaron 20 unidades experimentales por tratamiento y a que las mediciones se realizaron semanalmente desde los 37 DDS por seis semanas siempre a las 10 am (con base en los resultados obtenidos en el ensayo 2 de este capítulo). La restricción de riego comenzó a los 44 DDS.

Los parámetros fisiológicos evaluados fueron los siguientes:

Potencial hídrico foliar (Ensayos 1, 3): 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 a Scholander, et al. (1965)).

Conductancia estomática (Ensayos 1, 2 y 3): Para su medición se utilizó un porómetro marca 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 del fabricante (Decagon device, 2016).

Índice de contenido de clorofilas (ICC) (Ensayo 1): 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 1, 2 y 3): Para la determinación del rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia máxima (Fv/Fm) se utilizó un fluorómetro no modulado Handy PEA Hansatech® a 3000 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron en dos hojas por plantas y en 4 plantas por tratamiento. Con el propósito de determinar parámetros con mayor sensibilidad, en el tercer ensayo se calcularon también rendimiento cuántico del PSII con base en la fluorescencia mínima (Fv/Fo), el índice de vitalidad con base en la absorción de energía (P_{abs}) y el índice de vitalidad total (PI_{total}).

Crecimiento: Se midió altura de planta, número de hojas (Ensayos 1) y biomasa seca total y por órganos (Ensayos 2). Para su determinación las muestras vegetales fueron sometidas a 70 °C por 24 horas o hasta peso constante. También se determinó el área foliar (Ensayos 1, 2 y 3) utilizando un medidor de área foliar Li-Cor LI 3100®. Adicionalmente se calculó el área foliar específica (AFE) de acuerdo a (Hunt 2013). Dado el carácter destructivo se realizó la medición de este parámetro en el último muestreo de cada ensayo en 12 plantas por tratamiento.

Nutrición (Ensayo 3): Se tomaron muestras foliares en cuatro plantas por tratamiento en el último muestreo del ensayo 3. Su análisis se hizo en el laboratorio de aguas y suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El N se analizó con el método Kjeldahl, el P por calcinación a 600°C y valoración colorimétrica con molibdato y vanadato de amonio, el B por el método de Azometina (colorimétrico) y el Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn por calcinación a 600°C, digestión ácida y valoración por absorción atómica y el S por análisis turbidimétrico de acuerdo a Fernández et al (2016).

Vigor (Ensayo 3): Se realizó una evaluación visual con base en la escala (Davies et al. 2001): 1) planta muerta; 2) todas las hojas marchitas con contenido de clorofila, hojas no totalmente necróticas; 3) al menos 50% de las hojas marchitas o senescentes; 4) marchitamiento inicial y/ clorosis; 5) planta saludable y hojas verdes. Solamente se presentan los datos a partir 65 DDS debido a que los muestreos previos todas las plantas tuvieron el mismo valor de escala (valor 5).

Colonización radical (Ensayos 1, 2 y 3): Su determinación se realizó en el último muestreo de cada ensayo en 8 plantas por tratamiento. Se seleccionaron raíces de menos de 2 mm 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 and Mosse 1980).

Potencial hídrico atmosférico (ψ_{atm}) y déficit de presión de vapor (DVP): La determinación de ψ_{atm} se realizó con base en Melgarejo (2010) y de DVP de acuerdo con Allen *et al.* (2006).

Se estimó el potencial de succión mátrica del sustrato a partir de su relación con el contenido de humedad volumétrica θ ($m^3 \cdot m^{-3}$) con base en una curva de retención de humedad. Para el cálculo se utilizó la ecuación de van Genuchten (1980).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP® (Statistical Analysis Systems Institute, versión 11). Previo al análisis de varianza (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 (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 cumplían con los supuestos de ANOVA incluso después de la transformación (Doubková *et al.* 2013). Para la evaluación de las categorías de vigor se realizó un análisis de regresión logística con una prueba Ji-cuadrado de razón de verosimilitud (Hosmer *et al.* 1988; Chan, 2004).

4.3 Resultados

En el primer ensayo se determinó que el potencial hídrico atmosférico fue en promedio de -94,18 MPa en tanto que el promedio del déficit de presión de vapor se estimó en 1,81 Kpa. A partir de la estimación de los parámetros de la curva de retención de humedad (van Genuchten, 1980), se estimó que para el sustrato utilizado, el punto de marchitez

permanente (PMP) fue 5,5%, la capacidad de campo (CC) fue de 12,12% y la humedad de saturación fue de 35,40% (Figura S 4.1).

La humedad volumétrica del sustrato varió significativamente a lo largo del periodo evaluado (figura 4.1, tabla S 4.2). El valor de esta humedad en los tratamientos con restricción de riego disminuyó progresivamente hasta el día 12 con un valor constante promedio de 5,4% en tanto que se mantuvo en un valor promedio de 19,47% en los tratamientos sin restricción de riego. Las plantas sometidas al déficit hídrico comenzaron a morir desde el día 21 cuando la humedad volumétrica del sustrato se ubicó por debajo del 5%, especialmente aquellas de siete meses de edad.

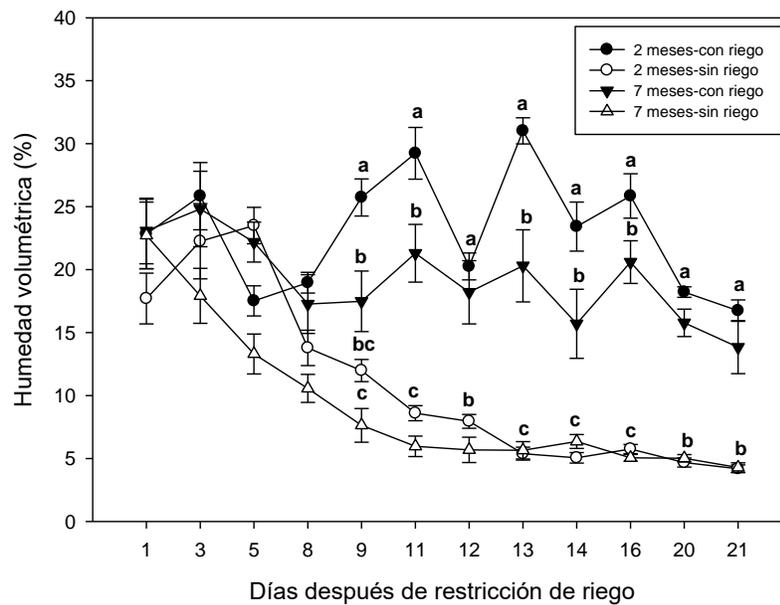


Figura 4.1. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo uno, n= 10. Las columnas representan las medias (\pm DE). Los marcadores identificados con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La variación en la humedad volumétrica del sustrato obedeció a un efecto significativo de la edad de la planta, del manejo del riego y de la interacción de estos con el tiempo (tabla S 4.2). La humedad del sustrato de las plantas de dos meses de edad con riego fue mayor que la del sustrato de plantas de siete meses de edad (con y sin riego), particularmente después de la primera semana luego de la restricción del riego (figura 4.1).

El potencial hídrico foliar y la conductancia estomática disminuyeron con la restricción de riego independientemente de la edad de las plantas (figuras 4.2a-b, tablas S 4.3 y 4.4). De forma interesante, el potencial hídrico mostró diferencias significativas desde el primer día después de la restricción de riego, sin embargo, el efecto fue más agudo cuando se incrementó el tiempo con esta restricción (Tabla S 4.4).

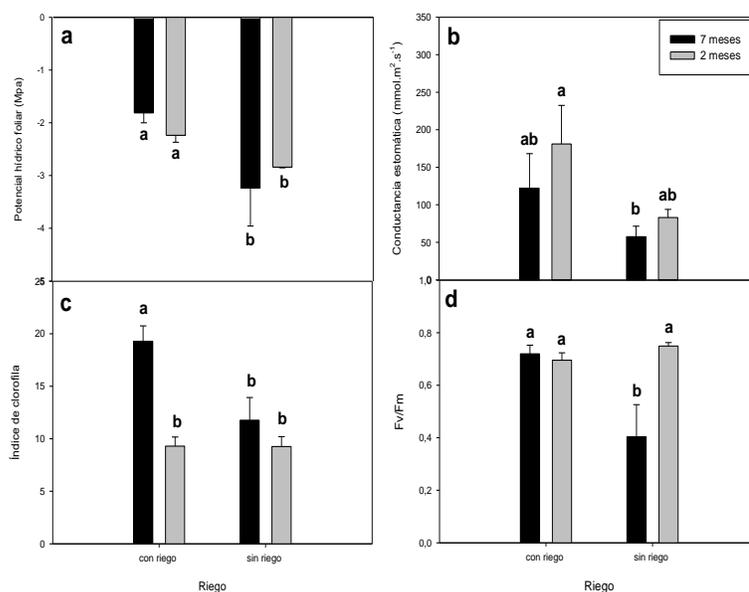


Figura 4.2. Efecto de la edad de la planta y de la restricción de riego. a) Potencial hídrico foliar, n=4; b) Conductancia estomática, n=4; c) Índice de clorofila, n=8; d) Fv/Fm, n=4. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El índice de clorofila fue diferente en plantas de cacao de edades distintas durante el periodo evaluado (Tabla S 4.5). Este índice en plantas de siete meses de edad fue un 46% mayor que el de plantas de dos meses de edad (Figura 4.2c). Por su parte, el efecto de la restricción de riego indujo una disminución en este índice en plantas de siete meses de edad a los 16 días después de la restricción de riego (DDRR) (Tabla S 4.5).

La edad de la planta y la restricción de riego tuvieron efectos ligeramente significativos y de forma esporádica sobre el Fv/Fm. No obstante, hubo una tendencia constante a que los valores de este parámetro fueran mayores en plantas de dos meses y en plantas sin restricción de riego (Tabla S 4.6). De hecho, en el día 12 DDRR se observaron valores

bajos en plantas de siete meses de edad y sometidas a restricción de riego con respecto a las plantas de los otros tratamientos (Figura 4.2d).

No se observó efecto de la restricción del riego en el área foliar ni en el número de hojas. En el caso del área foliar solamente se observaron diferencias significativas debido a la edad de las plantas (Tabla S 4.7) y en el caso del número de hojas solamente hubo efecto del tiempo (Tabla S 4.8).

Segundo ensayo

En el segundo ensayo se determinó que el potencial hídrico atmosférico fue en promedio de -22,66 MPa (Figura S 4.3) en tanto que el promedio del déficit de presión de vapor se estimó en 0,48 KPa. Durante la deshidratación progresiva, se observaron claras diferencias debidas al manejo del riego pero no a la inoculación con hongos FMA (Figura 4.3).

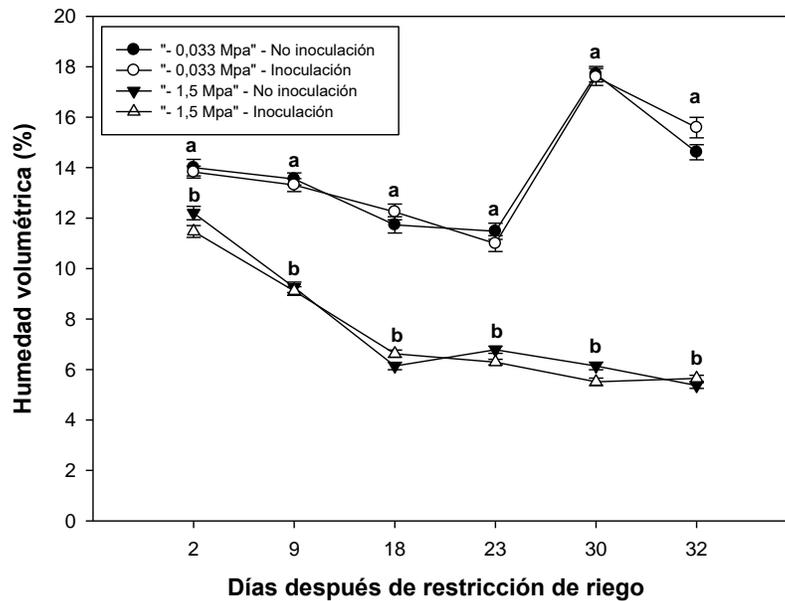


Figura 4.3. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo dos, n= 10. Las columnas representan las medias (\pm DE). Los marcadores identificados con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La conductancia estomática disminuyó progresivamente a lo largo del día en respuesta al potencial mátrico del suelo (Figura 4.4). Este parámetro no varió en respuesta a la interacción de la inoculación con el tiempo. Solamente se observó mayor conductancia estomática de plantas no inoculadas a las 7 p.m. a los 43 y 98 días después de siembra (DDS) (Tablas S 4.9, 4.10 y 4.11). De forma consistente, en los tres muestreos, la conductancia fue máxima al inicio del día, pero disminuyó progresivamente a lo largo del mismo. Igualmente, las plantas con menor humedad volumétrica en el sustrato presentaron menor conductividad estomática independientemente de la hora del día (Figura 4.4, Tablas S 4.9, 4.10 y 4.11).

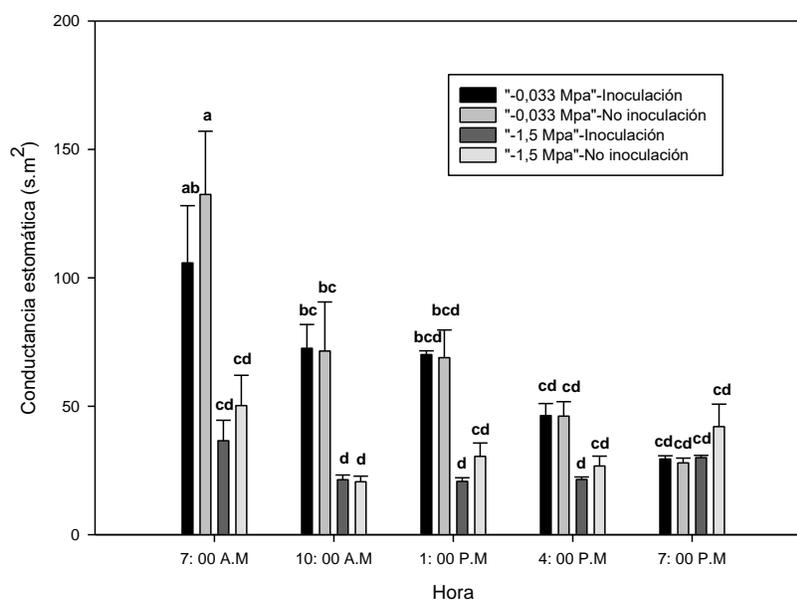


Figura 4.4. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la conductancia estomática a lo largo del día (24 DRRR – 64 DDS), n=4. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La F_v/F_m varió principalmente en respuesta al potencial mátrico del sustrato (Figura 4.5). En términos generales, no se detectó un efecto generalizado de la inoculación sobre la F_v/F_m (Tablas S 4.12, 4.13 y 4.14), a excepción del segundo muestreo (64 DDS) a las 4

p.m. en el que las plantas no inoculadas tuvieron mayor Fv/Fm que las no inoculadas. Por su parte, la disminución del potencial mátrico del sustrato indujo una disminución altamente significativa de la Fv/Fm, especialmente a los 64 y 98 DDS. De forma particular, en el último muestreo este efecto se observó de forma más consistente a lo largo del día.

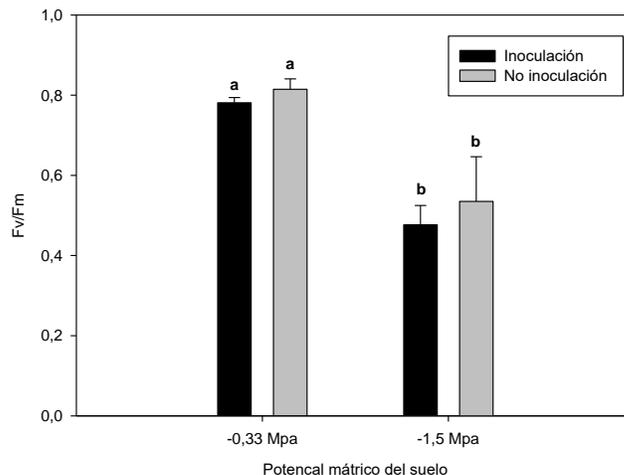


Figura 4.5. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la F_v/F_m , $n=4$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$).

En los dos últimos muestreos se evaluó el área foliar y la biomasa. Las plantas con déficit hídrico disminuyeron de forma significativa estos dos parámetros. De forma particular para la biomasa, el efecto fue significativo en cada uno de sus órganos. A los 64 DDS la relación raíz/parte aérea se incrementó en las plantas sometidas a déficit hídrico (Tablas S 4.15 y S4.16). No se observaron diferencias significativas en AFE ni entre plantas inoculadas y no inoculadas con respecto a área foliar ni biomasa.

Tercer ensayo

En el tercer ensayo se determinó que el potencial hídrico atmosférico fue en promedio de -47,58 MPa en tanto que el promedio del déficit de presión de vapor se estimó en 0,99 KPa. De igual forma a como se realizó el ensayo anterior, en este ensayo se mantuvo un potencial mátrico del sustrato de 0,033 MPa en las plantas con riego y de -1,5 MPa en el de las plantas con restricción de riego (Figura 4.6). Se registró la deshidratación progresiva del sustrato logrando un patrón similar al de los ensayos previos con lo que se obtuvo diferencias en la humedad del suelo debidas a la restricción de riego, al tiempo y a su

interacción (Tabla S 4.17). De acuerdo a los resultados de los experimentos previos, las mediciones fisiológicas se realizaron entre 10 a.m. y 11 a.m.

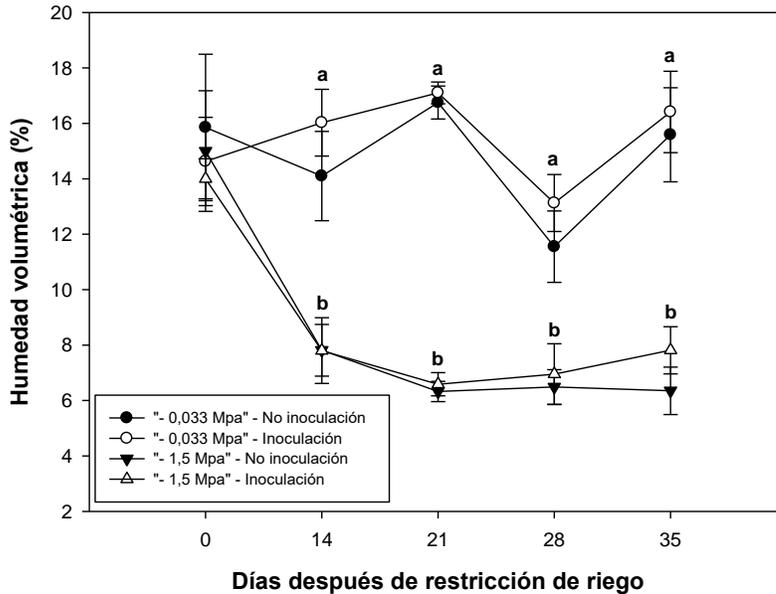


Figura 4.6. Humedad volumétrica del sustrato después de la restricción de riego en ensayo tres, $n = 10$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Los marcadores identificados con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El potencial hídrico de las plantas de cacao sometidas a restricción de riego disminuyó a través del tiempo de forma independiente a la inoculación con hongos FMA. A pesar de que solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas debidas a la restricción de riego solamente a los 72 DDS, hubo un efecto significativo del tiempo y de la interacción de este con dicha restricción lo que corresponde a la disminución progresiva del potencial hídrico foliar en plantas con restricción de riego (Tabla S 4.18). La inoculación no tuvo efecto sobre este parámetro.

La conductancia estomática fue menor desde la primera semana después de que las plantas de cacao fueran sometidas a restricción de riego. El efecto del riego se mantuvo a

lo largo del resto del experimento. De igual forma, hubo un efecto significativo del tiempo y de su interacción con el riego (Tabla S 4.19). No se detectaron efectos significativos de la inoculación con HFMA.

En este ensayo, la F_v/F_m y la F_v/F_o solamente variaron con respecto al tiempo, pero no como resultado del efecto de la inoculación o de la restricción de riego. Considerando el periodo de evaluación, el $P_{i_{abs}}$ fue mayor en plantas con riego constante, en tanto que el $P_{i_{total}}$ fue significativamente mayor en plantas con riego constante de forma particular a los 72 DDS (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre parámetros de fluorescencia, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (valor *F*).

	DDS	Inoculación	Pot. Hidric. Suelo	Inoculación x pot. Hidr. Suelo
Fv/Fm	58	1,55ns	0,27ns	1,47ns
	72	0,28ns	0,01ns	2,85ns
	Todo el periodo	2,66ns	0,29ns	2,47ns
	Interacción con el tiempo	0,93ns	0,03ns	0,92ns
	Efecto del tiempo			15,15**
Fv/Fo	58	1,11ns	0,46ns	2,54ns
	72	0,32ns	0,01ns	2,69ns
	Todo el periodo	2,46ns	0,50ns	4,08ns
	Interacción con el tiempo	0,36ns	0,03ns	1,25ns
	Efecto del tiempo			24,20***
Piabs	58	0,01ns	1,46ns	0,03ns
	72	0,18ns	2,56ns	0,04ns
	Todo el periodo	0,72ns	5,67*	0,01ns
	Interacción con el tiempo	0,20ns	0,61ns	0,15ns
	Efecto del tiempo			5,43*
Pitotal	58	0,26ns	0,10ns	0,03ns
	72	0,23ns	5,65*	0,42ns
	Todo el periodo	0,10ns	4,15ns	0,26ns
	Interacción con el tiempo	0,06ns	2,75ns	0,01ns
	Efecto del tiempo			2,86ns

Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo.

La evaluación nutricional, que se realizó a los 79 DDS, permitió determinar que las concentraciones de P, K y S variaron como resultado de la aplicación de los tratamientos (Tabla S 4.20). La concentración de P fue mayor en plantas con riego constante y no fue afectada por la inoculación. La concentración de K en plantas inoculadas y sometidas a restricción de riego fue mayor que en plantas inoculadas y sin restricción de riego, en tanto que sin inoculación no hubo diferencias entre las plantas que estuvieron o no, sometidas a restricción de riego (Figura 4.7). La concentración de S fue mayor en plantas no inoculadas que en las inoculadas (Tabla S 4.20).

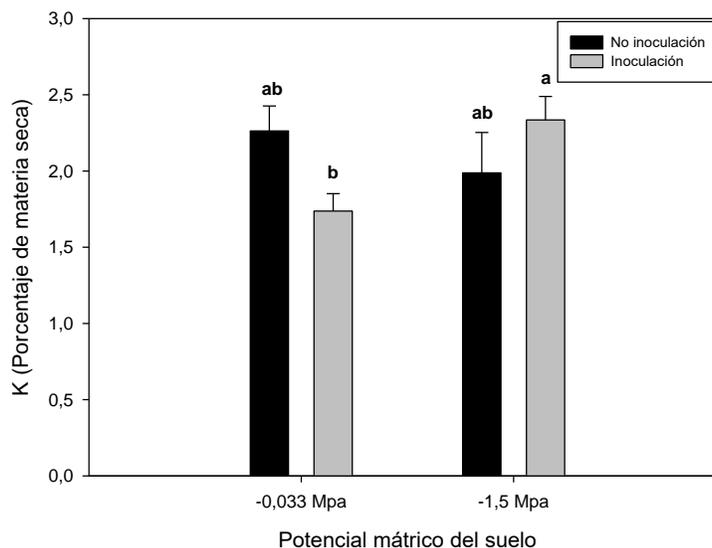


Figura 4.7. Efecto de la inoculación con hongos MA y de la restricción de riego sobre la concentración foliar de K, $n=4$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$).

El área foliar y el vigor disminuyeron debido a la restricción del riego, pero no variaron por la inoculación. En el primer caso, las plantas con riego constante presentaron un área foliar mayor que las que no lo tuvieron, lo cual se detectó solamente a los 65 DDS (Tabla S 4.21). Sin embargo, a los 72 DDS la tendencia fue similar a la observada a los 65 DDS con un $\alpha= 0,0592$. En el segundo caso, las plantas con riego constante también presentaron un vigor mayor a partir de los 65 DDS, que se mantuvo así hasta los 79 DDS (Tabla S 4.22). A los 65 DDS, se observó una interacción entre la inoculación y el riego debida a la disminución del vigor en plantas inoculadas solamente cuando estaban con restricción de riego. No se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas.

4.4 Discusión

El efecto del estrés hídrico en plantas de cacao es similar en diferentes etapas de su desarrollo en vivero, pero está modulado por el área foliar.

En el primer ensayo, los valores de humedad volumétrica en el sustrato indican que las plantas efectivamente estuvieron sometidas a estrés por déficit hídrico. Tanto la curva de humedad volumétrica obtenida por la restricción de riego, como la curva de retención de humedad del sustrato, de forma consistente, arrojaron un valor de PMP que oscila alrededor de 5% de humedad volumétrica y corresponde a un potencial mátrico de -1,5 MPa. Este último valor ha sido considerado de forma generalizada como el indicativo de PMP en los cultivos (Cadaña 2005; Saxton and Rawls 2006) y que se comprueba en este caso como indicativo en condiciones de campo.

La disminución del potencial hídrico y de la conductancia estomática en plantas sometidas a deshidratación obedece a la alta sensibilidad del cacao a condiciones variables de humedad y particularmente a la falta de agua (Araque et al. 2012; Lozano and Fonseca 2016). La disminución en el potencial hídrico foliar, se explica por la disminución en la disponibilidad de agua en el sustrato, lo que sumado al bajo potencial hídrico atmosférico, indujo a que el xilema estuviera sometido a mayores tensiones para la extracción de agua (Johnson and Ferrell 1983; Brodribb and Hill 2000). Una de las respuestas más comunes al déficit hídrico en plantas (Simonneau and Urban 2010; Martínez-vilalta and García-forner 2017) y particularmente en cacao (García Lozano, 2014; Rada, Jaimez, García Núñez, Azócar, & Ramírez, 2005) es el cierre de los estomas, lo que causa disminución en la transpiración estomática. Para este ensayo se evidenció esta disminución en la conductancia estomática, no obstante, esta medición sólo se realizó 21 días después de la restricción de riego (DDRR) lo que deja abierta la pregunta acerca de la rapidez de esta respuesta a la restricción de riego, en condiciones de campo.

Los valores mayores de índice de clorofilas en plantas de siete meses de edad indican un estado de desarrollo foliar diferente (Baker and Hardwick 1973) con respecto a las plantas de dos meses de edad. Sin embargo, este índice disminuye en plantas de siete meses de edad sometidas a estrés por falta de agua probablemente como resultado de la

disminución en la síntesis de clorofila (Sayed 2003; Murtaza et al. 2016) o del aumento en su degradación (Smirnoff 1995) por cuenta de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los tilacoides (Niyogi 1999; Reddy et al. 2004). El aumento de ERO pudo deberse a una mayor tasa de pérdida de agua de la planta debida a una mayor superficie transpiratoria en comparación con plantas de dos meses de edad. El Fv/Fm, tradicionalmente utilizado como indicador de estrés en plantas (Baker and Hardwick 1973; Baker et al. 1975), disminuyó solamente en plantas de siete meses de edad sometidas a déficit hídrico, lo cual confirma esta posibilidad en condiciones de campo.

La humedad volumétrica del sustrato de plantas de siete meses de edad y sin restricción de riego fue menor, sugiriendo una mayor evapotranspiración. Dado que el volumen del sustrato y las características de los contenedores del sustrato fueron iguales, el área foliar de las plantas de siete meses de edad causó este efecto. Esta mayor evapotranspiración es consistente con los resultados observados en las plantas sometidas a déficit hídrico.

Algunos parámetros son sensibles al estrés hídrico en plantas de cacao a lo largo del día pero no es claro el efecto de la inoculación con HFMA en vivero

El nivel de humedad volumétrica correspondiente al PMP se obtuvo aproximadamente dos semanas después de la restricción de riego. El riego deficitario realizado en adelante para mantener las plantas ligeramente por encima del PMP no produjo su muerte y permitió su evaluación por un lapso de tiempo mayor a dos meses.

La conductancia estomática se midió en el segundo ensayo a los 13, 24 y 68 DDDR en contraste con el ensayo anterior, en el que este parámetro se midió a los 21 DDDR. A los 13 DDDR, la conductancia estomática disminuyó notoriamente como consecuencia de la falta de agua (tabla S4.9). Estudios previos han determinado que las estomas se cierran rápidamente en respuesta a la disminución en la disponibilidad de agua (García Lozano, 2014). Este parámetro no se midió antes del día 13 después de la restricción del riego, razón por la cual, en el tercer ensayo, la conductancia se evaluó en lapsos de tiempo menores.

La conductancia estomática disminuyó en respuesta al déficit hídrico en el sustrato y al potencial hídrico de la atmósfera, pero no a la inoculación con HFMA. No hubo evidencia de diferencias estadísticamente significativas entre plantas estresadas cuando se evaluaron a lo largo del día, lo que confirma la alta sensibilidad de la actividad estomática

a la disponibilidad de agua en el sustrato en plantas de cacao. En plantas cuyo sustrato estuvo hidratado, hubo una rápida disminución de la conductividad estomática entre las 7 am y las 10 am, después del cual se mantuvo constante hasta la 1 PM. Estas variaciones fueron consistentes con las variaciones del potencial hídrico de la atmósfera durante el día (Figura S 4.2). Este comportamiento estomático también fue observado por García Lozano, (2014) en plantas de cacao en condiciones de vivero a capacidad de campo. En horas de la tarde, las diferencias de conductancia estomática no fueron suficientemente grandes entre plantas sometidas a déficit hídrico y las que no lo estaban lo que sugiere un efecto importante de la humedad atmosférica sobre este parámetro en plantas de cacao, especialmente en horas de la tarde (Lozano and Fonseca 2016).

La dinámica de esta variación indica que a las 10 am la medición de este parámetro permite el suficiente contraste entre plantas sometidas o no a déficit hídrico y disminuye la probabilidad de variaciones al interior de los tratamientos. Adicionalmente, estudios previos han indicado que la tasa fotosintética es máxima a esta hora (Tezara et al. 2016).

El valor de F_v/F_m se asocia con el estado funcional del fotosistema II (González Moreno et al. 2008). El primer registro de la disminución de este valor sucedió a los 24 DRR es decir que las limitaciones funcionales del PSII en las plantas de cacao sucedieron después de las limitaciones estomáticas (disminución en la conductancia estomática). Este comportamiento sugiere una respuesta isohídrica de las plantas de cacao en condiciones de campo, que refleja su alta susceptibilidad a la disponibilidad de agua, no solo en el sustrato, sino también de la atmósfera a lo largo del día (Hugalde and Vila 2014). Los resultados indican que el mecanismo utilizado por las plantas de cacao frente al déficit hídrico incluye la evasión a esta condición con la disminución de la conductancia estomática, lo cual es de particular importancia si se considera el aumento de la sensibilidad de las plantas de cacao con mayor área foliar por cuenta del incremento de la transpiración.

Los efectos de la inoculación sobre la conductancia estomática y la F_v/F_m se registraron de forma muy esporádica. En la literatura se encuentran numerosos ejemplos del efecto de los HFMA en plantas sometidas a déficit hídrico (Fernández-Lizarazo and Moreno-Fonseca 2016) (Anexo B), no obstante, en cacao también se ha registrado la ausencia del efecto en condiciones de vivero (Chibuike and Daymond 2015) o en otras especies, incluso efectos negativos (Ryan et al. 2005; Purin and Rillig 2008; Schmidt et al. 2011).

La inoculación con HFMA normalmente induce una respuesta asociada a la evasión del estrés por déficit hídrico, principalmente con el aumento de la conductancia estomática y del aumento del flujo de agua entre el sustrato y la raíz a través de la absorción por las hifas extraradicales (Allen 2009), esto implicaría una importante asignación de carbohidratos desde la planta para el crecimiento de los HFMA (Miransari et al. 2007, 2008; Augé et al. 2008). Sin embargo, las hojas de las plantas de cacao en etapa de vivero realizan el proceso de fotosíntesis para producir carbohidratos necesarios para soportar el crecimiento inicial y con limitada capacidad de asignar carbohidratos hacia almacenamiento (Niinemets 2010) lo que explicaría su limitada capacidad para asignar carbohidratos hacia otros *verteaderos* como lo son los hongos micorrícicos con los que se asocia.

La etapa de desarrollo de las plantas, la condición de sombrío y el lapso de tiempo transcurrido entre la inoculación y la medición de parámetros, pueden ser factores importantes en la evaluación del beneficio de la inoculación con HFMA (Konvalinkova and Jansa 2016). La fase inicial del crecimiento de los HFMA en las plantas de cacao después de la inoculación, pudo requerir un costo energético de las plantas superior al beneficio que los HFMA les pudieran suministrar en esa etapa del desarrollo. De hecho, algunas diferencias esporádicas, en conductancia estomática y en F_v/F_m debidas a la inoculación, indicaron mayores valores en plantas no inoculadas lo que es consistente con la posibilidad de un mayor gasto energético inicial de la planta.

Consecuentemente, estos resultados abren la pregunta acerca de la relación costo/beneficio de la inoculación en diferentes fases de desarrollo de plantas de cacao sometidas a estrés hídrico. Ceballos et al. (en preparación) estudió el beneficio de la inoculación de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Cranz.) en un campo de cultivo cercano al vivero donde se desarrolló la presente investigación. Los resultados del estudio de Ceballos et al (en preparación) indicaron que el beneficio de la inoculación es claramente negativo en plantas jóvenes y se incrementa sustancialmente a lo largo del ciclo de producción hasta afectar positivamente el rendimiento económico de las plantas. No obstante, este tipo de estudios no existen en cacao ni tampoco en condiciones de estrés por déficit hídrico lo cual reviste importancia para el cultivo de cacao en la medida en que su etapa inicial de desarrollo sucede en condiciones de vivero, en donde es posible la realización de labores culturales que incrementen la sobrevivencia de las plantas una vez sembradas en campo. Navarro García et al. (2011) lograron mejorar la resistencia a estrés

por déficit hídrico de plantas de madroño (*Arbutus unedo* L.) transplantadas a campo a través de la inoculación micorrícica y de inducción de déficit hídrico desde etapa de vivero.

Se han determinado importantes diferencias intra e interespecíficas en la funcionalidad de los HFMA con respecto a la tolerancia de las plantas al estrés hídrico (Augé 2001). Más interesante aún, en experimentos en campo utilizando la especie vegetal *Manihot esculenta* Cranz., sometida a estrés hídrico de forma natural, las diferencias genéticas intra-específicas del hongo *Rhizophagus irregularis* mostraron ser suficientes para ejercer un efecto diferencial y determinante en la tolerancia de la planta a este estrés, así como el rendimiento al final del ciclo de cultivo (12 meses) (Peña, Thuita, et al, en preparación). Probablemente no es apropiado utilizar la generalización acerca del efecto de los HFMA en la tolerancia de plantas a estrés por déficit hídrico y en este orden de ideas, es posible considerar que la ausencia de efecto de la inoculación en plantas de cacao sometidas a este estrés, solamente aplique para el genotipo de HFMA utilizado.

Recientemente, se ha encontrado la fuerte influencia que puede tener la asociación micorrícica en términos la tolerancia al estrés por déficit hídrico por cuenta de la producción de proteínas del tipo glomalina y el consecuente aumento de los agregados estables en el suelo, lo que teóricamente resulta en una mayor capacidad de retención de agua (Wright and Upadhyaya 1998). No obstante, en este experimento las condiciones de vivero, en las cuales la planta tuvo una restricción en el desarrollo de su sistema radical (en donde el HFMA se ubica y ejerce su mayor influencia) pudo ser determinante para la esporádica respuesta detectada en este ensayo por cuanto i) el tiempo posterior a la inoculación pudo no ser suficiente para un cambio físico del sustrato utilizado, ii) el crecimiento de hifas extraradicales pudo ser bajo en respuesta a una baja asignación de carbono a las hifas en el estado fenológico inicial de las plantas, iii) el confinamiento del sustrato y de las raíces también incluye a los HFMA que las colonizan, lo que limita el potencial de las hifas para absorber agua desde zonas más distantes a la rizósfera.

Con base en los argumentos anteriores y a pesar de que se ha reportado explícitamente que la inoculación micorrícica no influencia la respuesta de plántulas cacao al estrés por déficit hídrico (Chibuike and Daymond 2015), no es posible generalizar sobre la funcionalidad de los HFMA ni sobre los resultados obtenidos en este ensayo con respecto a *R. irregularis*.

Adicionalmente, el hongo utilizado para la inoculación fue propagado en condiciones *in vitro* y el inóculo consistió en un gel estéril que para garantizar ausencia de otros microorganismos. No obstante, el sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas de cacao no fue esterilizado, para simular las condiciones de cultivo utilizadas en la región. Esto implica que *R. irregularis* fue incorporado en un sustrato que contenía una comunidad pre-establecida de microorganismos. Consecuentemente, el efecto de la inoculación no solo se puede atribuir a las características particulares del hongo FMA, sino también como producto de las interacciones con la comunidad de microorganismos: bacterias, hongos, HFMA y demás componentes de la microbiota del suelo (Augé 2004) entre otros aspectos de la ecología microbiana.

La disminución en el área foliar y en la biomasa en general en las plantas sometidas a déficit hídrico es consistente con los resultados obtenidos en los otros parámetros descritos. En condiciones de estrés hídrico, la disminución de la conductancia estomática y de Fv/Fm son limitantes de la fotosíntesis (de tipo estomático y no estomático, respectivamente) que conducen a la disminución en la asimilación de carbono y formación de esqueletos de carbono para el crecimiento (Drake et al. 2017). No se pueden descartar otros procesos fisiológicos que pudieron afectar la formación de biomasa de las plantas como por ejemplo, la respiración (Flexas et al. 2005). En este ensayo no se midió respiración ni otros parámetros, que se sugiere pueden ser objeto de medición en futuros ensayos.

Hay algunos parámetros descriptores de estrés, más sensibles que otros para estudiar el efecto del estrés hídrico en plantas de cacao.

La disminución progresiva del potencial hídrico foliar en las plantas sometidas a déficit hídrico en el tercer ensayo, no coincidió con lo hallado en el primer ensayo, en el que se encontraron diferencias significativas al día siguiente a la restricción de riego. La razón de esta diferencia es que el DVP en el primer ensayo fue casi el doble del DVP en el tercer ensayo en tanto que el potencial hídrico atmosférico fue dos veces mayor en el primero con respecto al tercer ensayo. Así, la tensión hídrica a la cual estaba sometido el xilema en las plantas del primer ensayo era mucho mayor y la transpiración en el tercer ensayo mucho menor. En conjunto, esto implicó un estado hídrico menos variable (sensible) en las plantas del tercer ensayo aun cuando la disponibilidad de agua en el suelo fuera baja.

La conductancia estomática en los tratamientos previos se midió inicialmente a los 13 y 21 DDRR con resultados contrastantes entre plantas con un suministro de agua diferente. Este resultado evidenció la necesidad de realizar mediciones de este parámetro en un lapso de tiempo menor, que para el tercer ensayo fue de 7 DDRR (58 DDS). La disminución de la conductancia estomática refleja la alta sensibilidad de los estomas a la disponibilidad de agua en el suelo y confirma un patrón isohídrico en respuesta al estrés por déficit hídrico que podría incluir un componente hidropasivo en el cierre estomático en cacao (García Lozano, 2014). De hecho, a los 7 DDRR (58 DDS) la conductancia estomática fue menor a $50 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ lo que corresponde a la tercera fase de estrés por déficit hídrico (estrés severo) caracterizada de forma general por el debilitamiento de la capacidad fotosintética causada por daño enzimático, disminución del contenido de proteínas y clorofilas y comienzo de re-movilización de nutrientes (Aroca 2012). Por lo tanto, estos parámetros pueden ser objeto de medición en futuros ensayos.

De hecho, el rápido cierre estomático está asociado con la disminución en la pérdida de agua por transpiración estomática, lo que sumado al bajo DVP (y alto potencial hídrico atmosférico) pudieron disminuir la pérdida de agua por transpiración (cuticular y estomática), lo que también explica las diferencias en el potencial hídrico foliar de las plantas sometidas a déficit hídrico del tercer ensayo con respecto al primero. En conjunto, los resultados sugieren que la transpiración estomática estuvo determinada principalmente por el potencial hídrico en el suelo mientras que la transpiración cuticular lo estaría por la variación en la demanda evapotranspirativa (Mishra and Cherkauer 2010) y esto, puede resultar en diferencias en el estado hídrico de las plantas, reflejadas en el potencial hídrico. García Lozano, (2014), también encontró que las plantas de cacao pierden agua con relativa facilidad debido al poder evaporante de la atmósfera.

En los experimentos anteriores el F_v/F_m pareció no ser muy sensible para establecer si las plantas sometidas a restricción de riego presentaban una condición de estrés. La única excepción se presentó cuando las plantas tenían 7 meses de edad (mayor área foliar para transpiración) y el DVP era alto.

Las plantas utilizadas en el tercer ensayo eran jóvenes. Al finalizar el experimento las plantas tenían una edad de 79 días, es decir, una edad muy similar a las plantas jóvenes del primer ensayo en las que tampoco se evidenció efecto del estrés sobre el F_v/F_m , lo que corrobora los resultados. Alternativamente se evaluaron otros índices de estrés

calculados a partir de la fluorescencia de la clorofila. De estos, el índice de vitalidad con base en la absorción de energía (PI_{abs}) y el índice de vitalidad con base en los procesos de absorción, atrapamiento de electrones y flujo de electrones (PI_{total}) (Stirbet and Govindjee 2011) fueron más sensibles que Fv/Fm , de forma particular, al final del periodo evaluado (28 DRR (72 DDS)). La sensibilidad de los índices de vitalidad al déficit hídrico con respecto al Fv/Fm ya ha sido reportada previamente en trigo (*Triticum aestivum* L.) (Živčák et al. 2008) e incluso se consideran más apropiados para evaluar el efecto de la inoculación con HFMA (Tsimilli-Michael and Strasser 2008). Por tal razón, en los capítulos posteriores se presentan los resultados incluyendo estos parámetros.

En plantas sometidas a restricción de riego, el P tuvo una concentración menor a nivel de tejido foliar. El P se absorbe por contacto físico/directo con las raíces y se mueve en el suelo por difusión (Marschner 2011). Al agotarse el agua, el proceso de difusión se vuelve lento y la zona de agotamiento se incrementa (Smith 2002). La ausencia de efecto de la inoculación con hongos FMA podría atribuirse a que, en el suelo de las plantas no inoculadas, las raíces también pudieron encontrarse colonizadas de forma natural con otros HFMA. Esto debido a que el sustrato no estéril estaba conformado por suelo proveniente de una finca en la que se produce cacao cuya rizósfera contiene los géneros *Scutellospora sp.*, *Gigaspora sp.*, *Rhizophagus sp.*, *Acaulospora sp.*, *Glomus sp.* y *Claroideoglomus sp.*, (Cárdenas 2017). En el mismo tipo de suelo Ordoñez, (2016), inoculó plantas de yuca (*Manihot esculenta* Cranz.) con el mismo tipo de inóculo utilizado en este capítulo determinando que la riqueza de la comunidad intraradical de HFMA aumentó y que hubo una fluctuación en la abundancia de las especies de HFMA (Ordoñez et al, sometido). Si bien existen procesos de selección dirigidos por alguno de los dos simbioses (planta u hongo) (Davison et al. 2011; Öpik and Moora 2012) (lo que no permiten extrapolar estos mismos resultados a cacao), es posible que los hongos presentes en el sustrato también hubieran contribuido a la absorción de P.

Chulan & Ragu, (1986) evaluaron plantas de cacao inoculadas con HFMA en sustrato estéril y no estéril encontrando que estos hongos favorecen la absorción de P y el crecimiento pero con diferencias significativas más evidentes en sustrato estéril. En contraste, Chibuike & Daymond, (2015) no encontraron efecto de la inoculación de HFMA en un sustrato aparentemente inerte. Las diferencias entre los experimentos descritos y los resultados obtenidos en esta investigación radican en que en las tres investigaciones se estudiaron diferentes genotipos de cacao y de HFMA. Chulan & Ragu, (1986) utilizaron

una mezcla de *Gigaspora spp.* y *Gigaspora margarita*, Chibuiké & Daymond, (2015) utilizaron una mezcla comercial (Rootgrow™) de cinco especies no definidas de HFMA y dos de hongos ectomicorrícicos, en tanto que en la presente investigación se utilizó un producto comercial que contiene exclusivamente una cepa *R. irregularis* aislado en Canadá.

Así, las diferencias interespecíficas podrían explicar las diferencias en los resultados obtenidos en los diferentes experimentos. De hecho, Droh et al. (2016) compararon el efecto de la cepa SC3 (aislada en Suiza) con inóculos provenientes de zonas cacaoteras de Costa de Marfil y la mezcla de estos sobre el crecimiento de plantas jóvenes de cacao sembradas en sustrato estéril. Los autores encontraron claras diferencias entre los diferentes tipos de inóculo. De forma similar, Rini et al (1996) realizaron el mismo tipo de evaluación pero con sustrato no estéril y utilizando como inóculo *Glomus mosseae*, *Scutellospora sp.* *Acaulospora sp.* y su mezcla. Los autores también encontraron diferencias a nivel de crecimiento y nutrición (P, K, Ca y Mg).

Adicionalmente, se ha encontrado que las diferencias funcionales intraespecíficas pueden ser mayores que las interespecíficas tanto a nivel de condiciones de laboratorio e invernadero (Munkvold et al. 2004) como de campo (Ceballos, en preparación y Peña, en preparación). No obstante, este aspecto no se ha evaluado aun en plantas de cacao.

El incremento de la concentración de K foliar en plantas inoculadas, sometidas a restricción de riego es consistente con dos de los mecanismos que se han identificado en plantas micorrizadas para tolerar el déficit hídrico (Fernández-Lizarazo and Moreno-Fonseca 2016) (Anexo B). El primero es el mejoramiento de la nutrición de aquellos nutrientes que contribuyen a tolerar el estrés (Al-Karaki 2006; Asensio et al. 2012) y el segundo consiste en el ajuste osmótico que contribuye a disminuir el potencial hídrico en la planta para facilitar la absorción de agua desde el suelo (Wu and Xia 2006; Sharma et al. 2017). En cacao, el K ha sido reconocido como un osmolito compatible que contribuye al ajuste osmótico en situaciones de déficit hídrico (Almeida and Valle 2008). García Lozano, (2014) asoció esta respuesta a un componente hidroactivo de la respuesta estomática al estrés por déficit hídrico. Este resultado es de particular importancia por cuanto, es la primera vez que reporta el efecto de la inoculación con HFMA sobre el incremento de la concentración de K en hojas de plantas de cacao sometidas a déficit hídrico y porque el K es el ion que

probablemente hace la mayor contribución a la osmolaridad del jugo celular (Premachandra and Joly 1992).

La disminución de la concentración de S en plantas inoculadas encontrada en esta investigación coincide parcialmente con los resultados obtenidos por Sieh et al., (2013). Estos autores encontraron que, a bajas concentraciones de P en sustrato estéril, la concentración foliar de S en *Medicago truncatula* fertilizada con S, fue menor que la de plantas no inoculadas pero fue mayor que la de plantas inoculadas sin fertilización con S. Esto supone la existencia de un balance P/S en plantas micorrizadas. En el presente experimento, dicho balance pudo afectar la absorción de S en plantas inoculadas por cuanto la inoculación pudo cambiar la estructura de la comunidad de hongos HFMA (Ordoñez 2016) y modular la absorción de S (Allen and Shachar-Hill 2009). Sin embargo, a la fecha no existen experimentos que caractericen este balance en cacao y por lo tanto esto debe ser objeto de futuras investigaciones.

Tanto el vigor como el área foliar se disminuyeron de forma significativa alrededor de un mes después de la restricción de riego lo que obedece a limitaciones en la fotosíntesis, debidas al estrés hídrico (Aroca 2012). El vigor de las plantas inoculadas y sometidas a restricción de riego disminuyó con respecto a las no inoculadas lo que es consistente con la posibilidad de que las plantas inoculadas deban suplir un mayor costo energético y reasignación de sus esqueletos de carbono (Jha et al. 2014), sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar dada la creciente evidencia de que genotipos diferentes de *R. irregularis* pueden inducir respuestas diferentes en las plantas hospedadoras, por tanto, esta posibilidad debe ser objeto de ensayos posteriores.

4.5 Conclusiones

De forma consistente, la conductancia estomática de plantas de cacao en etapa de vivero disminuye rápidamente con la restricción de agua en el sustrato o con la disminución del potencial hídrico de la atmósfera. No obstante, el estado hídrico de la planta depende, entre otros factores, de la magnitud de su área foliar. A mayor área foliar y bajo condiciones de déficit hídrico, se incrementa la evapotranspiración debida a la transpiración cuticular, aun cuando los estomas estén cerrados. Este efecto se agudiza con la disminución del potencial hídrico de la atmósfera y con el aumento del DVP.

Consecuentemente, los parámetros que pueden indicar disminución del estado hídrico de las plantas en respuesta al déficit hídrico, como el potencial hídrico foliar, las clorofilas y algunos parámetros de fluorescencia de la clorofila, pueden también variar en función del potencial hídrico de la atmósfera, del DVP y del área foliar de las plantas.

La restricción de riego indujo un proceso de limitación estomática y no estomática de la fotosíntesis. La limitación estomática pudo suceder en el lapso de unas pocas horas y permanecer así por varias semanas. La limitación no estomática indicada por el contenido de clorofilas y por los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* sucedieron en un lapso mayor de tiempo.

El PI_{total} es un parámetro de fluorescencia que pareció ser más sensible para la identificación del estrés en plantas sometidas a déficit hídrico, en campo, por cuanto incluye en su cálculo los procesos de absorción de energía, atrapamiento y transporte de electrones a diferencia del Fv/Fm que solamente incluye a los procesos de absorción de energía.

La variación en la concentración foliar de P, S y K en función del déficit hídrico, de la inoculación y de su interacción, respectivamente, sugieren que la imposición de estas condiciones al sistema sustrato-planta-atmósfera, podría modificar fenómenos de movimiento de nutrientes en suelo, asignación de esqueletos de carbono y osmoregulación

La disminución en el área foliar, en la biomasa y en el vigor de las plantas sometidas a déficit hídrico es consistente con las limitaciones estomáticas, no estomáticas y con limitaciones nutricionales como la del P.

En estos ensayos, la inoculación de las plantas de cacao con HFMA indujo efectos esporádicos disminuyendo el potencial hídrico, la conductancia estomática y la concentración foliar de K y S. Estos efectos esporádicos pudieron estar asociados a la relación costo/beneficio de la asociación, a la relación entre nutrientes al establecimiento de la simbiosis, a cambios en la asignación de esqueletos de carbono, al genotipo del hongo MA, al genotipo de la planta de cacao y a su interacción.

4.6 Información suplementaria

Tabla S 4.1. Análisis del sustrato utilizado en el ensayo uno.

pH	CE	CO	N	Ca	K	Mg	Na	Al	CICE	CIC
	dS/m	%		meq / 100g						
5,6	ns	3,37	0,29	4,21	0,17	1,37	0,03	0,00	5,78	ns

ns: no solicitado

P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg / kg							%			
31,0	20,0	0,67	153	4,83	2,64	0,15	16	29	56	FA

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

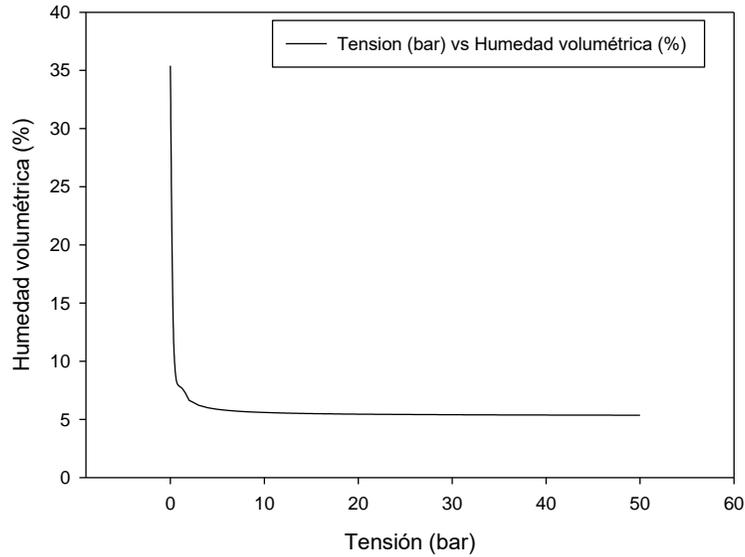


Figura S 4.1. Curva de tensión de humedad del sustrato utilizado en los ensayos de este capítulo.

Tabla S 4.2. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la humedad del sustrato. Ensayo uno, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo.

DDRR	Edad de la planta	Riego	Edad x Riego
Todo el periodo	13,56*	217,82***	1,91 ns
Interacción con el tiempo	9,64**	41,70***	5,63**
Efecto del tiempo		38,17***	

DDRR: Días después de restricción de riego

Tabla S 4.3. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la conductividad estomática. Ensayo uno, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
21	1,4ns	----	5,22*	Con riego>Sin riego	0,22ns

Tabla S 4.4. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el potencial hídrico foliar. Ensayo uno, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
1	0,71ns	----	11,36**	Con riego>sin riego	
16	1,72ns	----	33,23***	Con riego>sin riego	0,86ns
Todo el periodo	0,89ns		55,62***		1,09ns
Interacción con el tiempo	1,32ns		1,89ns		2,73ns
Efecto del tiempo			18,86**		

Tabla S 4.5. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el índice de clorofilas. Ensayo uno, n=8. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
8	15,39**	7 meses>2 meses	0,14ns	----	0,84ns
16	22,02***	7 meses>2 meses	17,23**	Con riego>sin riego	17,02**
Todo el periodo	40,04***		5,44*		4,78*
Interacción con el tiempo	0,47ns		2,69ns		3,00ns
Efecto del tiempo				0,51ns	

Tabla S 4.6. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre la Fv/Fm. Ensayo uno, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
1	0,77ns	----	4,35ns	----	0,002ns
5	0,16ns	----	2,55ns	----	0,26ns
8	0,28ns	----	0,01	----	0,14
12	7,58*	2 meses>7 meses	4,26ns	----	11,11**
13	3,5ns	----	1,06ns	----	0,876ns
14	2,77ns	----	1,15ns	----	2,61ns
15	0,008ns	----	1,85ns	----	2,81ns
16	0,4ns	----	5,24ns	----	0,23
21	1,89ns	----	6,35*	Con riego>sin riego	
Todo el periodo	4,6ns		7,06*		4,47ns
Interacción con el tiempo	3,14ns		2,46ns		3,04ns
Efecto del tiempo				34,19**	

Tabla S 4.7. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el área foliar. Ensayo uno, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
1	8,13	7 meses>2 meses	0,01	---	1,75
16	4,14	---	0,04	---	0,95
Todo el periodo	5,56*		0,11ns		0,58
Interacción con el tiempo	1,07ns		0,62ns		2,16ns
Efecto del tiempo			0,0028ns		

Tabla S 4.8. Efecto de la edad de la planta de cacao y de la restricción de riego sobre el número de hojas. Ensayo uno, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDRR	Edad de la planta	Orden	Riego	Orden	Edad x Riego
1	2,83ns	---	0,14ns	---	0,01ns
16	1,7ns	---	0,05ns	---	0,21ns
Todo el periodo	2,25ns		0,003ns		0,07ns
Interacción con el tiempo	0,33ns		3,24ns		1,93ns
Efecto del tiempo			6,85*		

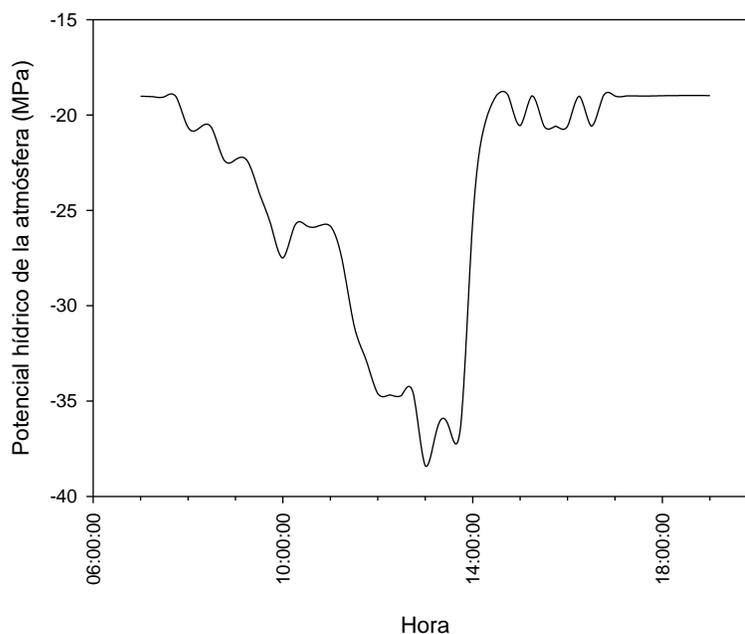


Figura S 4.2. Potencial hídrico de la atmósfera a los 24 DDRR (64 DDS). Ensayo dos.

Tabla S 4.9. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 13 DDRR (43 DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	1,53ns	---	4,63ns	---	0,79ns
10: 00 A.M	1,04ns	---	15,48**	Hidratadas>estresadas	1,32ns
1: 00 P.M	0,14ns	---	15,17**	Hidratadas>estresadas	0,43ns
4: 00 P.M	1,04ns	---	5,87*	Hidratadas>estresadas	0,11ns
7: 00 P.M	9,10*	Sin inoculación>Inoculación	4,94ns	---	3,81ns
Todo el periodo	0,29ns		41,44***		0,01ns
Interacción con el tiempo	1,66ns		6,24*		0,65ns
Efecto del tiempo			25,43**		

Tabla S 4.10. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 24 DDRR (64 DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	1,02ns	---	14,36**	Hidratadas>estresadas	0,11ns
10: 00 A.M	0,21ns	---	34,15**	Hidratadas>estresadas	0,06ns
1: 00 P.M	1,79ns	---	87,89***	Hidratadas>estresadas	3,49ns
4: 00 P.M	0,32ns	---	25,04**	Hidratadas>estresadas	0,38ns
7: 00 P.M	1,31ns	---	2,51ns	---	2,17ns
Todo el periodo	1,77ns		62,43***		0,14ns
Interacción con el tiempo	0,33ns		26,88***	Hidratadas>estresadas	0,14ns
Efecto del tiempo			16,07**		

Tabla S 4.11. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática a los 68 DDDR (98 DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	0,01ns		73,22***	Hidratadas>estresadas	1,34ns
10: 00 A.M	2,39ns		33,46**	Hidratadas>estresadas	1,01ns
1: 00 P.M	0,67ns		12,36**	Hidratadas>estresadas	3,16ns
4: 00 P.M	2,54ns		12,51**	Hidratadas>estresadas	0,01ns
7: 00 P.M	6,17*	Sin inoculación>Inoculación	0,01ns		0,01ns
Todo el periodo	0,77ns		42,51***		1,66ns
Interacción con el tiempo	0,68ns		13,37**		0,96ns
Efecto del tiempo			17,64**		

Tabla S 4.12. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 13 DDDR (43DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	2,35ns	----	1,19ns	----	0,04ns
10: 00 A.M	0,04ns	----	0,16ns	----	1,19ns
1: 00 P.M	0,44ns	----	2,37ns	----	0,60ns
4: 00 P.M	1,16ns	----	1,10ns	----	1,02ns
7: 00 P.M	0,23ns	----	1,59ns	----	0,01ns
Todo el periodo	0,97ns	----	1,71ns	----	1,01ns
Interacción con el tien	0,79ns	----	0,75ns	----	0,91ns
Efecto del tiempo				9,76**	

Tabla S 4.13. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 24 DDRR (64DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	1,68ns		2,32ns		0,05ns
10: 00 A.M	0,39ns		8,43*	Hidratadas>estresadas	0,72ns
1: 00 P.M	0,09ns		1,98ns		0,50ns
4: 00 P.M	7,54*	Control>Glo	14,50**	Hidratadas>estresadas	3,86ns
7: 00 P.M	0,49ns		4,56ns		0,60ns
Todo el periodo	2,66ns		18,54**		1,34ns
Interacción con el tiempo	2,03ns		2,82ns		0,98ns
Efecto del tiempo			78,89***		

Tabla S 4.14. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la Fv/Fm a los 68 DDRR (98 DDS). Ensayo dos, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Hora	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
7: 00 A.M	3,36ns		4,29ns		0,30ns
10: 00 A.M	0,47ns		9,11**	Hidratadas>estresadas	
1: 00 P.M	0,59ns		24,80**	Hidratadas>estresadas	0,05ns
4: 00 P.M	0,28ns		8,0**	Hidratadas>estresadas	
7: 00 P.M	0,01ns		19,75**	Hidratadas>estresadas	0,02ns
Todo el periodo	1,56ns		21,59**		0,52ns
Interacción con el tiempo	0,66ns		1,60ns		0,53ns
Efecto del tiempo			0,84ns		

Tabla S 4.15. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el área foliar. Ensayo dos, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
64	0,11ns	---	77,79***	Hidratadas>estresadas	0,01ns
98	0,01ns	---	270,83***	Hidratadas>estresadas	1,17ns

Tabla S 4.16. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la biomasa. Ensayo dos, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Órgano	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
64	Tallo	2,85ns	---	74,84***	Hidratadas>estresadas	1,24ns
64	Pecíolo	1,02ns	---	25,38***	Hidratadas>estresadas	
64	Raíz	0,29ns	---	18,01***	Hidratadas>estresadas	0,87ns
64	Hoja	0,01ns	---	18,76***	Hidratadas>estresadas	
64	Toda la planta	0,06ns	---	59,55***	Hidratadas>estresadas	0,61
64	Raíz/PA	0,36ns	---	7,49**	Estresadas>hidratadas	0,12
98	Tallo	1,18ns	---	205,89***	Hidratadas>estresadas	0,09ns
98	Pecíolo	3,54ns	---	358,29***	Hidratadas>estresadas	0,60ns
98	Raíz	1,35ns	---	198,78***	Hidratadas>estresadas	0,85ns
98	Hoja	0,40ns	---	348,66***	Hidratadas>estresadas	0,08ns
98	PSTotal	0,32ns	---	34,13***	Hidratadas>estresadas	
98	Raíz/PA	0,69ns	---	3,62ns	---	1,61ns
98	AFE	0,01ns	---	0,2ns	---	0,5ns

Tabla S 4.17. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la humedad volumétrica del sustrato. Ensayo tres, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

	Inoculación	Riego	Inoculación x Riego
Todo el periodo	0,83ns	111,01***	0,2631ns
Interacción con el tiempo	0,44ns	9,36**	0,04ns
Efecto del tiempo		7,61**	

Tabla S 4.18. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el potencial hídrico foliar. Ensayo tres, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
37	0,0063ns	---	0,2	---	3,53ns
44	0,01ns	---	0,03ns	---	2,74ns
58	0,82ns	---	3,37ns	---	0,09ns
65	0,36ns	---	3,79ns	---	2,63ns
72	0,40ns	---	18,30**	Hidrat>No hidratadas	1,00ns
79	ND		ND		
Todo el periodo	0,29ns		14,86*		0,78ns
Interacción con el tiempo	0,5ns		4,86*		3,06ns
Efecto del tiempo			6,52*		

Tabla S 4.19. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la conductancia estomática. Ensayo tres, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
37	0,012ns	----	0,09ns	----	0,23ns
44	1,40ns	----	0,90ns	----	0,08ns
58	0,22ns	----	30,25***	Hidrat>No hidratadas	0,51ns
65	0,13ns	----	29,24***	Hidrat>No hidratadas	0,01ns
72	0,93ns	----	44,06***	Hidrat>No hidratadas	0,49ns
79	1,22ns	----	18,33**	Hidrat>No hidratadas	0,03ns
Todo el periodo	0,01ns		62,54***		0,23ns
Interacción con el tiempo	0,74ns		4,29**		0,15ns
Efecto del tiempo			18,81***		

Tabla S 4.20. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre la concentración de nutrientes en la hoja. Ensayo tres, n=4. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
N	0,01ns	---	1,42ns	---	0,33ns
P	0,47ns	---	13,36**	Hidrat>No hidratadas	0,47ns
Ca	1,20ns	---	1,52ns	---	0,59ns
K	0,23ns	---	0,77ns	---	5,67*
Mg	0,14ns	---	0,14ns	---	1,45ns
Cu	0,40ns	---	4,52ns	---	0,40ns
Fe	0,52ns	---	0,01ns	---	0,23ns
Mn	1,01ns	---	0,64ns	---	0,05ns
Zn	0,69ns	---	0,09ns	---	0,05ns
B	0,60ns	---	0,42ns	---	0,01ns
S	4,85*	Control>Glomygel	2,27ns	---	2,56ns

Tabla S 4.21. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre el área foliar. Ensayo tres, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
37	0,9ns	---	0,23ns	---	0,07ns
44	0,04ns	---	0,01ns	---	0,45ns
58	0,01ns	---	0,01ns	---	0,04ns
65	2,87ns	---	16,57**	Hidrat>No hidratadas	1,38ns
72	2,42ns	---	4,34ns	---	0,01ns
Todo el periodo	0,82ns		3,14ns		0,01ns
Interacción con el tien	1,44ns		5,48*		1,03ns
Efecto del tiempo				10,66**	

Tabla S 4.22. Efecto de la inoculación y de la restricción de riego en plantas de cacao sobre vigor de las plantas. Ensayo tres, n=12. Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns = no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

DDS	Inoculación	Orden	Riego	Orden	Inoculación x Riego
37					
44					
58	0,27ns	---	0,27ns	---	0,16ns
65	0,12ns	---	4,77*	Hidrat>No hidratadas	4,77*
72	0,93ns	---	11,85**	Hidrat>No hidratadas	1,69ns
79	0,46ns	---	18,31***	Hidrat>No hidratadas	0,46ns



Cocoa nursery. Picture: JCFL.

5. Growth and physiological implications of cadmium dynamic in the continuum substrate-AMF-cocoa plant under realistic conditions

5.1 Introduction

Cadmium (Cd) is a non-essential and toxic heavy metal found in soil, air and water. Volcanic eruptions (Burnfred, 2009), pedogenetic processes (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), forest burn-off, and wind transportation of soil particles are some of the natural sources of cadmium. It also comes from anthropogenic sources like manufacture/processing (Adriano, 2001; Burnfred, 2009; Cordero et al., 2004; Dahiya et al., 2005; Minifie, 1999), household appliances, transportation industry (ATSDR, 2004; USEPA, 2003) and farming (Rao et al. 2018), among others, being agriculture the major source of Cd in food products (Sharma and Archana 2016).

Cd intake represents significant health risks for human population. Its concentration is cumulative in tissues, and after some time it can cause renal, liver, reproductive organs and bones damage (Harrison, 2001; Yeung and Hsu, 2005). Cd intake by humans is normally unavoidable, especially if the intake comes from highly contaminated food (Beccaloni et al., 2013; Chaudri et al., 2001; Nabulo et al., 2011; Nogawa et al., 1983; Reilly, 2002; Singh, 2005). High soil natural concentrations of Cd, the use of composted sludge or phosphate fertilizers are the major agricultural inputs affecting plant agricultural productivity and increasing levels of Cd in food (Rao et al. 2018).

Recently, global concerns regarding Cd levels in chocolate have been raised. Chocolate is often the favorite food for children, while they are the most vulnerable population group to any kind of heavy metal contamination in food because of its cumulative character and the

changes it can cause in physiological processes (Yanus et al. 2014). Thus, the European union (EU) has recently ruled strict limits for Cd-concentrations in several cocoa-based products (ASTM, 2005) as a standard requirement to market them in the short term.

Chocolate is produced from cocoa beans. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tree originated from the tropical rainforests in the Americas (Almeida & Valle 2007) and is one of the world's most important perennial crops (Beg et al. 2017). Cocoa beans are considered an internationally traded commodity which contributes to the livelihoods of an estimated of 40–50 million people (World Cocoa Foundation, 2010), mainly in developing countries. In many Latin-American soils where cocoa is cultivated, Cd concentrations are high and this limits its potential commercial use (Chavez et al. 2015).

Breeding programs for Cd resistance have been proposed as an alternative to solve this global problem (Lewis et al. 2018). However, the life cycle of cocoa trees could considerably lengthen breeding programs. Instead, the use of soil microorganisms such as arbuscular micorrhizal fungi (AMF) to bio remediate or attenuate heavy metals accumulation in soils and plants has been proposed as a plausible alternative (Kumar Yadav et al. 2018).

Roots of the majority of economically important crop plants, including cocoa (Laycock, 1945), are associated symbiotically with AMF. These important, soil fungi belong to the Glomeromycota phylum (Schussler et al. 2001) and are important obligate symbionts of plants that improve mineral nutrient uptake in return of plant photosynthates (Smith and Read 2008; Smith and Smith 2011). They have been reported to alleviate Cd toxic effects on plants by diminishing phytoextraction capacity and translocation efficiency of the metal into the plant and by increasing biomass production (dilution effect) depending on the plant species and/or the fungus ecotype (Chen et al 2003; Gonzalez-Chavez et al 2002; Heggo et al 1990; Li and feng 2001; Wang, 2007)

Arbuscular mycorrhizal fungi are globally distributed and are one of the most abundant inhabitants of below-ground ecosystems (Lee et al. 2013). Among soil microorganisms, AMF provide a direct link between soil and roots, and can therefore be of great importance in phytoremediation by enhancing plant tolerance, by increasing heavy metal (HM) absorption (phyto-extraction in hyperaccumulator plants) or by decreasing HM translocation to the shoot (phyto-stabilization in food-shoot harvestable crops) (Meier et al. 2012) . Despite of this, numerous studies have shown highly variable responses of the AM symbiosis on phytoremediation and plant HM stress tolerance in contaminated soils. This

variability in results comes from differences in: i) AMF species (Rivera-Becerril et al. 2002), ii) AMF intraespecific isolates (Kaldorf et al. 1999; Redon et al. 2009), iii) plant genotypes (Leung et al. 2010a) and iv) other experimental conditions (El-Kherbawy et al. 1989).

The potential benefits in phytoremediation from inoculating crops with AMF have been extensively discussed, however, studies on Cd dynamics and plant tolerance in realistic conditions have been limited, especially in tropical conditions where increasingly many agricultural soils have become contaminated with Cd (González 2010; Hurtado 2012). AMF are present in almost all agricultural soils and the majority of published studies demonstrating the effects of AMF inoculation on phytoremediation or HM plant tolerance have been conducted in sterile soil. Thus, effective studies on AMF inoculation in cropping systems require comparing AMF inoculated plants with non-inoculated plants in the presence of local AMF communities. Recently, it has been highlighted the importance of studying Cd flow and cycling within the soil-plant system as it has become globally, highly relevant (Shahid et al., 2017). Furthermore, application of bio inoculants, particularly AMF, has been hampered because of the lack of knowledge of their effect in real soil-plant systems (Owen et al., 2014).

Despite the inherent complexity, current cultural practices and biotechnological advances allow to study Cd dynamics in the soil-fungi-plant continuum. A realistic approach for describing Cd-dynamics in mycorrhizal plants in nursery is possible as cocoa seedlings are grown in nursery (3-5 months) and then transplanted to field while soil-fungi-plant continuum can be maintained. Consequently, our aim was to study the temporal dynamics of Cd in the substrate and in AMF inoculated versus non-inoculated plants at nursery, simulating real conditions of cocoa crops in the region as well as to analyse the physiological implications. Therefore, our research is a realistic approach that gives robust information on Cd dynamics at nursery conditions.

5.2 Methodology

The experiment was conducted under nursery conditions at the Utopía Campus of La Salle University (at Yopal, Casanare) in Los Llanos region of Colombia (72° 17' 48" W, 5° 19' 31" N). The climate in Yopal is tropical with average temperatures of 18°C (night time) to 28°C (day time) and with an average air humidity of 75%.

The AM fungus used for these experiments was *Rhizophagus irregularis* produced in *in-vitro* AMF culture system. The commercial inoculum used was Glomygel® (<http://www.mycovitro.com>). Cocoa genotype was IMC 67 (CNC, 2010). Cocoa seeds were obtained from FEDECACAO (Cocoa research and development agency in Colombia). Uncontaminated non-sterilized substrate was collected from the top layer (0-20 cm) at the campus cropland. The physico-chemical characteristics of the substrate are shown in Table S1. Soil was sieved with a 4-mm diameter sieve and then manually mixed with sand at 1:1 (v/v) ratio.

Individual cocoa seeds were sown directly in 3 kg-bags according to FEDECACAO guidelines (Fedecacao, 2007). Two weeks after germination, 10 ml of mycorrhizal solution containing 250 fungal propagules was applied to plants. Non-inoculated plants received a mock inoculation (distilled water 10 ml). The experiment consisted of a completely randomized 2x5 factorial design. First factor was AMF inoculation which had two levels, with and without AMF inoculation; second factor was Cd concentration, which had 5 levels, 0 (Cd0), 3(Cd3), 6(Cd6), 12(Cd12) y 24(Cd24) mg.kg⁻¹ Cd according to Cd concentrations found in studied Colombian cocoa fields (González 2010; Martínez and Palacio 2010). Cd was added as Cd(Cl)₂. We chose a wide range of Cd concentrations in order to have a broader understanding of the interaction.

Plants were watered three times a week at 80-90% water holding capacity (WHC) of the substrate to avoid Cd leachates. In scarce cases, when it happened, leachates were collected and added back to its bag, as the nursery design allowed it. 45 days old seedlings were fertilized according to cocoa seedlings nutritional requirement (Fernández et al, 2016). Fifty percent of phosphate was applied.

Measurements and analytical determinations.

All substrate, plant and fungal parameters were measured at four successive time points throughout the experiment (5, 9, 13 and 17 weeks after sowing). Physiological measurements were carried out between 4:00 am and 10:00 am before destructive measurements by each time point. One plant (pot) was considered one experimental unit.

Mycorrhizal colonization determination

Total AMF colonization in roots was measured in ≤ 2 mm thickness roots. AMF root staining was carried out according to Vierheilig et al. (1998a). Percentage of root colonization was determined by the grid line-intersect method (Giovannetti and Mosse 1980) in 6 plants per treatment by time point.

Plant growth and determination of physiological properties

Shoot height, root length, stem diameter, leaf number and dry biomass were measured in six experimental units per treatment per time point. Root specific length (RSL) was calculated as a quotient between root length and root dry weight. Chlorophyll index and stomatal conductance were measured twice on the third fully expanded leaf of three plants using chlorophyll meter (CM-1000 Spectrum, USA[®]) and steady state diffusion porometer (CS-1 Decagon Devices[®]) according to the manufacturer's instructions. Chlorophyll fluorescence parameters were measured in one leaf of three plants per treatment per time point with a fluorometer (Handy PEA Hansatech[®]).

Cd uptake and translocation

Dried samples of six experimental units (separated by roots, stems and leaves) were grounded in a stainless mill and ignited at 450°C till constant weight, the residue was dissolved in HNO₃ (2.5 %) and the total Cd concentrations in the resulting solutions were then determined by atomic absorption (AA) spectrometry with flame atomization using a Thermo Scientific ice3000 Series AA spectrometer. For the first sampling due to the small size of seedlings, two plant samples were pulled by each organ for the determination of the total Cd content, for a total of 3 repetitions for each treatment. Cd content by organ was estimated by multiplying organ concentration (mg.kg⁻¹) by organ dry weight (kg). Total (root, stem and leaves) and shoot (stem and leaves) Cd contents were estimated as the sum of Cd content in respective organs, whereas total and shoot Cd concentrations were estimated

as the ratio between Cd content and biomass. Cd absorption efficiency was estimated as total Cd content/root biomass (Wang, et al., 2007) and translocation efficiency was estimated as shoot Cd concentration/root Cd concentration (Wang, et al, 2007).

Substrate Cd measurements

The substrate samples were dried, ground and passed through a 2-mm mesh. A 3 g aliquots of sampled substrates were extracted with a digestion on Aqua Regia (International Organization for Standardization 1995). The resulting solution was filtered and resolved in HNO₃ 2.5%.

Substrate Cd fractionation

The determination of Cd concentration in different substrate fractions, in order to evaluate the mobility, availability and persistence of Cd in the system, was done by a modified four-step sequential extraction scheme, proposed by the Community Bureau of Reference protocol (BCR) described in Tokalioğlu et al. (2000). The metal content in the extracts was measured by atomic absorption spectrometry.

Statistical analysis

Data were analyzed using the JMP[®] statistical discovery software (Statistical Analysis Systems Institute, version 11). Prior to ANOVA, all data were checked for normality and homoscedasticity. When needed, variables were transformed using logarithmic or trigonometric functions. To test for significant differences in the effects of Cd, AMF inoculation and their interaction were then analysed using a two-way ANOVA; *post-hoc* comparisons were performed using a Tukey HSD test. A non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA was used to analyze variables that did not meet the ANOVA assumptions even after transformation, followed by a *post-hoc* Z-value test. The effects of the main factors and their interaction on all plant and mycorrhizal parameters are summarized in tables presented as supplementary information (Tables S5.1–S5.12). A linear regression analysis was used to explore the relationships between variables according to Pearson's coefficient.

5.3 Results

All measured parameters showed significant variation in response to Cd, AMF or combined treatments, and these responses changed dynamically through sampling times. The highest contrasts were observed between Cd0 and Cd12 at 5 and 17 weeks after sowing

(WAS). All cocoa AMF inoculated plants sown at Cd24 died before 17 WAS. Consequently, here, the most representative results are shown and detailed information is included in supplementary information section.

Cd dynamic in substrate

Substrate used mimicked to that used by local farmers which is characterized to be a sandy loam having low pH, organic matter and cationic exchange capacity (Table S5.1). After Cd stabilization period, total Cd concentration in substrate were found to be highly correlated with Cd initially added to each treatment (Table S5.2 and Figure S5.1).

Total Cd concentration in substrate consistently followed the order Cd24>Cd12>Cd6>Cd3>Cd0 throughout the evaluation period (Table S5.3). There was no statistical difference among inoculation treatments when considering all substrate Cd treatments. Interaction between inoculation and Cd treatments was only significant at Cd12 in 17 WAS (Figure 5.1a and Table S5.3). At this time point, although total substrate Cd concentration tended to be lower than that of 5 WAS in both inoculation treatments, only the substrate of inoculated plants had significant lower total Cd than non-inoculated ones (18%).

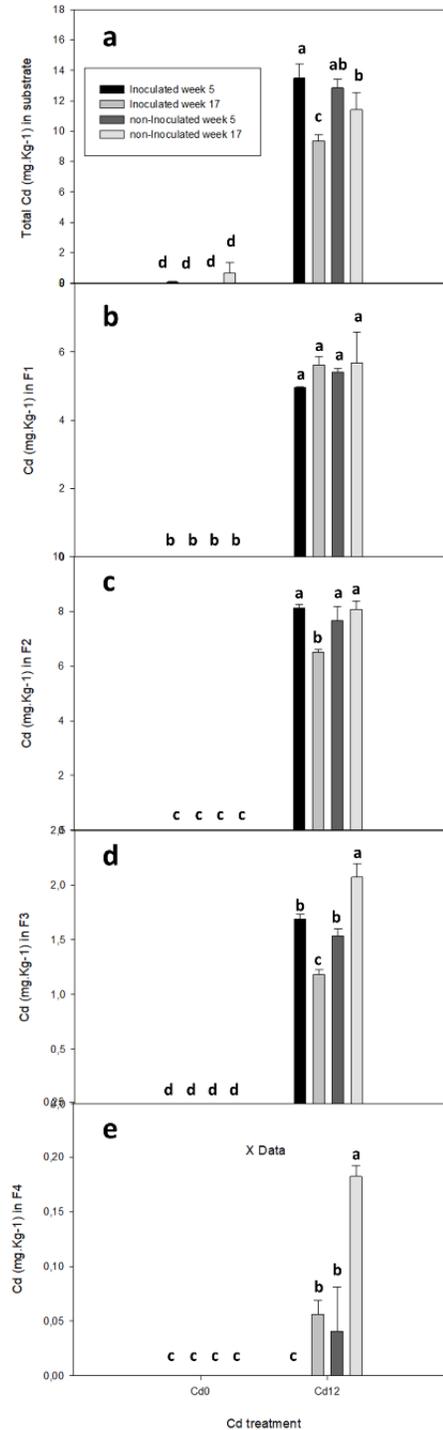


Figure 5.1. Effect of Cd amendment and AMF inoculation in total and extractable Cd in different substrate fractions in 5 and 17 WAS. a) Total Cd in substrate; b) Cd concentration in fraction 1 (soluble); c) Cd concentration in fraction 2 (reducible); d) Cd concentration in fraction 3 (oxidable); e) Cd concentration in fraction 4 (residual), n=6. Columns represent the means (\pm SE). Columns marked by different letters are significantly different according to Tukey HSD test ($P < 0.05$).

Regardless inoculation treatment, Cd concentration among different substrate fractions followed the order F2>F1>F3>F4 (Figure 5.1b-e). Majority of significant differences was found among Cd treatments throughout evaluation period (Table S5.4). Although Cd concentration in soluble fraction was similar in all Cd12 treatments at 17 WAS (Figure 5.1b), reducible and oxidable fractions followed the same pattern to that of total Cd concentration in substrate (Figure 5.1c-d). Cd concentration in residual fraction was significantly higher not only over time, but also between inoculation treatments. Substrate of non-inoculated plants contained more Cd in residual fraction than that of inoculated plants at 5 and 17 WAS (Figure 5.1e).

Cd Dynamic in plant and root colonization

A direct significant relationship was found between Cd concentration in substrate and Cd concentration in leaves, stem, roots, shoot and total Cd in substrate (table S5.5 and S5.6). Particularly, in Cd12 at 5 WAS, total plant Cd concentration significantly increased (21%) and Cd translocation efficiency was significantly higher when plants were inoculated (figure 5.2a-b). The same was true for Cd translocation efficiency at 13 WAS regardless Cd level (table S5.6). In Cd12 at 17 WAS no significant differences were found in Cd concentration and translocation efficiency between inoculated and non-inoculated plants (figure 5.2a-b). However, at 13 WAS absorption efficiency was significantly lower in inoculated compared to non-inoculated plants in Cd12 and Cd24 (Figure 5.2c and table S5.6).

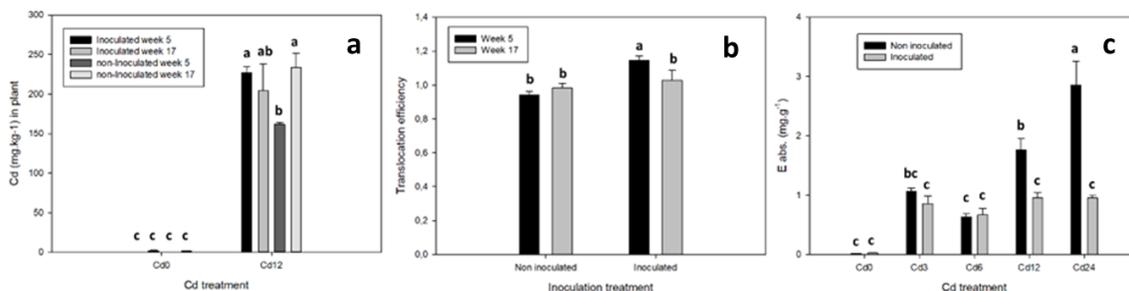


Figure 5.2. Effect of Cd amendment (Cd12) and AMF inoculation on Cd in plant. a) Plant Cd concentration; b) Cd translocation efficiency; c) Absorption efficiency at 13 WAS, n=6. Columns represent the means (\pm SE). Columns marked by different letters are significantly different according to Tukey HSD test ($P < 0.05$).

AMF root colonization percentage changed in response to Cd and AMF inoculation. Initially (5 WAS), root colonization was found to follow this order $Cd_{12} \geq Cd_3 = Cd_{24} = Cd_0 \geq Cd_6$ but it largely shifted to $Cd_3 \geq Cd_0 = Cd_6 = Cd_{24} \geq Cd_{12}$ at 9 WAS (table S7). At 5 and 9 WAS, AMF root colonization was higher in inoculated plants (table S5.7). At 5 WAS, increasing Cd concentration in substrate decreased colonization in non-inoculated plants but increased in inoculated plants (Figure 5.3a). Interestingly, at Cd0 AMF colonization remained similar for inoculated and non-inoculated plants, meanwhile at Cd12 root colonization of non-inoculated plants significantly increased from 5 WAS (2,46%) to 17 WAS (15,29%) while, at the same period, root colonization remained similar for inoculated plants (12,26% to 12,58%) (Figure 5.3b).

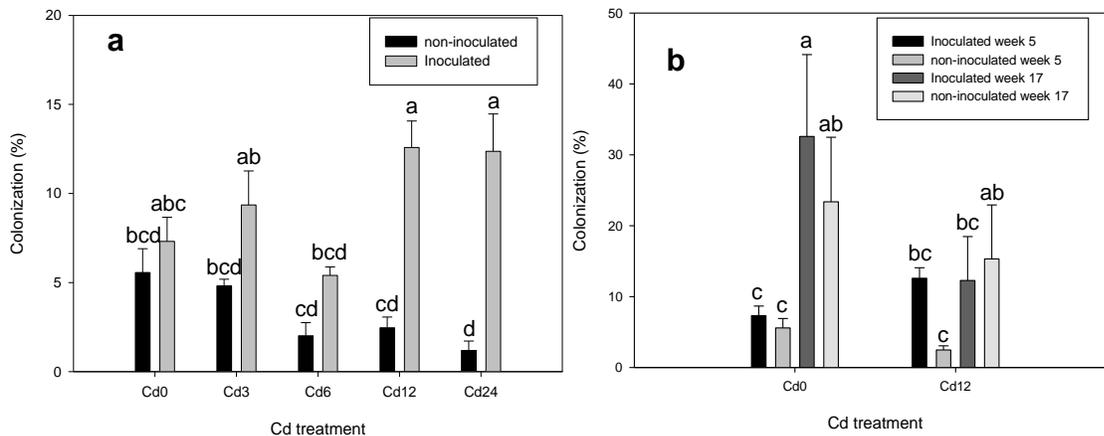


Figure 5.3. Effect of Cd amendment and AMF inoculation on root colonization percentage. a) in 5 WAS at all evaluated Cd concentrations and b) in WAS 5 and 17 at Cd0 and Cd12, n=6. Columns represent the means (\pm SE). Columns marked by different letters are significantly different according to Tukey HSD test ($P < 0.05$).

Physiological, morphological and growth responses

Chlorophyll index and stomatal conductance decreased as Cd treatment increased. For chlorophyll index at 5 and 9 and for stomatal conductance, at two first sampling times. Stomatal conductance was higher in inoculated plants than in non-inoculated ones regardless Cd treatment only at 9 WAS (table S5.8 and S5.9). With regard to fluorescence,

performance index, efficiencies and energy fluxes they decreased whilst D_{lo}/C_{Sm} increased when Cd levels increased throughout evaluation period. Meanwhile, ϕR_o , E_{To}/C_{Sm} , R_{Eo}/C_{Sm} and performance index were positively influenced by AMF inoculation regardless Cd level only at 5 WAS. Interestingly, at 5 WAS AMF inoculated plants yielded lower D_{lo}/C_{Sm} but it turned to be higher than non-inoculated plants at 9 WAS (table S5.10).

Height, leaf number and stem diameter tended to decrease with high Cd levels, mainly at Cd12 and Cd24. At 5 WAS, Cd amended and inoculated plants shown lesser stem diameter than non-inoculated ones. Root length was not significantly affected neither by Cd nor AMF inoculation (table S5.11).

Total and organ plant weight decreased as Cd levels increased. At 13 WAS, inoculated plants showed higher root dry weight and lower stem dry weight than non-inoculated plants, particularly in Cd24 (table S5.12). Root to shoot ratio decreased as Cd level increased at 9 WAS, but it shifted to an opposite pattern at 13 WAS (Figure 5.4a-b and table S5.12). Inoculated plants had higher root to shoot ratio at 5 and 13 WAS. RSL was high at higher Cd levels from 9 to 17 WAS but it was lower in inoculated plants, specifically in Cd12 and Cd24 at 13 WAS (table S5.12).

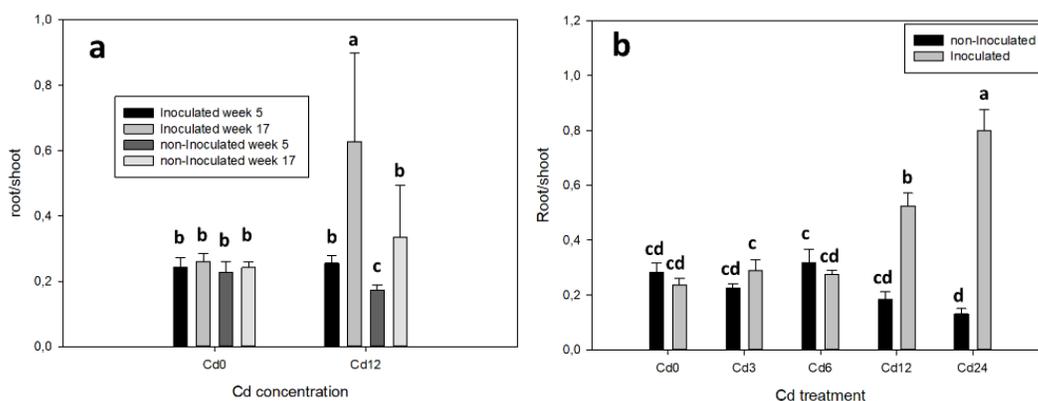


Figure 5.4. Effect of Cd amendment and AMF inoculation on root/shoot ratio. a) in WAS 13 at Cd0 and Cd12 and b) all Cd treatments at WAS 13, n=6. Columns represent the means (\pm SE). Columns marked by different letters are significantly different according to Tukey HSD test ($P < 0.05$).

5.4 Discussion

Cd in substrate cocoa plants inoculated with AMF

Cd substrate concentration decreased when AMF inoculation was performed indicating that Cd moved from substrate to plant. Also, no Cd leakage was allowed and depletion process was recorded only 17 WAS at Cd12 which indicates that this is a relatively slow process. Similar pattern of depletion in reductible and oxidable fractions (Figures 5.3a-e) indicates that Cd absorption in inoculated plants also decreased Cd allocation to these fractions. Roots of inoculated plants were bigger than non-inoculated plants, thus, inoculated plants explored a wider substrate space and absorbed more Cd in comparison with non-inoculated ones.

Progressive Cd adsorption to residual fraction in substrate is consistent with reports in Oliveira et al. (2003) and Tokalioglu et al. (2000). They described how Cd increased in residual fraction throughout the time as a consequence of Cd binding to more stable crystalline forms. More depletion of Cd in fraction F2 and higher Cd concentration of inoculated plants (especially for Cd12 and Cd24) indicates that in inoculated plants Cd absorption is bigger than non-inoculated plants. This prevented a Cd greater stabilization from inoculation treatments which explains a smallest concentration present in F4 for inoculated plants.

Total heavy metal content do not provide enough information about its toxicity and doesn't give information on the different chemical forms, mobility, bioavailability or potential risk within the agro-system (Nemati et al, 2011). Therefore, metal speciation analyses on substrate is a better way to establish information about the dynamics of the metal in a given environment (Roberts et al. 2005). In this work we decided to use the BCR recommendation for acid substrates as it would be more suitable for the substrate and system used in the experiment as well as being the best way to compare our results with the already reported ones.

Most of Cd was found in fractions F1 and F2, where Cd is more available for plants. These results match with what has been previously reported by Wali et al (2014). They found that

Cd is weakly bound to the substrate at the more exchangeable fractions making Cd available for plant absorption. Our results indicate that Cd increased in residual fraction throughout the time, mainly in non-inoculated plants. Thus, less Cd was available/absorbed in non-inoculated cocoa plants.

There was non-detectable Cd presence, by the used method, at the used substrate (table S5.2). This made the substrate suitable for an acute exploration of Cd dynamics in the system substrate-AMF fungi-plant. It does not mean that low Cd concentrations could be present in the substrate but they would not be detected with instrumental methods used for Cd analysis (Limit of Quantification, LOQ = 0.35mg Cd.kg⁻¹)

Cd and AMF inoculated cocoa plants

Our results indicate that longer roots of inoculated plants may have caused a greater Cd uptake, which explains also the higher Cd concentrations in those plants. Cd movement from root to shoot was also higher in inoculated plants (Figure 5.2a-b and table S 5.6) at 5 WAS. Additionally, root Cd concentration was lower in inoculated plants (17 WAS) (table S5.6) indicating that Cd movement from root to shoot was permanent throughout the experimental time. Cd translocation from root to shoot modified the absorption efficiency because, as root had less Cd concentration, their growth was higher and the rate of Cd absorption per gram of biomass decreased (Figure 5.2c).

Most plants limit shoot Cd accumulation by restricting Cd movement to the xylem through both the symplasmic and the apoplasmic pathways (Lux et al. 2011). Thus, according to Lux et al (2011), symplasmic pathway is based on phytochelatins and vacuole sequestering at root cells whilst apoplasmic pathway is based on accelerated maturation of the endodermis (Casparian bands, suberin lamellae, and lignification closer to the root apex). Mycorrhizal association changes root anatomy (Odigie and Eziashi 2013) and endodermis. It is important noting that endodermis is important in coordinating signals to regulate root growth and responses to biotic and abiotic stimuli (Li et al. 2014). Therefore, it is reasonable to consider that inoculated AM fungi could modify root anatomy or functioning of the endodermis which is spatially important at Ca and Mg transference into the stele (Peterson and Enstone 1996). As Ca and Cd have similar atomic radius (Ellen and Costa 2010), Cd

transfer to the stele (and to the shoot) could be facilitated. Further experiments are needed to confirm this.

Chlorophyll index reflects a real time chlorophyll content (Parry et al. 2014) and stomatal conductance indicates the stomatal opening (Gimenez et al. 2005). Both parameters decreased as Cd increased since at 5 and 9 WAS (table S5.8) (13 and 17 WAS are not available for technical reasons). Chlorophyll and stomatal conductance are reported to be extremely sensitive to Cd stress (Murtaza et al. 2016; Shanying et al. 2017). This result indicates that cocoa plants were stressed from the beginning of the evaluation period when subjected to Cd stress. Although several reports show that AMF contributes to alleviate Cd stress (Rivera-Becerril et al. 2002; Hashem et al. 2016a, 2016b) and avoid chlorophyll decreasing or stomatal closure (Ilegang et al. 2007; Ying et al. 2010; Chen et al. 2011; Domínguez et al. 2011), here there was no evidence of this for cocoa plants. Further research is needed to understand how Cd affects chlorophyll synthesis or degradation or how it induces stomatal closure in cocoa plants.

Maximum quantum yields, for primary photochemistry (ϕ_{P_0}) indicate the efficiency of photosystem II (PSII) for trapping energy and reduce pheophytin and Q_A ⁴. The quantum yield for electron transport (ϕ_{E_0}) indicates the efficiency of PSII for transporting electrons further Q_A . In addition, quantum yield for reduction of photosystem I (PSI) end-electron acceptors (ϕ_{R_0}) indicates the efficiency of PSI for reduce NADP⁺ (Stirbet and Govindjee 2011). These three parameters decreased when Cd increased from the beginning of the stress until the end of experiment, i.e. from 5 WAS to 17 WAS (13 WAS is not available for technical reasons). Consequently, absorbed photon flux per cross-section (ABS/CS₀), maximum trapped exciton flux per excited cross-section (TRo/CS), electron transport flux from Q_A to Q_B per excited cross-section (ETo/CS) and electron transport flux until PSI end-electron acceptors per cross-section (REo/CS) significantly decreased as Cd increased. Finally, energy dissipation per cross-section (Dlo/CS) significantly increased as Cd increased. In general, low PSII efficiency, low photochemical energy flux, low NADP⁺ reduction and an increasing general energy for dissipation all over photochemical phase occurs when Cd stress increase. Therefore, Cd stress induced a low performance index for energy conservation from energy absorption to PSI end-electron acceptors reduction. Very

⁴ Quinone A

similar results were found in other species (Dezhban et al. 2015; Siliang et al. 2015; Paunov et al. 2018) but this is the first report for cocoa plants under Cd stress. .

Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation had a positive effect on electron transport. Q_A (ETo/CSm), PSI end-electron acceptors reduction (efficiency (ϕRo) and flux (REo/CSm)) resulted in a better PI_{total} . This result shows that inoculated AMF had a positive and localized effect in electron transport chain of thylakoid membrane, particularly after Q_A oxidation. However, this effect was only apparent at 5 WAS, indicating that cumulative effect of Cd could not be alleviated by inoculated AMF afterwards. Consequently, AMF fungi inoculation seems to alleviate Cd stress via stomatal conductance and post Q_A electron transport increasing (photosynthetic stimulation), but this phenomenon was not further observed in final sampling times (table S5.9 and S5.10).

Photosynthetic limitations, as consequence of chlorophyll, stomatal conductance and photosynthetic electron transport decreased under Cd amended, and this effect was reflected in less organ and total biomass in Cd stressed plants. Stem diameter and particularly stem height, which are normally correlated with shoot and total cocoa biomass (Fachin 2013), also decreased as Cd increased. Leaf number decreased as well, probably because Cd induced less meristematic activity (Fusconi et al. 2006; Kaznina et al. 2006; Pereira et al. 2017), and consequently, caused negative developmental effects.

Surprisingly, root length was not affected by Cd amended at any sampling time which is contrasting with several reports indicating that Cd induces a strong root length decrease (Lux et al. 2011). Many reports have also shown that root biomass diminishes when plants are subjected to Cd (Di Toppi and Gabbrielli 1999; Murtaza et al. 2016; Shanying et al. 2017). For cocoa plants in this research roots reduced their growth, which means that under Cd amendment, plants allocated less biomass to roots without affecting root length i.e. higher RSL (table S5.12). RSL represents the relationship between standard acquisition unit (root length) over resources investment in this unit (biomass) (Pérez-Harguindeguy et al. 2013). Pérez-Harguindeguy et al. found that, although plants with high RSL generally are considered more efficient at absorbing nutrients and water, they live less than those with low RSL. This could explain the increased absorption efficiency of Cd in higher Cd levels (Figure 5.2 and table S5.6)

Decreasing root to shoot ratio at 9 WAS results from low carbon allocation to root at the beginning of growth, which is a consequence of initial Cd accumulation (tables S5. S6 and S5.12). There is a shift in root to shoot ratio pattern afterwards, as a consequence of a drastic carbon restriction to shoot due to cumulative effect of higher Cd concentrations (Cd12 and Cd24) at 13 WAS and (table S5.12). In fact, stem dry weight decreasing was only significantly detected at 13 WAS. Probably, this carbon restriction to the shoot led plants to die (amended with Cd24) since there was a lack of photosynthetic and storage source of carbon.

Temporal photosynthetic stimulation and higher Cd translocation to shoot, better root growth (13 WAS) and a higher root to shoot ratio were observed (5 and 13 WAS) (table S5.12) in inoculated plants. Indeed, higher RSL in non-inoculated plants and a higher Cd absorption efficiency probably caused root (plant) mortality. ~~On the other hand,~~ Also, inoculated plants translocated more Cd to shoot (Figure 5.2a) causing shoot biomass decreasing and higher root to shoot ratio at 13 WAS (table S5.12). As shoot accumulated more Cd and it couldn't grow as root did, plants began to die, particularly at Cd24 because of higher total Cd concentration.

Cd and AMF inoculation of cocoa plants

AMF inoculation increased root colonization but this main effect was only apparent at 5 and 9 WAS (table S5.7). Substrate used in the experiment was not previously sterilized and harbored already existing unidentified AMF fungi and other microorganisms. Inoculation could increase AMF structures living in the substrate, i.e. spores and hyphae, which are suitable as propagules that probably increased colonization rate until 9 WAS (bio-augmentation). Thus, non-inoculated plants were probably more slowly colonized by already existing AMF fungi than inoculated plants.

Higher root colonization in inoculated plants subjected to Cd12 and Cd24 in 5 WAS (Figure 3a-b) was probably due to a relatively quick *cry for help* which stressed plants made through emitting signals i.e. strigolactones to stimulate AMF root colonization (López-Ráez et al. 2011). Already existing AM fungi in the substrate of non-inoculated plants could be negatively affected by increasing Cd concentrations (Figure 3a). Contrasting, bio-augmentation could provide additional AMF propagules. As a result, additional propagules

would respond to signaling from plants under Cd stress conditions. Other explanation for this result, is the potential capability of AMF inoculum (*R. irregularis* DAOM 197198) to survive or respond to plant's call in Cd presence, which could be different to those AMF fungi already living in the substrate, however this needs further confirmation.

In conclusion, under realistic conditions of cocoa plants propagation, successful Cd amendment allowed us make an acute exploration of Cd dynamics in the system substrate-AMF fungi-plant. Throughout nursery time, substrate Cd depletion at different fractions, matched with increased Cd absorption and translocation in AMF inoculated plants. Consequently, total and shoot Cd accumulation was higher in those plants. In leaves, Cd negatively affected chlorophyll content, stomatal conductance energy flux in photosynthetic photochemical phase. Although, AMF inoculation had an initial, positive and localized effect on root colonization, stomatal conductance and reduction of PSI end-electron acceptors, this was not permanent and finally, there was a reduction in AMF plant growth and the raising of root to shoot ratio.

5.5 Supplemental information

Table S 5.1. Chemical and physical substrate analysis.

pH	CO	N	Ca	K	Mg	Na	Al	ECEC	CEC	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Clay	Silt	Sand	Texture
	%		meq/100g						mg/Kg										
4,7	0,89	0,08	1,49	0,1	0,69	0,02	0,49	2,78	ns	19,1	0,37	156	9,49	2,38	0,21	9	15	76	FA

Table S 5.2. Total Cd concentration in substrate after stabilization.

Expected (mg.Kg ⁻¹)	Cd concentration				
	Obtained (mg.Kg ⁻¹)				
	sample 1	sample 2	sample 3	Average	Estandar deviation
0	0	0	0	0,00	0,00
3	3,65	3,75	3,72	3,70	0,10
6	5,71	4,28	5,63	5,20	0,80
12	11,94	10,8	10,22	11,00	0,90
24	22,4	19,84	18,27	20,20	2,10

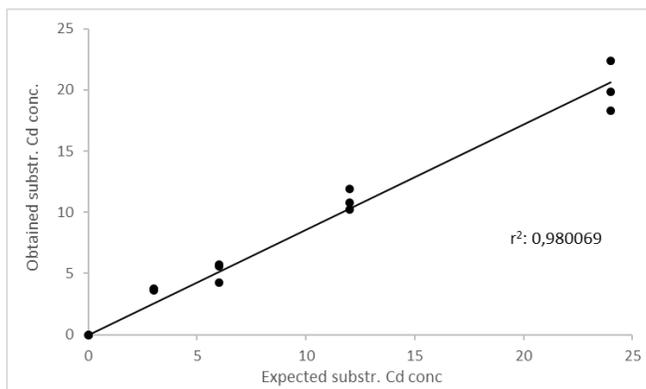


Figure S 5.1. Correlation between expected and obtained total substrate Cd concentration.

Table S 5.3. Total substrate Cd concentration across evaluation period, n=6. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	Substrate Cd concentration	757.44***	24>12>6=3>0	0.26ns	-----	1.01ns
9	Substrate Cd concentration	905.50***	24>12>6=3>0	3.17ns	-----	1.62ns
13	Substrate Cd concentration	722.03***	24>12>6=3>0	0.25ns	-----	0.12ns
17	Substrate Cd concentration ^a	22.32**	24>12>6=3>0	1.49 ns	-----	24.44**

Following descriptors are usable for following tables:

- a: non-parametric analysis
b: Root square transformation
c: Logarithmic transformation
d: Cosen transformation
e: Cubic root transformation
f: Natural logarithm transformation
g: Log (1+x) transformation
h: Sine transformation
i: (1/(1+exp(x))) transformation
ns: No significance

Table S 5.4. Cd concentration in substrate fractions across evaluated period, n=6. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	Cd F1 ^d	26.49**	24>12>6=3>0	0.51ns	-----	28.55**
13	Cd F1	52.75***	24>12>6=3>0	0.02ns	-----	28.56**
17	Cd F1	119.20***	12>6=3>0	0.083ns	-----	0.85ns
5	Cd F2	597.44***	12>6>3>0	10.79***	-----	3.10ns
13	Cd F2	83.94***	24>12>6=3>0	1.22ns	-----	0.52ns
17	Cd F2	1640.88***	12>6>3>0	32.64***	Non. Inoc> Inoc.	69.67***
5	Cd F3	1930.83***	24>12>6=3>0	909.22***	Inoc > no inoc	505.71***
13	Cd F3 ^d	30.32***	24>12>6=3=0	0.16ns	-----	30.96***
17	Cd F3	252.28***	12>6=3>0	27.05***	-----	27.34***
5	Cd F4 ^d	14.36**	24>12>6=3=0	0.27ns	-----	21.56*
13	Cd F4 ^d	15.44**	24>12>6=3=0	0.16ns	-----	22.54**
17	Cd F4	22.41***	12>6=3=0	0.013ns	-----	22.88***

Table S 5.5. Correlation among total Cd concentration in substrate and Cd concentration in plant.

	Cd (mg.Kg ⁻¹) in substarte	Cd (mg.Kg ⁻¹) in leaves	Cd (mg.Kg ⁻¹) in roots	Cd (mg.Kg ⁻¹) in stem	Cd (mg.Kg ⁻¹) in shoot
Cd (mg.Kg ⁻¹) in substarte	1				
Cd (mg.Kg ⁻¹) in leaves	0,81	1			
Cd (mg.Kg ⁻¹) in roots	0,88	0,77	1		
Cd (mg.Kg ⁻¹) in stem	0,88	0,83	0,85	1	
Cd (mg.Kg ⁻¹) in shoot	0,87	0,94	0,85	0,96	1

Table S 5.6. Effect of Cd and AMF inoculation on plant Cd concentration across evaluation period, n=6. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the

significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at $P < 0.05$.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	Leaf Cd Conc. ^a	46,94***	24>12≥6=3>0	1,64ns	-----	-----
9	Leaf Cd Conc.	75,27***	24>12>6=3>0	1,64ns	-----	8,79***
13	Leaf Cd Conc.	76,38***	24>12>6=3>0	8,81**	Inoc. > Non inoc.	4,04**
17	Leaf Cd Conc.	2,85ns	-----	1,01ns	-----	0,38ns
5	Root Cd Conc. ^a	49,87***	24>12>6=3>0	0,09ns	-----	-----
9	Root Cd Conc. ^b	169,51***	24=12>6=3>0	3,57ns	-----	1,34ns
13	Root Cd Conc. ^a	40,74***	24>12>6>3>0	0,17ns	-----	-----
17	Root Cd Conc. ^c	113,63***	24>12>6=3>0	6,06*	Non. Inoc.>inoc.	2,77*
5	Stem Cd Conc. ^a	35,37***	24>12>6=3>0	2,37ns	-----	-----
9	Stem Cd Conc. ^a	45,45***	24=12>6=3>0	0,01ns	-----	-----
13	Stem Cd Conc.	64,96***	24=12>6=3>0	9,53**	Inoc. > Non inoc.	3,88**
17	Stem Cd Conc.	99,11***	24>12>6=3>0	0,14ns	-----	1,0ns
5	Total Cd Conc. ^a	55,03***	24>12>6=3>0	0,66ns	-----	-----
9	Total Cd Conc. ^a	25,13***	24>12>6=3>0	0,0002ns	-----	-----
13	Total Cd Conc. ^a	25,15***	24=12>6=3>0	0,011ns	-----	-----
17	Total Cd Conc. ^a	21,35***	12=6=3>0	0,64ns	-----	-----
5	Leaf Cd content ^a	42,87***	24>12=6=3>0	1,89ns	-----	-----
9	Leaf Cd content	218,90***	24>12>6=3>0	0,0007ns	-----	8,89***
13	Leaf Cd content	76,38***	24>12>6=3>0	0,005ns	-----	4,03**
17	Leaf Cd content ^a	30,46***	12=6=3>0	2,01ns	-----	-----
5	Root Cd content ^a	49,87***	24>12>6=3>0	0,09ns	-----	-----
9	Root Cd content	44,61***	24>12>6=3>0	0ns	-----	1,38**
13	Root Cd content ^a	40,74***	24=12>6=3>0	0,17 ns	-----	-----
17	Root Cd content ^d	93,04***	12>6=3>0	0,0003ns	-----	4,5**
5	Stem Cd content ^a	51,12***	24>12>6=3>0	1,55ns	-----	-----
9	Stem Cd content ^a	45,45***	24=12>6=3>0	0,01ns	-----	-----
13	Stem Cd content ^e	64,96***	24=12>6=3>0	0,0ns	-----	3,88**
17	Stem Cd content	71,88***	12>6=3>0	0,0063ns	-----	0,31ns
5	Total Cd content ^a	46,97***	24>12>6=3>0	0,59ns	-----	-----
9	Total Cd content	52,70***	24=12>6>3=0	2,17ns	-----	0,62ns
13	Total Cd content	22,17***	24=12=6=3>0	0,80ns	-----	0,68ns
17	Total Cd content	26,95***	3=6=12>0	3,20ns	-----	0,99ns
5	Eabs. ^f	44,72***	24>12>6=3	0,61ns	-----	0,10ns
9	Eabs. ^f	31,50***	24>12>6=3	0,14ns	-----	0,44ns
13	Eabs. ^g	21,56***	24>12≥6=3	34,71***	Non. Inoc.>inoc.	9,74**
17	Eabs. ^a	7,76*	12>6=3	0,02ns	-----	-----
5	Etrs. ^a	17,62**	6=3≥12=24	2,33ns	-----	-----
9	Etrs.	21,93***	3=6≥24=12	2,34ns	-----	0,35ns
13	Etrs. ^a	0,14ns	-----	7,71**	Inoc. > Non inoc.	-----
17	Etrs.	13,18**	6=3>12	3,08ns	-----	1,75ns

Table S 5.7. Effect of Cd and AMF inoculation on root colonization percentage across evaluation period, n=6. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inocula	Order	Cd x AMF
5	Colonization percentage ^e	2,94*	12≥3=24=0≥6	62,2***	Inoc. > Non inoc.	5,73***
9	Colonization percentage	3,02*	3≥0=6=24≥12	5,05*	Inoc. > Non inoc.	0,35ns
13	Colonization percentage ^f	5,39**	6≥0=3≥12≥24	2,37ns	-----	0,55ns
17	Colonization percentage	0,90ns	-----	0,49ns	-----	0,47ns

Table S 5.8. Effect of Cd and AMF inoculation on chlorophyll index across evaluation period, n=8. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inocula	Order	Cd x AMF
5	Chlorophyll index	4,36*	3=6=0≥24≥12	1,05ns	-----	1,24ns
9	Chlorophyll index ^a	80,4***	0>3=6>12>24	0,51ns	-----	-----

Table S 5.9. Effect of Cd and AMF inoculation on stomatal conductance across evaluation period, n=4. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	Stomatal conductance ^f	3,78*	0=12=3=6≥24	0,38ns	-----	0,76ns
9	Stomatal conductance	4,67**	3=0≥6=12≥24	5,05*	Inoc. > Non inoc.	0,06ns

Table S 5.10. Effect of Cd and AMF inoculation on fluoresces parameters across evaluation period, n=4. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	phi (Po) ^a	14,97**	0=3=6≥12=24	0,63ns	-----	-----
9	phi (Po) ^a	73,88***	0=3=6>12>24	0,7ns	-----	-----
17	phi (Po)	2,76*	0=3=12≥6	0,21ns	-----	0,99ns
5	phi (Eo) ^a	24,89***	0>3=6=12≥24	1,91ns	-----	-----
9	phi (Eo)	66,36***	0=3=6>12>24	2,17ns	-----	0,71ns
17	phi (Eo)	1,13ns	-----	2,46ns	-----	0,01ns
5	phi (Ro)	8,83***	0=3=6≥12=24	7,52**	Inoc. > Non inoc.	0,84ns
9	phi (Ro)	58,74***	0=3=6>12>24	1,09ns	-----	0,11ns
17	phi (Ro)	2,21ns	-----	3,12ns	-----	1,46ns
5	ABS/Csm	2,32ns	-----	1,22ns	-----	0,7ns
9	ABS/Csm ^a	14,28**	0=24=3=6≥12	1,68ns	-----	-----
17	ABS/Csm	4,59**	0=12=3≥6	0,04ns	-----	0,43ns
5	Dlo/Csm ^a	12,64*	12=24=0=6>3	4,15*	Non inoc > Inoc.	-----
9	Dlo/Csm ^a	51,59***	24>12>0=6=3	9,0**	Inoc. > Non inoc.	-----
17	Dlo/Csm	1,32ns	-----	1,1ns	-----	1,73ns
5	TRo/Csm ^a	12,75*	0=6≥24=3=12	0,76ns	-----	-----
9	TRo/Csm ^a	39,43***	0=3≥6>12=24	0,27ns	-----	-----
17	TRo/Csm ^a	3,99*	0=3=12≥6	1,36ns	-----	-----
5	ETo/Csm ^a	27,03***	0>6=3>24=12	1,2ns	-----	-----
9	ETo/Csm	50,70***	0=3=6>12=24	0,02*	Inoc. > Non inoc.	1,42ns
17	ETo/Csm	1,47ns	-----	2,23ns	-----	0,09ns
5	REo/Csm	9,42***	0=6=3≥12≥24	4,12*	Inoc. > Non inoc.	0,89ns
9	REo/Csm	51,50***	0=3=6>12=24	3,35ns	-----	0,4824ns
17	REo/Csm	2,36ns	-----	2,01ns	-----	0,4493ns
5	PI total ^a	24,54***	0>3=6=12≥24	5,70*	Inoc. > Non inoc.	-----
9	PI total ^a	85,58***	0=3=6>12>24	0,5ns	-----	-----
17	PI total ^a	0,44ns	-----	0,92ns	-----	-----

Table S 5.11. Effect of Cd and AMF inoculation on morphological parameters across evaluation period, n=8. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at $P < 0.05$.

Week	Parameter	Cd concentration	Order	AMF inocula	Order	Cd x AMF
5	Height (cm)	2,96*	3=6>0=24>12	1,17ns	-----	3,37*
9	Height (cm)	0,97ns	-----	0,02ns	-----	0,15ns
13	Height (cm)	4,67*	0>3=6>12=24	0,01ns	-----	0,21ns
17	Height (cm)	11,76***	0>3>6>12	0,2046ns	-----	3,09*
5	Leaf number	1,80ns	-----	0,35ns	-----	2,84ns
9	Leaf number ^a	19,95**	3=0=6=12>24	0,29ns	-----	-----
13	Leaf number ^f	13,20***	6=3=0>12=24	0,01ns	-----	1,64ns
17	Leaf number ^f	8,78***	0=3=6>12	0,01ns	-----	0,56ns
5	Stem diameter ^h	8,58***	6=0=12=3>24	15,91**	Non inoc > Inoc.	2,14ns
9	Stem diameter	8,73***	3=0=12=6>24	0,85ns	-----	0,52ns
13	Stem diameter	8,99***	0=6>12=3>24	0,29ns	-----	0,30ns
17	Stem diameter	7,70**	3=6=0>12	0,96ns	-----	0,40ns
5	Root length	0,93ns	-----	0,09ns	-----	0,82ns
9	Root length	2,01ns	-----	0,01ns	-----	0,42ns
13	Root length ^f	1,44ns	-----	0,45ns	-----	3,11*
17	Root length	2,03ns	-----	0,01ns	-----	1,70ns

Table S 5.12. Effect of Cd and AMF inoculation on growth parameters across evaluation period, n=4. DW: dry weight; RSL: root specific length. The data represent the results of two-way ANOVA (F-values). For the significant effects of single factors, the results of post-hoc comparisons are given according to the Tukey HSD test or Z value test (for the non-parametric analyses), both at P<0.05.

Week	Parameter	Cd concentra	Order	AMF inoculation	Order	Cd x AMF
5	Leaves DW	0,97ns	-----	0,82ns	-----	0,91ns
9	Leaves DW ^a	7,29***	0=3≥12=6≥24	0,25ns	-----	-----
13	Leaves DW ⁱ	12,28***	3=0=6>12=24	0,01ns	-----	0,66ns
17	Leaves DW	7,43***	3=0=6>12	1,07ns	-----	0,34ns
5	Root DW	1,86ns	-----	1,19ns	-----	0,55ns
9	Root DW ⁱ	8,9***	3=0=6≥12≥24	0,04ns	-----	1,52ns
13	Root DW	2,97*	6≥3=0=12≥24	9,53**	Inoc. > Non inoc.	4,08**
17	Root DW ^g	5,10**	3=6>0≥12	0,28ns	-----	0,40ns
5	Stem DW	2,41ns	-----	5,21*	Non inoc > Inoc.	1,52ns
9	Stem DW	2,36ns	-----	2,71ns	-----	2,40ns
13	Stem DW ^f	15,73***	6≥0=3≥12>24	19,20***	Non inoc > Inoc.	4,05**
17	Stem DW ⁱ	5,75*	0=3=6>12	0,75ns	-----	0,67ns
5	Total DW	1,80ns	-----	0,43ns	-----	1,12ns
9	Total Dw ^a	22,49***	0=3≥6=12>24	0,01ns	-----	-----
13	Total DW ^a	23,65***	6=0=3>12=24	0,28ns	-----	-----
17	Total DW	52,23***	3=0=6>12	1,69ns	-----	1,19ns
5	Shoot DW	1,38ns	-----	1,25ns	-----	1,28ns
9	Shoot DW	6,33***	0=3≥12=6≥24	0,04ns	-----	1,47ns
13	Shoot DW ^g	13,36***	3=6=0>12=24	2,32ns	-----	1,17ns
17	Shoot DW	8,39***	3=0=6>12	0,84ns	-----	0,34ns
5	Root /Shoot ^a	1,83ns	-----	5,70*	Inoc. > Non inoc.	-----
9	Root /Shoot	6,43***	3=0=6≥12≥24	0,01ns	-----	1,76ns
13	Root /Shoot ^g	7,33***	24≥12≥6=0=3	64,30***	Inoc. > Non inoc.	30,74***
17	Root /Shoot ^a	10,83*	6=3≥12=0	0,01ns	-----	-----
5	RSL	1,15ns	-----	2,06ns	-----	0,17ns
9	RSL ^a	19,23***	24=12≥6≥0=3	0,05ns	-----	-----
13	RSL ^f	3,28*	24≥12=0=3≥6	10,66**	Non inoc > Inoc.	3,02*
17	RSL ^a	9,03*	12>0=6=3	0,36ns	-----	-----



Experimentación en cacao. Fotografía: JCFL.

6.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

6.1 Introducción

El cacao (*Teobroma cacao* L.) es ampliamente valorado en el mundo por su calidad nutricional (Rucker 2009; ICCO 2015), 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. 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 and Akinci 2009), maní (Xia et al. 2015; Liu et al. 2017), 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 (Suzuki et al. 2014; Pandey et al. 2017; Bai et al. 2018).

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-remediación⁵(Abu-Elsaoud et al. 2017) con efectos diferentes debidos a especies o genotipos de la misma especie de planta o de hongo utilizados (Kaldorf et al. 1999; Redon et al. 2009; Miransari 2011; Hassan et al. 2013) entre otros factores ambientales (Chen et al. 2003; Ultra et al. 2006; Leung et al. 2010b)

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 and 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 (Ruiz-Lozano 2003; Porcel and Ruiz-Lozano 2004; Wu and 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 and 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.

⁵ En cuyo caso se denomina como micorremediación.

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?

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 capítulo 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.

6.1 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.

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 (Croll et al. 2008; Angelard et al. 2010, 2014; Angelard and Sanders 2011; 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 and Fortin 1988) del que se 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?

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 -0,033 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:

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 a 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 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 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 QA^- ($\psi(E_o)$), la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de QA^- ($\phi(E_o)$), la eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón hasta su aceptor final en el PSI⁶ ($\delta(R_o)$), la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón hasta su

⁶ NADPH.

aceptor final en el PSI ($\varphi(R_o)$), 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), 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). Adicionalmente, se calculó el área foliar específica (AFE) como el cociente entre el área foliar y el peso foliar (Hunt 2013). 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 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): Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de Aguas y Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La concentración de Cd a nivel de planta se determinó en raíz y en parte aérea de cuatro plantas al final de cada experimento. A nivel del sustrato, se determinó la concentración de Cd total (Cdt) y disponible (Cdd) al principio y al final de cada experimento. Al principio de cada experimento se tomó una muestra compuesta del sustrato utilizado mientras que al final de cada experimento desde cada unidad experimental según su respectivo tratamiento. 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) (Wang et al. 2007; Hu et al. 2013), eficiencia en la translocación ($E_{tr_{raiz}}$) (cociente entre la concentración de Cd en la parte y la de raíz (Stoltz and 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 mm 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. 1998b). Luego de la tinción de las raíces se evaluó el porcentaje de colonización utilizando el método de intersección de la grilla (Giovannetti and 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 trasplante (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 (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.

6.2 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.

Tabla 6.1. Efecto del Cd y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao. Long. Raíz: longitud de raíz; PS: Peso seco; PSTot: peso seco de toda la planta; PSPA: peso seco de la parte aérea; ITCd: índice de tolerancia; PA: parte aérea; Eabs: eficiencia en la absorción; Etrs: eficiencia en la traslocación; Cdt: cadmio total; Cdd: cadmio disponible; FCB: factor de concentración biológica; para los parámetros de fluorescencia remitirse al texto o lista de siglas, n=4 (para PS y cálculos derivados n=8). Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns =

no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

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
PS Tot ^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 ^g	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) ^g	34,12***	Con Cd>Sin Cd	14,34*	A1=C3=C2≥Z15=Z25=A5≥X38≥no inoculación
Concentración de Cd - PA (mg/Kg) ^g	51,27***	Con Cd>Sin Cd	4,68ns	---
Extracción de Cd - Raíz (mg) ^g	30,54***	Con Cd>Sin Cd	8,61ns	---
Extracción de Cd - PA (mg) ^g	37,14***	Con Cd>Sin Cd	2,77ns	---
Extracción de Cd - Total (mg) ^g	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**	Con 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 transplante

N/A: No aplica

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).

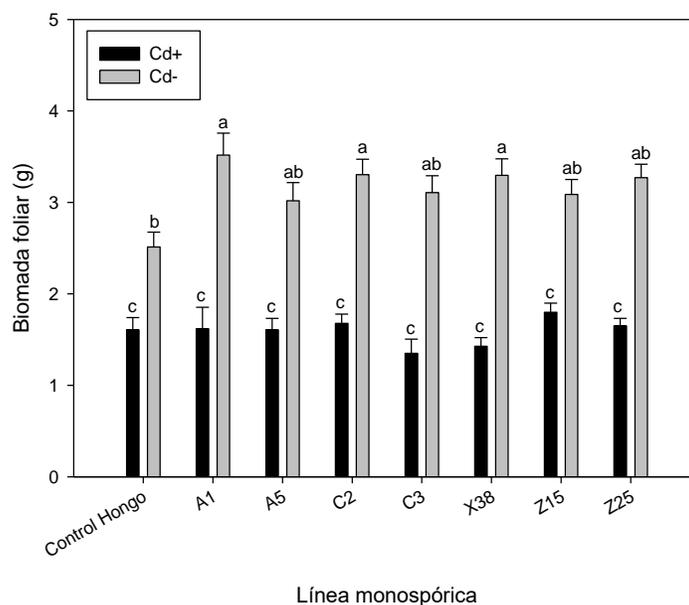


Figura 6.1. Efecto de las diferentes líneas monospóricas de *R. irregularis* en la biomasa foliar de plantas de cacao sometidas a Cd, n=8. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

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).

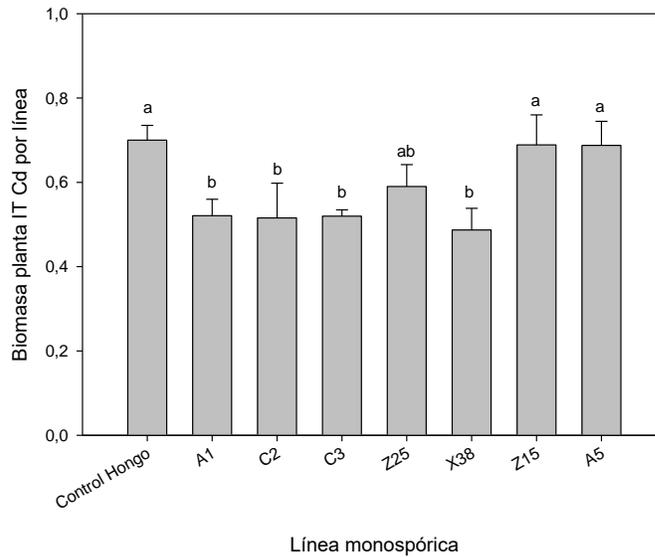


Figura 6.2. Índice de tolerancia (IT) individual por cada línea monospórica inoculante de plantas de cacao, $n=12$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

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. Es importante resaltar que la concentración de Cd total al inicio del experimento fue de $0,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y de Cd disponible de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

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 plantas inoculadas con esta última línea concentraron significativamente más Cd que las inoculadas con la línea X38 ($131,26 \text{ mg.Kg}^{-1}$).

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 $34,89 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y $23,50 \text{ mg.Kg}^{-1}$, respectivamente. Por su parte, en el sustrato sin enriquecimiento de Cd, el Cdt y Cdd fue en promedio de $0,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$, 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 F_v/F_o , $\phi(P_o)$, $\psi(E_o)$, $\phi(E_o)$ 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 $\delta(R_o)$ desde la semana cuatro DT. También se observó la disminución de $\phi(R_o)$ y PI_{total} en respuesta al Cd solamente en las semanas siete y 10 DT (Tabla 6.1).

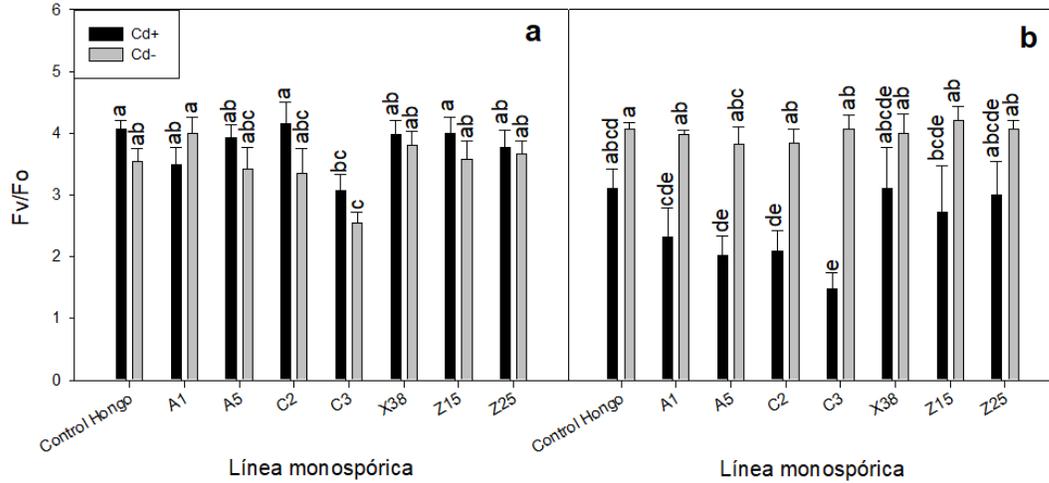


Figura 6.3. Eficiencia máxima potencial con base en F_o de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a Cd. A) Muestreo 1 (4 semanas DT) y b) Muestreo 3 (10 semanas DT), $n=4$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

De forma similar, los parámetros de fluorescencia F_v/F_o , $\phi(P_o)$, $\psi(E_o)$, $\phi(E_o)$ 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 inoculadas con X38 tuvieron los mayores valores y las inoculadas con C3 los menores valores. Por el contrario, los valores de $\delta(R_o)$ 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). No se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas.

Tabla 6.2. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia. LER: longitud específica de la raíz; Cdt: cadmio total; Cdd: cadmio disponible; Eabs: eficiencia en la absorción; Etrs: eficiencia en la translocación; FCB: factor de concentración biológica. PS: peso seco; PS: peso seco; PSPA: peso seco de la parte aérea. n=4 (para PS y cálculos derivados n=8).

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/Raíz)
 N : FCB (Cdt)
 N : FCB (Cdd)
 O : Long. Raíz
 P : PS Raíz
 Q : PS Tallo
 R : PS Hojas
 S : PSTot
 T : PSPA
 U : Raíz/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 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.

Tabla 6.3. Efecto del déficit hídrico y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao. Long. Raíz: longitud de raíz; PS: Peso seco; PSTot:

peso seco de toda la planta; PSPA: peso seco de la parte aérea; ITCd: índice de tolerancia; PA: parte aérea; Eabs: eficiencia en la absorción; Etrs: eficiencia en la traslocación; Cdt: cadmio total; Cdd: cadmio disponible; FCB: factor de concentración biológica; para los parámetros de fluorescencia remitirse al texto o lista de siglas, n= 4 (para PS y cálculos derivados n=8). Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, ns =

no-significativo. Para los efectos significantes de los factores individuales los resultados se presentan de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$).

Parametro	Estrés hídrico	Orden	Genotipo HFMA	Orden	Esgtrés 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 \geq Z15=C2 \geq 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 \geq C3=Z15=A1=Z25=control=X38 \geq C2	0,55ns
ϕ (Eo) (7 sdt)	35,32***	hidratadas>estresadas	2,22*	A5 \geq C3=Z15=Z5=A1=control=X38 \geq 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 \geq A1=Z25 \geq X38=C3	3,14**
ϕ (Po) (10 sdt)	15,06**	hidratadas>estresadas	3,23**	Z15=A5=C2=control \geq A1 \geq Z25 \geq C3 \geq 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 transplante

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 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.

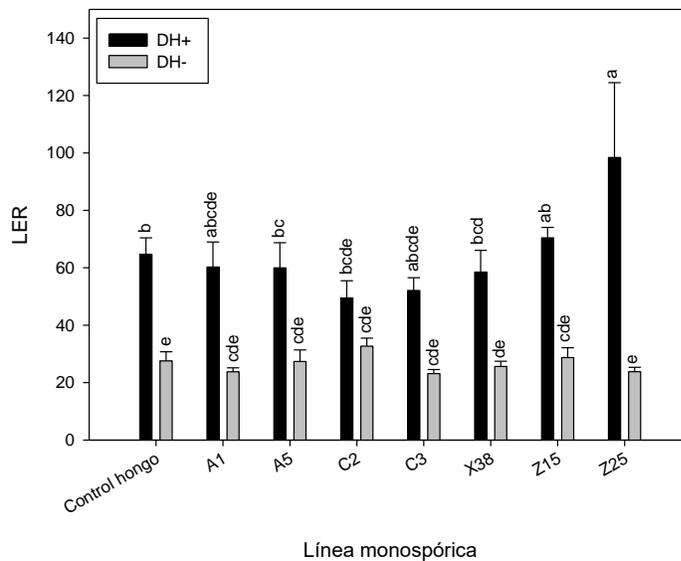


Figura 6.4. Longitud específica de la raíz con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico, $n=8$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

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 $\psi(E_0)$ y $\phi(E_0)$ fueron menores en las plantas inoculadas con la línea monospórica C2 con respecto a las inoculadas con A5. En la semana 10 DT, los parámetros F_v/F_0 y $\phi(P_0)$ 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).

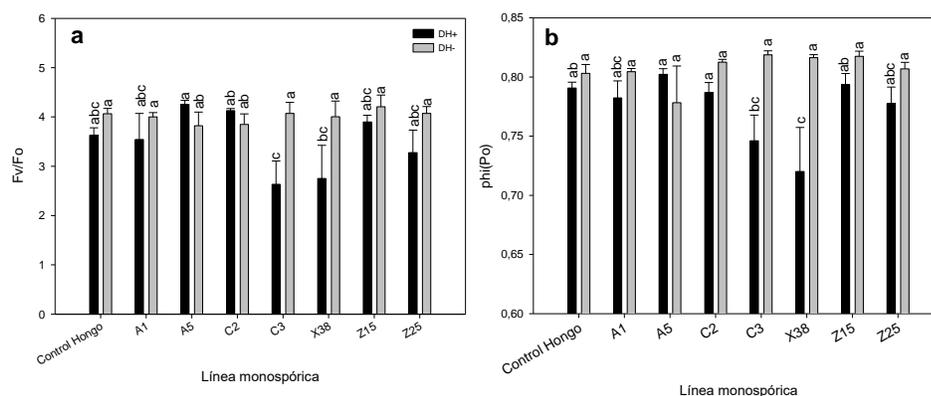


Figura 6.5. Eficiencia máxima potencial con base en F_0 y $\phi(P_0)$ de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a déficit hídrico (Semana 10 DT), $n=4$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

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). No se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas.

Tabla 6.4. Índice de tolerancia compuesta frente al Cd de plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas de HFMA, sin considerar parámetros de fluorescencia. LER: longitud específica de la raíz; PS: peso seco; PS: peso seco; PSPA: peso seco de la parte aérea. n=4 (para PS y cálculos derivados n=8).

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

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%. El AFE no varió significativamente frente a los tratamientos evaluados (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Efecto del estrés combinado y del genotipo de HFMA sobre parámetros fisiológicos y de crecimiento de plantas de cacao. n= 4 (para PS y cálculos derivados n=8). Los datos representan los resultados del ANOVA de doble vía (*valor F*). Los niveles de significancia se identifican así: *** = p<0.001, ** = p<0.01, * = p<0.05, ns = no-significativo.

Parametro	Estrés	Orden	Genotipo HFMA	Orden	Estres 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*	---	0,52ns	---	1,33ns
Peso seco foliar	0,65ns	---	0,45ns	---	0,56ns
Peso seco parte aerea	0,31ns	---	0,17ns	---	0,50ns
Peso seco total	0,56ns	---	0,19ns	---	0,48ns
Relación raíz/parte aerea	2,06ns	---	0,53ns	---	1,23ns
AFE	0,5ns	---	0,8ns	---	0,7ns
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	1,88ns	---	---
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 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 $E_{\text{raíz}}$ 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). No se observaron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas.

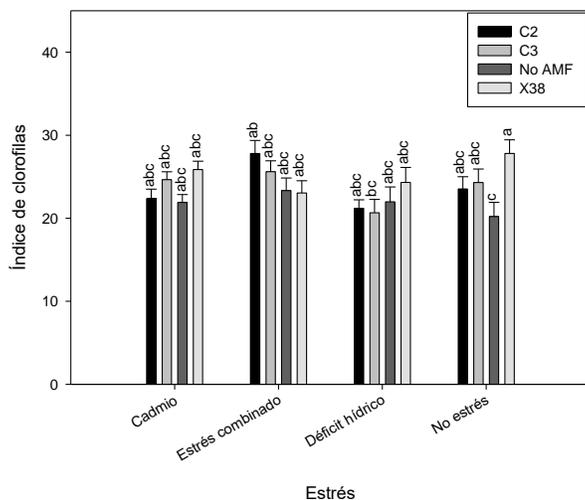


Figura 6.6. Índice de clorofilas de plantas de cacao inoculadas con diferentes líneas monospóricas de FMA y sometidas a estrés combinado, $n=8$. Las columnas representan las medias (\pm DE). Las columnas marcadas con letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

6.3 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 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 (Smith and Smith 2011; Smith et al. 2011; Bucking et al. 2012) 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 $E_{\text{trs-raiz}}$ y el FCB (C_{dd}) 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 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 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 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 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 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 C_{dd} constituyó, en el primer experimento, el 67% del C_{dt} , 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 reducción de la feofitina y la Q_A ⁷. 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 ($\phi(P_o)$).

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^- ($\phi(E_o)$).

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 PSI⁸ ($\delta(R_o)$) y la probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón hasta su aceptor final en el PSI ($\phi(R_o)$).

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

⁷ Quinona A.

⁸ NADPH.

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.

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 (Wu et al. 2003) y repollo (Paschalidis et al. 2013). Es un fenómeno conocido como hornesis (Barcelo and 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 $\delta(R_o)$, 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, 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 simbiontes, 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; Smith and Smith 2013; Klironomos 2016). 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 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 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 and Fonseca 2016) o para conservar el balance entre moléculas antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Caravaca et al. 2005; Alguacil et al. 2006). Luego de la semana cuatro DT, el PI_{abs} fue mayor en las plantas hidratadas indicando que las plantas se estresaron posteriormente.

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-excitación 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 (Zlatev and Yordanov 2005; Pinheiro and Chaves 2011; Murata et al. 2012; Gururani et al. 2015). 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 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 celular o expansión celular 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 ingreso de CO_2 a los cloroplastos para su reducción en el ciclo de Calvin (Dalal and Tripathy 2018). El resultado de esta limitante es la restricción del crecimiento (Pinheiro and 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 $E_{trs_{raiz}}$ 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.

6.4 Conclusiones

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 sí 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 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. No 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 hospedadoras.

6.5 Información suplementaria

Table S 6.1. 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

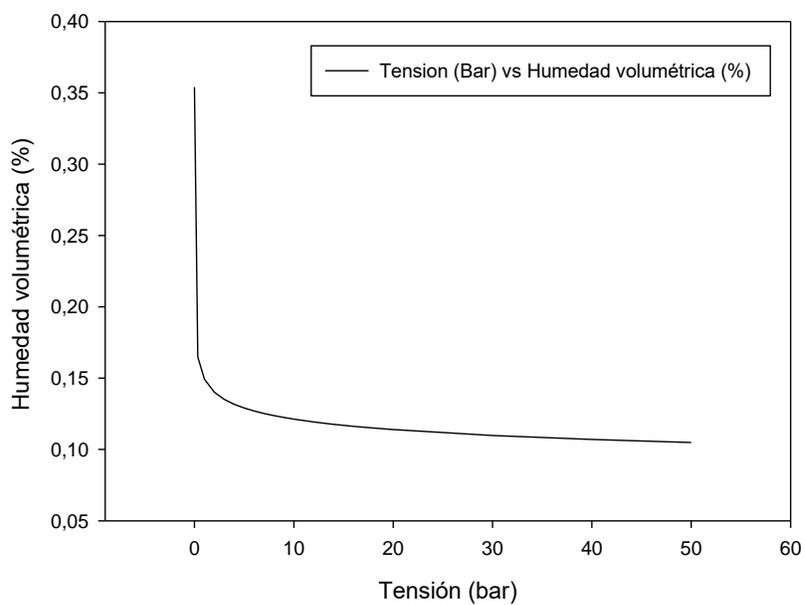


Figura S 6.1. Curva de tensión de humedad del sustrato utilizado en los ensayos de este capítulo.

Table S 6.2. 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	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

- 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. Raíz
 X : PS Raíz
 Y : PS Tallo
 Z : PS Hojas
 AA : PSTot
 AB : PSPA
 AC : Raíz/PA

Table S 6.3. 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. Raíz
 L : PS Raíz
 M : PS Tallo
 N : PS Hojas
 O : PSTot
 P : PSPA
 Q : Raíz/PA



Semillero de investigación en agricultura tropical SIAT. Fotografía: Julian Cárdenas.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Las plantas de cacao tienen una alta susceptibilidad al estrés por déficit hídrico, lo cual es evidente a partir de las evidencias obtenidas con respecto a las limitaciones estomáticas de la fotosíntesis, a limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis, a la modificación del estatus nutricional, y a algunas características morfológicas y de crecimiento.

La absorción de Cd por parte de las plantas de cacao, se modifica con la concentración de este metal en el sustrato. Generalmente, hay una mayor absorción, pero menor translocación en presencia de concentraciones elevadas de Cd. De igual forma, la concentración de Cd en el sustrato determinó claramente las respuestas de las plantas de cacao frente a este estrés, siendo las concentraciones más altas, las más deletéreas.

El ecotipo 009 del hongo FMA *R. irregularis* (Glomygel®), no modificó la respuesta de las plantas de cacao frente al estrés por déficit hídrico e incrementó la absorción de Cd cuando este se encontraba en el sustrato. Sin embargo, cuando las plantas se inocularon con líneas monospóricas genéticamente diferentes, sus respuestas fisiológicas variaron de acuerdo a algunos de los parámetros evaluados.

De forma interesante, la identidad de las líneas monospóricas que indujeron las respuestas más y menos favorables de las plantas a estrés por déficit hídrico y por Cd, respectivamente, fue la misma. En este contexto, particularmente la línea monospórica X38 parece contribuir al mantenimiento de la integridad de las membranas aun cuando esta función en condiciones de estrés es objeto de futuras investigaciones.

7.2 Recomendaciones

Esta investigación pone en evidencia la importancia y factibilidad de realizar evaluaciones funcionales de los HFMA en condiciones realistas, pero también pone de manifiesto la necesidad de conocer a fondo la dinámica de los factores ambientales asociados a la respuesta funcional de la inoculación, incluyendo los factores bióticos y abióticos del sistema en estudio. Consecuentemente, es muy recomendable generar líneas de estudio en HFMA que consideren la variabilidad ambiental más allá de los estudios bajo condiciones controladas y por lo tanto menos aplicables a sistemas reales.

El presente estudio no se puede considerar como un tamizaje *screening* de líneas monospóricas de *R. irregularis*. En consecuencia, con base en la información obtenida en este estudio, es recomendable realizar análisis de una mayor cantidad de líneas monospóricas evaluando parámetros apropiados para el desempeño de las plantas en condiciones de estrés, por ejemplo, los relacionados con la fluorescencia de la clorofila a. Con base en la experiencia adquirida durante el proceso doctoral, se puede afirmar que esta recomendación no solamente aplica para plantas de cacao sino también para otros genotipos de esta y otras especies de plantas, así como también para otras líneas monospóricas aún no analizadas. Así, se abre la posibilidad para explorar un acervo genético mayor al actual y para aprovechar aquellas interacciones favorables.

El presente estudio, fue realizado en su totalidad bajo las mismas condiciones de vivero, lo que puede ser aprovechado para plantear investigaciones que estudien el comportamiento de plantas inoculadas en vivero con HFMA, al ser sometidas a transplante en campo.

Las condiciones en que se realizó el estudio, no permitieron la utilización de equipos de mayor tecnología lo que no permitió una mayor comprensión de la respuesta de las plantas inoculadas con diferentes líneas monospóricas, particularmente a nivel de fotosíntesis o de daño oxidativo. Así, la recomendación es analizar los genotipos contrastantes identificados en esta investigación para su estudio funcional con las técnicas planteadas.

En el planteamiento de los experimentos de este estudio, se consideró la optimización de los recursos y la eficiencia en la obtención de información en atención a la necesidad de adicionar Cd al sustrato lo que supone un impacto ambiental. Si bien, se tomaron las precauciones para evitar la contaminación innecesaria de sustrato y para seguir los

conductos de descontaminación del mismo, futuros experimentos podrían utilizar suelo conocido de zonas contaminadas y con base en la información del presente estudio, contrastar los resultados.

Los resultados obtenidos, no solo abren la posibilidad a futuros tamizajes sino también a la posibilidad de realizar estudios de asociación rasgo-marcador basados en información genómica y fenómica que de lo HFMA y su interacción con plantas hospederas se está obteniendo.

8.ANEXOS

A. ANEXO: Artículo científico de investigación realizado en el marco de esta investigación.

Fernández, J. C., W. Bohórquez, and A. Rodríguez. 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. *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas*. 10(2):367–380.

Doi: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.4702>

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



JOHN CRISTHIAN FERNÁNDEZ L.^{1,2}
WILSON BOHÓRQUEZ S.¹
ALIA RODRÍGUEZ²

Evaluación de plantas de cacao en un vivero de la Universidad de La Salle.

Foto: J.C. Fernández L.

RESUMEN

El éxito de las estrategias de expansión de la producción cacaotera en Colombia por cuenta de las nuevas oportunidades del mercado requiere entre otros, de producción de plantas de alta calidad. A pesar de que uno de los factores más determinantes para la calidad del material vegetal en vivero es la nutrición, la información existente no considera características genéticas y fisiológicas inherentes a las plantas ni el balance de nutrientes a partir de las condiciones locales para recomendaciones de fertilización en el país. Con el objetivo de analizar la dinámica nutricional de plantas de cacao (IMC67) cuando son sometidas a diferentes dosis de fertilizantes con N, P y K en etapa de vivero, se establecieron tres ensayos con dosis variables de N, P y K a partir de su relación porcentual, con una dosis de referencia. A los 124 días después de siembra, se determinó la biomasa seca y el contenido nutricional de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn y B de las plantas y se estimaron parámetros de dinámica nutricional, de correlación entre nutrientes y de eficiencia agronómica. Los resultados permiten concluir consistentemente que la dinámica nutricional de N, P y K no solo cambió en relación a los tratamientos implementados, sino que afectó la dinámica de prácticamente todos los otros nutrientes evaluados, lo que se confirmó al analizar la eficiencia agronómica de los nutrientes aplicados, por cuanto las diferencias en las magnitudes de este parámetro correspondieron a desbalances nutricionales.



Palabras clave adicionales: absorción, extracción, concentración, eficiencia agronómica.

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Yopal-Casanare (Colombia).

² Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

^{*} Autor para correspondencia. jofernandez@unisalle.edu.co





ABSTRACT

The success of the expansion strategies of cocoa production in Colombia due to the new opportunities of the market requires, among others, the production of high quality plants. Although one of the most determinant factors for the quality of plant material in nursery is nutrition, the existing information does not consider genetic and physiological characteristics inherent to plants or nutrient balance from local conditions used for fertilization recommendations in the country. In order to analyze the nutritional dynamics of cocoa plants (IMC67) when submitted to different doses of fertilizers with N, P and K in the nursery stage, three experiments with variable doses of N, P and K from the percentage relation were established, with a reference dose. At 124 days after sowing, the dry biomass and the N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn as well as B content of plants were determined and also parameters of nutritional dynamics, correlation between nutrients and agronomic efficiency. The results allow to conclude consistently that the nutritional dynamics of N, P and K not only changed in relation to the implemented treatments, but also affected the dynamics of almost all other nutrients evaluated, which was confirmed by analyzing the agronomic efficiency of the nutrients applied as the differences in the magnitudes of this parameters corresponded to the nutritional imbalances.

Additional key words: absorption, extraction, concentration, agronomic efficiency.

Fecha de recepción: 31-05-2016 Aprobado para publicación: 24-11-2016



INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) se cultiva en países del trópico ubicados entre los 20° latitud norte y 20° latitud sur (Clough *et al.*, 2009). El precio del cacao ha venido presentado una tendencia al alza en tanto que se espera un crecimiento del consumo de cacao en el mundo (World Cocoa Foundation, 2014), lo que se traduce en nuevas oportunidades para el mercado de cacao para países como Colombia.

Colombia cuenta con alrededor de 165.000 ha sembradas de cacao pero tiene un potencial de 693.669 ha sin restricciones para su siembra (García *et al.*, 2005). Recientemente, el Plan Decenal Cacaotero 2012-2021, proyectó expandir la producción cacaotera con diversas estrategias dentro de las que se cuentan el establecimiento de 150.000 ha nuevas, la renovación de otras 40.000 ha y el incremento en la productividad de 400 a 1.200 kg ha⁻¹ por año (MADR, 2012). Para el éxito de estas estrategias se requiere entre otros, la producción de plantas de alta calidad desde la etapa de vivero para ser utilizadas como patrones en las nuevas plantaciones.

A pesar de que uno de los factores más determinantes para la calidad del material vegetal en vivero es la nutrición (Hartmann *et al.*, 2011), en el país son pocas las publicaciones científicas en torno a la nutrición de

cacao en etapa de vivero. Al igual que otros países, en Colombia los servicios de extensión aún recomiendan el uso de fórmulas únicas que no toman en cuenta las variaciones en el suelo, las condiciones ambientales, ni el balance de nutrientes a partir de las condiciones locales (Snoeck *et al.*, 2016). Más escasos son los reportes científicos que consideran las características genéticas y fisiológicas inherentes a las plantas y que determinan cómo absorben, traslocan o usan los nutrientes, lo cual puede ser un factor limitante, aunque la disponibilidad de nutrientes sea adecuada (Van Vliet *et al.*, 2015).

En este contexto, la producción de material vegetal de propagación de calidad desde el punto de vista nutricional, implica la realización de estudios nutricionales en los patrones más utilizados en Colombia. Recientemente, Santiago *et al.* (2016) describieron el efecto de diferentes tratamientos de fertilización con N, P y K sobre algunos parámetros biométricos indicadores de calidad de material vegetal de un clon ampliamente utilizado en Colombia como patrón (IMC67), sin embargo no se suministraron datos acerca de su dinámica nutricional. Consecuentemente, el objetivo de esta investigación fue analizar la dinámica nutricional de plantas de cacao (IMC67) cuando son sometidas a diferentes dosis de fertilizantes con N, P y K en etapa de vivero.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de cacao (IMC67), procedentes de un jardín clonal ubicado en el municipio de Muzo (Boyacá, Colombia), las cuales fueron sembradas de forma individual en bolsas de 3 kg que contenían un sustrato homogéneo compuesto por suelo y arena en proporción 1:1. Para esto se utilizó un suelo inceptisol proveniente de una capa ubicada en los primeros 0 a 20 cm desde la superficie. De este sustrato homogéneo se tomó una muestra compuesta para análisis fisicoquímico (Tab. 1). El experimento se desarrolló en condiciones de vivero por 124 d. Durante el crecimiento, las plantas estuvieron bajo polisombra a 12 h de luz natural al 60%, a una temperatura promedio de 25°C y a una humedad relativa promedio de 83%. No se presentaron problemas sanitarios importantes, así que su manejo fue estrictamente cultural. La metodología de establecimiento previamente descrita, se basó en experimentos similares de nutrición en cacao (Oyewole *et al.*, 2012; Sodrè *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2015).

Bajo un diseño completamente aleatorizado, se implementaron tres ensayos de fertilización para N, P y K. En cada ensayo se priorizó un nutriente de interés, en el primer ensayo se priorizó el N (ensayo A, N₀-P-K), en el segundo el P (ensayo B, N-P₀-K) y en el tercero el K (ensayo C, N-P-K₀). En los tres ensayos se incluyó una dosis variable del nutriente de interés (0, 50, 100 y 150% de la dosis de referencia) y una dosis fija de los otros dos nutrientes (100% de la dosis de referencia); adicionalmente todos los ensayos tuvieron el mismo control absoluto (sin fertilización, N₀-P₀-K₀) (Tab. 2). Los fertilizantes utilizados y las dosis de referencia fueron: urea, 2,6 g/planta; superfosfato triple (SPT), 1,52 g/planta; cloruro de potasio (KCl), 2,41 g/planta. Estas cantidades se aplicaron teniendo en cuenta las necesidades de nitrógeno (N), fósforo (P₂O₅) y potasio (K₂O) reportadas por Thong y Ng (1978) para plantas de cacao en etapa de vivero. Las dosis respectivas se fraccionaron en dos aplicaciones iguales a los 56 y 64 d después de siembra, para evitar quemazón en las plantas, debido al poco espacio dentro de la bolsa para ubicar el fertilizante.

Cada planta constituyó una unidad experimental y para los análisis se utilizaron 3-6 unidades experimentales por tratamiento. Las plantas se cosecharon 124 días después de la siembra (dds) y se separaron la raíz, el tallo y las hojas. Luego, los órganos se llevaron a 104°C por 48 h para la posterior determinación de su biomasa seca y de contenido nutricional

Tabla 1. Análisis del sustrato utilizado para los ensayos de fertilización.

pH	CD	N	C _{org}	Ca	K	Mg	Na	Al	ClC	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Arcilla	Limo	Arena		Tratara
																		mg/100 g	%	
5,84	0,61	0,08	2,488	0,188	1,733	0,06	0,02	4,43	12,812	0,229	51,933	2,318	1,230	0,444	9,2	16,56	74,24	74,24	Frasco arenoso	

Tabla 2. Estructura de los tratamientos en los tres ensayos.

Ensayo A. Elemento principal: nitrógeno	Ensayo B. Elemento principal: fósforo	Ensayo C. Elemento principal: potasio
Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
N ₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₀ -K ₀
N ₅₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₅₀ -P ₀ -K ₁₀₀	N ₅₀ -P ₀ -K ₁₀₀
N ₁₀₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₁₀₀ -P ₀ -K ₁₀₀	N ₁₀₀ -P ₀ -K ₁₀₀
N ₁₅₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₁₅₀ -P ₀ -K ₁₀₀	N ₁₅₀ -P ₀ -K ₁₀₀
N ₀ -P ₅₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₅₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₅₀ -K ₁₀₀
N ₀ -P ₁₀₀ -K ₅₀	N ₀ -P ₁₀₀ -K ₅₀	N ₀ -P ₁₀₀ -K ₅₀
N ₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	N ₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀



en el Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El N se analizó con el método Kjeldahl, el P por calcinación a 600°C y valoración colorimétrica con molibdato y vanadato de amonio, el B por el método de Azometina (colorimétrico) y el Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn, Zn por calcinación a 600°C, digestión ácida y valoración por absorción atómica. Tanto la biomasa como el contenido nutricional se determinaron de forma separada por órganos en una cantidad de tres a cinco réplicas por tratamiento. No obstante, algunos resultados se presentan relacionando la raíz con la parte aérea debido a que refleja más claramente la dinámica de los nutrientes a nivel de toda la planta.

Los parámetros asociados con la dinámica nutricional se evaluaron, para todos los nutrientes analizados en el laboratorio, de forma separada para los ensayos A, B y C. A continuación, se describe su cálculo y unidades en que se presentan:

Eficiencia en la absorción del nutriente (Wang *et al.*, 2007):

$$\frac{\text{Cantidad de nutriente en la planta (mg)}}{\text{Masa seca de la raíz (g)}} \quad (1)$$

Extracción del nutriente (Ribeiro *et al.*, 2008):

$$\text{Concentración del nutriente (mg g}^{-1}\text{)} \times \text{Masa seca del tejido (g)} \quad (2)$$

Concentración del nutriente (Ribeiro *et al.*, 2008):

$$\frac{\text{Cantidad de nutriente en el tejido (mg)}}{\text{Masa seca (g)}} \quad (3)$$

Eficiencia en el uso del nutriente (Ribeiro *et al.*, 2008):

$$\frac{\text{Masa seca (g)}}{\text{Cantidad de nutriente en la planta (mg)}} \quad (4)$$

Se realizó un análisis de correlación de los parámetros mencionados para N, P y K con respecto a los mismos parámetros para Ca, Mg, K, Cu, Fe, Mn, B y Zn, de forma independiente en los ensayos A, B y C. Por último, se estimó la eficiencia agronómica (EAgr) de las diferentes dosis utilizadas en los ensayos A, B y C para N, P y K en cada ensayo. Esto se realizó a partir de la fórmula sugerida por Ghulam *et al.* (1996) pero

modificando el rendimiento comercial por el rendimiento biológico:

$$EAgr = \frac{Rb(x) - Rb(N_0P_0K_0)}{\text{Cantidad de nutriente aplicado con el fertilizante}} \quad (5)$$

Donde Rb(x) es el rendimiento biológico promedio de las plantas de cada tratamiento y Rb (N₀P₀K₀) es el rendimiento biológico promedio de las plantas que no recibieron fertilización. Para facilitar la comparación, se estandarizaron los valores de EAgr con respecto al mayor valor obtenido en cada ensayo.

El análisis estadístico se realizó inicialmente con un ANOVA y en los casos en que resultaron diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba de comparación de medias con la prueba *t* a un nivel de significancia de 5% utilizando el *software* estadístico JMP® versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica de extracción y uso de N, P y K

Dinámica del nitrógeno

La eficiencia en la absorción de N (EAN), que indica la eficiencia en el transporte del N (Soon, 1992), aumentó en casi un 100% en las plantas que recibieron fertilización nitrogenada con respecto a las plantas que no fueron fertilizadas con este elemento (Tab. 3). Ribeiro *et al.* (2008) encontraron, en clones TSH-565 y ICS-9, que el aumento en la dosis de N incrementó la eficiencia en la absorción de N. La extracción N en las plantas fertilizadas con este elemento también se incrementó de forma significativa (en un 100%) y esto sucedió a nivel de raíces y de la parte aérea (Tab. 3).

La concentración natural de N en el sustrato en el que fueron sembradas las plántulas de cacao (Tab. 1) es cercana al valor utilizado por Snoeck *et al.* (2010) como la concentración de N en suelo mínima adecuada para el cacao (0,06%). La concentración de N en el sustrato equivale a 750 mg/bolsa lo que explica la absorción de N en las plantas sin fertilizar.

La concentración de N en las plantas fertilizadas con este elemento varió tanto por su presencia o ausencia, como por la dosis aplicada. En presencia de la dosis

de referencia de P y K, las plantas fertilizadas, con la dosis de referencia de N, tuvieron una mayor concentración del elemento, que las plantas fertilizadas con la mitad de la dosis, específicamente a nivel de la parte aérea. En contraste, no se presentaron diferencias significativas en la concentración de N entre plantas que recibieron la dosis de referencia y las que recibieron mayor cantidad ($N_{150\%}$) lo cual sugiere que el nivel de 100% N fue suficiente. Las plantas que no recibieron fertilización nitrogenada tuvieron menores concentraciones de N con respecto a las que sí lo recibieron, lo cual, es más evidente en la parte aérea de la planta (Tab. 3).

La eficiencia en el uso del N (EUN) fue mayor en las plantas que no recibieron fertilización nitrogenada (Tab. 3). Independientemente de los tratamientos, la EUN fue superior en la raíz con respecto a la parte aérea lo cual es debido a que este órgano acumula las menores cantidades de nitrógeno que oscilan entre el 10 y 15% del total de N absorbido en comparación con el 15-27% en el tallo y con el 58-75% en las hojas (Fig. 1a). De forma similar a lo obtenido por Ribeiro *et al.* (2008), el aumento de la eficiencia de la absorción de N disminuyó la eficiencia en el uso del N tanto a nivel de raíz como de parte aérea.

A nivel de la parte aérea, las plantas que no recibieron ningún tipo de fertilización crecieron menos que las plantas fertilizadas. No se presentaron diferencias significativas a nivel de la biomasa total entre los tratamientos; sin embargo, la relación entre la concentración foliar de N y la biomasa seca total, describe una curva de tipo cuadrático positivo que muestra una clara separación entre las plantas fertilizadas con N y las que no lo estaban (Fig. 1b). Esto puede obedecer a que las plantas que no fueron fertilizadas con N, tuvieron una concentración foliar ligeramente menor ($17,8 \text{ mg g}^{-1}$) a la establecida por Wessel (1971) (18 mg g^{-1}) como límite inferior de suficiencia para la concentración de N en hojas juveniles de cacao. La curva cuadrática positiva entre concentración foliar de nitrógeno y biomasa en cacao también fue descrita por Souza Júnior y Carmello (2008).

Se estimó que la concentración foliar de N a la que se produce mayor biomasa total es $23,89 \text{ mg g}^{-1}$ de N, la cual se acerca a la obtenida con el tratamiento N_{50} -P-K (Fig. 1). En experimentos previos con plántulas de cacao bajo sombrero artificial, también se ha encontrado que la adición de N estimula el crecimiento de una forma más evidente que en plantas adultas con sombrero natural (Wessel, 1971; Appiah *et al.*, 2000).

Tabla 3. Dinámica nutricional del nitrógeno en el ensayo A.

Tratamiento	EAN (mg g^{-1})		Extracción de N (mg)		Concentración de N (mg g^{-1})		EUN (g mg^{-1})		PS (g)		Relación parte aérea:raíz	
	Flujo	Parte aérea	Flujo	Parte aérea	Flujo	Parte aérea	Flujo	Parte aérea	Flujo	Parte aérea		Total
N_0 -P-K	73,57 b	12,22 b	83,71 b	95,93 b	9,14 bc	14,82 c	0,11 a	0,07 a	1,32 a	5,67 b	6,99 a	4,36 a
N_{50} -P-K	72,40 b	11,00 b	96,61 b	107,61 b	7,20 c	14,05 c	0,14 a	0,07 a	1,54 a	6,87 ab	8,42 a	4,60 a
N_{100} -P-K	144,65 a	20,59 a	169,47 a	190,06 a	15,27 ab	20,81 b	0,07 b	0,05 b	1,30 a	8,18 a	9,51 a	6,23 a
N_{150} -P-K	137,68 a	38,38 a	172,47 a	202,92 a	17,30 a	23,28 a	0,07 b	0,04 b	1,64 a	7,41 ab	9,04 a	5,10 a
N_{100} -P-K	136,37 a	25,28 a	176,41 a	201,69 a	16,45 a	22,17 ab	0,06 b	0,05 b	1,56 a	8,05 a	9,62 a	5,40 a

EAN: eficiencia en la absorción de N; EUN: eficiencia en el uso del N; PS: peso seco. Promedios con las mismas letras, indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$).



Ribeiro *et al.* (2008) estudiaron cinco dosis de N (0, 120, 240, 360, y 480 mg N) que en su forma elemental presentaban una concentración por materia, menor a la implementada en el estudio actual. Así, es razonable que la concentración N₃₀-P-K esté asociada a la mayor producción de biomasa.

La relación parte aérea:raíz no tuvo alteraciones significativas entre los tratamientos relacionados con la fertilización nitrogenada. Esto puede ser consecuencia de que las plantas presentaron EUN alta entre los tratamientos evaluados (Tab. 3).

Fósforo

La eficiencia en la absorción de P (EAP) varió según la fertilización con N y K y según la dosis de fertilizante fosfatado aplicado. En presencia de N y K, la EAP fue significativamente mayor en plantas fertilizadas con la dosis más alta de P (P₁₂₀) con respecto a las dosis P₃₀ y P₀. De otra parte, las plantas que no fueron fertilizadas (N₀-P₀-K₀) tuvieron una EAP similar a la estimada con plantas fertilizadas con P₁₂₀ (Tab. 4).

A nivel de toda la planta, tanto la ausencia de fertilización (N₀-P₀-K₀) como la fertilización con dosis completa y alta de P (N-P₁₀₀-K) (N-P₁₂₀-K), respectivamente, mostraron una extracción similar de P, mientras que la dosis baja (P₃₀) y la ausencia de fertilización fosfatada causaron menor extracción de fósforo cuando las plantas se fertilizaron con N y K. A nivel de la raíz y la parte aérea, esto fue más evidente con respecto a la dosis baja de P.

Las concentraciones foliar de P en los tratamientos N-P₀-K, N-P₃₀-K y N-P₁₀₀-K se encontraron por debajo de los niveles de suficiencia de P para hojas jóvenes establecido por Wessel (1971) (2,0 mg g⁻¹), especialmente las dos primeras dosis.

El tratamiento que no tuvo ningún tipo de fertilización tuvo la mayor concentración, tanto para la raíz, como para el tallo y las hojas (Fig. 2a). El aumento en la extracción y concentración de P en el tratamiento N₀-P₀-K₀ con respecto a los demás tratamientos, pudo deberse a un desbalance entre la relación N/P a nivel del suelo. De forma particular, se encontró que a medida que la relación N/P₂O₅ (disponibles), disminuía, aumentaba la eficiencia en la absorción de P (Tab. 4). Lotodé y Jadin (1981) propusieron que la medida apropiada de esta relación N/P a nivel de suelo sería entre 1,5 y 2 de N/P₂O₅ (totales). Dentro de este rango, pero considerando N y P₂O₅ disponibles

Tabla 4. Dinámica nutricional del fósforo en el ensayo B.

Tratamiento	EAP (mg g ⁻¹)	Extracción de P (mg)		Concentración de P (mg g ⁻¹)		EUP (g mg ⁻¹)		PS (g)		Relación parte aérea:raíz	Relación N/P ₂ O ₅	
		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz			
N ₀ -P ₀ -K ₀	17,92 a	4,47 a	19,00 a	23,46 a	3,40 a	3,36 a	0,29 b	0,31 b	1,32 a	6,99 a	4,36 b	0,68
N ₁₀₀ -P ₀ -K ₁₀₀	8,91 b	2,11 ab	12,03 ab	14,14 b	1,33 b	1,87 b	0,86 a	0,53 ab	1,61 a	6,42 a	4,13 b	14,28
N ₁₀₀ -P ₃₀ -K ₁₀₀	9,57 b	1,69 b	10,48 b	12,18 b	1,25 b	1,77 b	0,80 a	0,65 a	1,36 a	6,11 a	4,68 b	2,85
N ₁₀₀ -P ₁₀₀ -K ₁₀₀	12,14 ab	2,67 a	14,52 ab	17,18 ab	1,88 b	1,93 b	0,71 a	0,43 ab	1,64 a	7,41 a	5,10 ab	1,58
N ₁₀₀ -P ₁₂₀ -K ₁₀₀	18,23 a	1,42 b	14,00 ab	15,42 ab	1,58b	2,22 b	0,67 a	0,43 ab	0,97 a	6,34 a	7,31 a	1,10

EAP: eficiencia en la absorción de P; EUP: eficiencia en el uso del P; PS: peso seco. Promedios con letra distintas, en la misma columna, indican diferencia significativa (P<0,05).

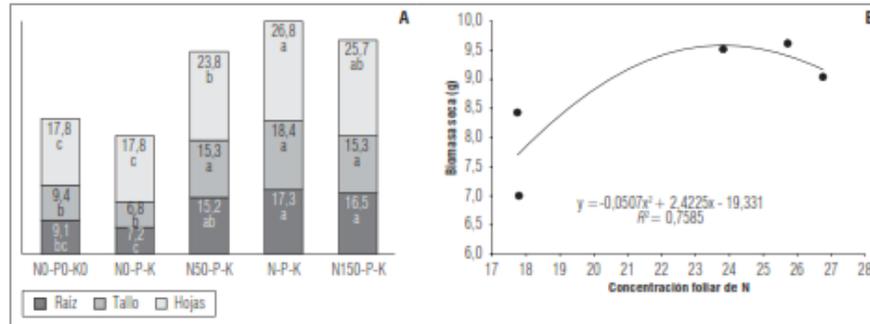


Figura 1. Efecto de la concentración de nitrógeno en la biomasa seca. a) Concentración de nitrógeno en raíz, tallo y hojas de plantas de cacao sometidas a tratamientos del ensayo A. b) Relación de la concentración foliar de nitrógeno con la biomasa seca total.

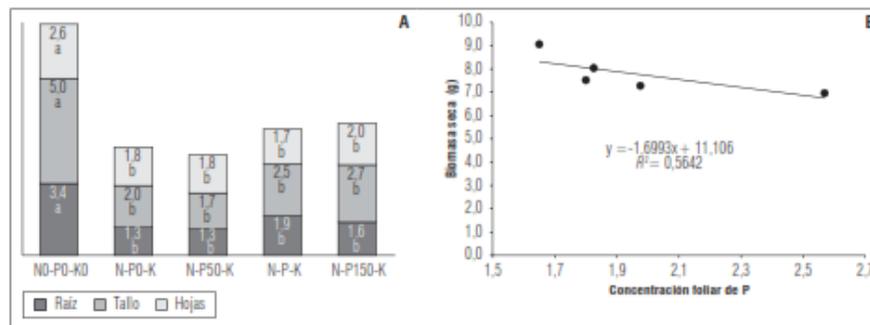


Figura 2. Relación entre concentración de fósforo y su relación con la biomasa seca. a) Concentración de fósforo en raíz, tallo y hojas de plantas de cacao sometidas a tratamientos del ensayo A. b) Relación de la concentración foliar de fósforo con la biomasa seca total.

solo se ubica el tratamiento $N_{100}-P_{100}-K_{100}$. Hidalgo (1989) también realizó esta modificación para P_2O_5 en suelos de Costa Rica.

Las plantas fertilizadas ($N_{100}-P_{100}-K_{100}$) fueron más eficientes en el uso del P que las no fertilizadas ($N_0-P_0-K_0$). De otra parte, no se presentaron diferencias significativas en la producción de biomasa de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. Esto fue debido a que la eficiencia en el uso del P disminuyó cuando su concentración aumentó. Consecuentemente, se observó que la relación entre biomasa total y concentración foliar de P correspondió a una tendencia lineal negativa que indica la relación inversa

entre concentración de P y el crecimiento dentro del rango evaluado (Fig. 2b).

Las plantas que tuvieron la mayor concentración de P ($N_0-P_0-K_0$) y la menor producción de biomasa, también mostraron una relación de concentración foliar N/P significativamente menor ($4,09 \pm 0,46$) a la misma relación en los otros tratamientos ($12,19 \pm 4,69$, datos no mostrados). Fuentes *et al.* (2016) encontraron que los rendimientos de cacao disminuían de manera importante con una relación N/P menor a cinco, mientras que los mayores rendimientos se obtuvieron a una relación de nueve.



Finalmente, las plantas sometidas a la dosis alta de P presentaron una disminución en la biomasa de raíz que modificó significativamente la relación parte aérea:raíz (Tab. 4), lo que podría confirmar la relación inversa descrita previamente.

Potasio

La eficiencia de la absorción de K (EAK) no cambió significativamente en los tratamientos del ensayo C. A nivel de toda la planta y de la raíz principalmente en las que fueron fertilizadas con N y P ($N_{100}-P_{100}-K_0$), la extracción de K fue mayor en la dosis K_{100} , que en las no fertilizadas con este elemento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas a nivel de la parte aérea a pesar que es allí en donde hay mayor acumulación de K (Tab. 5). El contenido natural de K en el sustrato utilizado correspondió a 225 mg, lo que explica la extracción de K en los tratamientos con K_0 .

A excepción de las plantas sin fertilizar ($N_0-P_0-K_0$), la concentración de K aumentó con la dosis creciente de fertilizante potásico. La mayor concentración de potasio en tejidos se presentó cuando las plantas fueron fertilizadas con la dosis alta de K (K_{100}), especialmente a nivel del tallo y la menor en plantas sin fertilización potásica, pero fertilizadas con N y P ($N_{100}-P_{100}-K_0$) especialmente a nivel de tallo y raíz (Fig. 3a). En cacao, los altos niveles de N podrían afectar la absorción de K (Puentes *et al.*, 2016).

Las plantas sin fertilizar ($N_0-P_0-K_0$) presentaron una concentración mayor de K que las plantas fertilizadas con $N_{100}-P_{100}-K_0$, pero similar a las de los demás tratamientos. Esto correspondió a una inadecuada relación entre las bases totales intercambiables (BTI) y el N. Snoeck *et al.* (2016) reportaron que la relación óptima entre las BTI y el N obedece a una línea de regresión $BTI = 8,9 * N(\%) - 6,15$. La BTI calculada con la concentración de N (0,8%) es de 0,97, lo que indica que el tratamiento sin fertilizar presentaba una deficiencia de N a expensas de las bases intercambiables, incluido el K (datos no mostrados); situación que se corrigió con la aplicación de N en los demás tratamientos.

El tratamiento sin fertilización nitrogenada, mostró una relación de concentración foliar N/K significativamente menor ($0,7 \pm 0,17$) a la misma relación en los otros tratamientos ($1,13 \pm 0,15$, datos no mostrados) y que se acerca a la sugerida por Puentes *et al.* (2016) para cacao. Sin embargo, no se observó una relación clara entre la magnitud de esta relación y los resultados de biomasa.

Tabla 5. Dinámica nutricional del potasio en el ensayo C.

Tratamiento	EAK (mg g ⁻¹)		Extracción de K (mg)			Concentración de K (mg g ⁻¹)			EUK (g mg ⁻¹)			PS (g)		Relación parte aérea:raíz
	raíz	parte aérea	raíz	parte aérea	Total	raíz	parte aérea	Total	raíz	parte aérea	Total	raíz	parte aérea	
$N_0-P_0-K_0$	17,20 ab	120,18 a	13,00 c	21,47 ab	19,84 b	0,08 b	0,05 bc	0,05 b	1,32 a	5,67 ab	6,99 ab	4,36 a	6,99 ab	4,36 a
$N_{100}-P_{100}-K_0$	11,44 b	102,42 a	10,47 c	16,30 c	15,43 c	0,10 a	0,06 a	0,07 a	1,10 a	6,29 ab	7,39 ab	5,70 a	7,39 ab	5,70 a
$N_{100}-P_{100}-K_{100}$	19,91 ab	157,13 a	13,27 bc	18,66 bc	18,04 bc	0,08 b	0,05 b	0,06 b	1,48 a	8,35 a	9,83 a	5,72 a	9,83 a	5,72 a
$N_{100}-P_{100}-K_{100}$	25,92 a	152,68 a	15,98 ab	20,74 b	19,93 b	0,06 b	0,05 b	0,05 bc	1,64 a	7,41 ab	9,04 ab	5,10 a	9,04 ab	5,10 a
$N_{100}-P_{100}-K_{100}$	17,36 ab	136,30 a	16,18 a	24,44 a	23,05 a	0,06 b	0,04 c	0,04 c	1,06 a	5,68 b	6,75 b	5,55 a	6,75 b	5,55 a

EAK: eficiencia en la absorción de K; EUK: eficiencia en el uso del K; PS: peso seco. Promedios con letras distintas, en la misma columna, indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

La eficiencia en el uso de K (EUK) fue menor en la dosis alta de K que en las otras dosis, especialmente en la parte aérea. Por su parte, la mayor EUK se presentó en N-P-K₀. La EUK de las plantas sin fertilizar (N₀-P₀-K₀), fue similar a la de plantas fertilizadas con K en presencia de N y P. Esto obedece básicamente a la disminución de la EUK al incrementar la concentración del K.

El peso seco de las plantas fertilizadas con dosis K₉₀ fue mayor que en los demás tratamientos. Se determinó una función cúbica a partir de la relación de la concentración foliar de K y la biomasa seca total (Fig. 3b). Según esta función, la concentración foliar de K que corresponde al mayor valor de biomasa es 19,0 mg g⁻¹, que es muy cercana a la determinada en el tratamiento (N-P-K₉₀). Según Snoeck *et al.* (2007), los porcentajes de K, Ca y Mg deben ser 8, 68 y 24%, respectivamente. En el sustrato utilizado el K tiene el 4,3% de las bases intercambiables en tanto que con K₉₀ sube a 14,2%, lo que por una parte, explica la mejor absorción de K y, por otra, abre la posibilidad de un efecto negativo por encima de esa dosis, coherente con la función cúbica descrita en la figura 3b. Previamente han sido reportados los efectos negativos del potasio en exceso sobre el crecimiento de plantas de cacao en etapa de vivero (Frederick, 1961; Sodré *et al.*, 2012).

De otra parte, la variación en la fertilización no tuvo efecto sobre la relación parte aérea:raíz en las plantas de cacao lo que obedece al aumento en la EUK de las plantas que tenían una menor concentración de K. Es

probable que los requerimientos por K no sean altos para este clon en etapa de vivero. Ahenkorah *et al.* (1987) sugirieron que los requerimientos de K en el cacao tienden a incrementarse con la edad y en especial, bajo condiciones de poco sombrero.

Correlación de N, P y K con otros nutrientes

En general, el N se correlacionó negativamente con P, Mg, Cu, Zn y B (concentración y eficiencia en el uso del nutriente) y positivamente con K y Fe (eficiencia en su absorción y extracción), y con Ca y Mn (eficiencia en su absorción, extracción, concentración y eficiencia en el uso) (Tab. 6).

Los patrones de correlación negativa y positiva de N con los otros nutrientes son similares a los obtenidos por Souza y de Camargo (2008) en plantas de cacao en etapa de vivero, a excepción del K. Estos autores atribuyen a un efecto de dilución de los nutrientes correlacionados negativamente lo cual es posible que haya sucedido en este estudio por cuanto se presentaron a nivel de concentración y eficiencia en el uso del nutriente, pero no a nivel de absorción. Sin embargo, solo se lograron detectar correlaciones negativas significativas entre biomasa total y la concentración total de Zn (-0,65_{p=0,002}) y B (-0,46_{p=0,001}).

Las correlaciones de N con Mg y Zn fueron positivas en cuanto a la eficiencia en la absorción y en la extracción, pero fueron negativas en la concentración y en la eficiencia en el uso del nutriente, principalmente

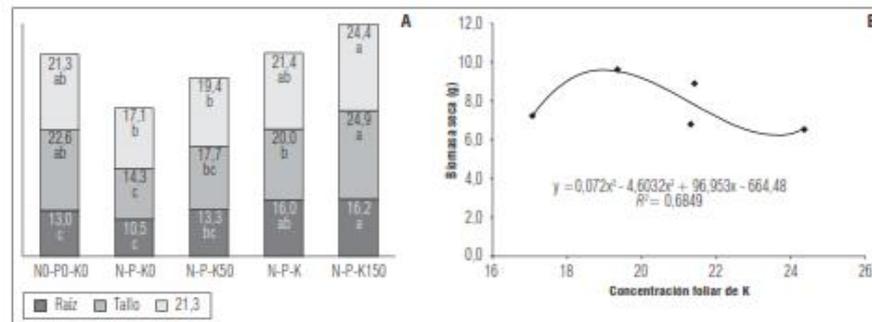


Figura 3. Relación entre concentración de potasio y su relación con la biomasa seca. a) Concentración de potasio en raíz, tallo y hojas de plantas de cacao sometidas a tratamientos del ensayo A. b) Relación de la concentración foliar de potasio con la biomasa seca total.



Tabla 6. Correlaciones entre eficiencia de absorción, absorción, concentración y eficiencia en el uso de N, P y K con relación a los mismos parámetros en Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn y B.

ENSAYO	PARÁMETRO	Dinámica del nutriente									
		N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	B
(A) $N_{50}P_{20}K_{30}$ + $N_{100}P_{100}K_{100}$	EAN	1,00	0,03	0,72	0,94	0,39	-0,13	0,62	0,78	0,48	0,33
	EAP		1,00	0,60	0,26	0,69	0,63	0,55	-0,13	0,61	0,40
	EAK			1,00	0,85	0,75	0,25	0,74	0,49	0,76	0,57
	Absorción de N	1,00	-0,43	0,55	0,88	0,26	-0,04	0,56	0,78	0,09	-0,07
	Absorción de P		1,00	0,31	-0,11	0,49	0,63	0,15	-0,40	0,23	-0,18
	Absorción de K			1,00	0,78	0,71	0,34	0,52	0,45	0,42	-0,06
	Concentración de N	1,00	-0,79	-0,28	0,75	-0,61	-0,73	0,09	0,73	-0,37	-0,14
	Concentración de P		1,00	0,45	-0,53	0,64	0,68	0,24	-0,59	0,52	0,23
	Concentración de K			1,00	0,09	0,37	0,02	0,12	0,01	0,49	0,33
	EUN	1,00	-0,74	-0,29	0,73	-0,61	-0,67	0,26	0,69	-0,31	-0,14
	EUP		1,00	0,43	-0,46	0,65	0,55	0,06	-0,67	0,33	0,04
EUK			1,00	0,08	0,42	0,01	0,09	-0,03	0,31	0,19	
(B) $N_{50}P_{20}K_{30}$ + $N_{100}P_{100}K_{100}$	EAN	1,00	0,47	0,90	0,90	0,61	0,02	0,68	0,81	0,79	0,56
	EAP		1,00	0,69	0,66	0,85	0,67	0,55	0,35	0,84	0,62
	EAK			1,00	0,94	0,76	0,18	0,70	0,78	0,91	0,64
	Absorción de N	1,00	0,20	0,84	0,89	0,55	0,42	0,77	0,80	0,67	0,14
	Absorción de P		1,00	0,44	0,36	0,73	0,72	0,43	0,01	0,64	0,09
	Absorción de K			1,00	0,92	0,75	0,58	0,74	0,64	0,81	0,21
	Concentración de N	1,00	-0,53	0,13	0,57	-0,41	-0,58	0,20	0,65	-0,05	-0,05
	Concentración de P		1,00	0,04	-0,33	0,66	0,55	-0,06	-0,51	0,58	0,26
	Concentración de K			1,00	0,26	0,08	-0,33	-0,15	0,24	0,40	0,27
	EUN	1,00	-0,43	0,06	0,62	-0,34	-0,58	0,13	0,86	-0,11	0,00
	EUP		1,00	0,08	-0,31	0,40	0,32	-0,05	-0,50	0,58	0,04
EUK			1,00	0,29	-0,06	-0,41	0,05	0,06	0,41	0,12	
(C) $N_{50}P_{20}K_{30}$ + $N_{100}P_{100}K_{100}$	EAN	1,00	0,32	0,69	0,89	0,52	0,01	0,68	0,86	0,63	0,13
	EAP		1,00	0,79	0,47	0,73	0,65	0,64	0,19	0,74	0,21
	EAK			1,00	0,71	0,62	0,31	0,87	0,63	0,80	0,40
	Absorción de N	1,00	0,18	0,77	0,90	0,61	0,42	0,64	0,81	0,62	0,06
	Absorción de P		1,00	0,65	0,26	0,63	0,73	0,37	-0,09	0,53	-0,05
	Absorción de K			1,00	0,71	0,72	0,69	0,70	0,53	0,73	0,19
	Concentración de N	1,00	-0,73	-0,06	0,61	-0,73	-0,60	0,23	0,80	-0,60	-0,32
	Concentración de P		1,00	0,43	-0,59	0,52	0,62	0,03	-0,59	0,39	0,12
	Concentración de K			1,00	-0,31	-0,12	0,06	0,56	0,09	0,13	0,42
	EUN	1,00	-0,62	-0,07	0,61	-0,75	-0,54	0,34	0,94	-0,55	-0,26
	EUP		1,00	0,49	-0,57	0,36	0,45	0,03	-0,57	0,17	-0,08
EUK			1,00	-0,31	-0,23	0,08	0,43	-0,02	0,01	0,17	

en el ensayo C. Esto se debe a que las dosis de K_{150} parecieron limitar la absorción tanto de N como de Mg y Zn (datos no mostrados), en tanto que a K_{30} y K_{100} la absorción de N, Mg y Zn aumentaron, indicando así que las altas concentraciones de K podrían deprimir la absorción de otros nutrientes (Fageria, 2001). En cacao este fenómeno había sido reportado para Mg, Ca y Fe (Frederick, 1961; Sodr  et al., 2012). No obstante, la correlación de N con respecto a Mg y Zn fue primordialmente negativa debido a efecto de dilución causado en los tratamientos con fertilización nitrogenada.

Además del efecto de dilución y de forma similar al desbalance entre N y P descrito anteriormente, en el sustrato, el porcentaje de Mg (39,3%) con respecto a las otras bases intercambiables (K y Ca), fue superior a la sugerida por Snoeck et al. (2007) (24%), así que, cuando hubo fertilización con N la absorpci n de Mg disminuyó y las de K y Ca, aumentaron; por el contrario, cuando no hubo fertilización con N, la absorpci n de Mg aumentó.

La correlación positiva observada entre N y K, a diferencia de lo reportado por Souza y Carmello (2008), no correspondió a un efecto de dilución porque aun con la menor dosis de K (K_{30}), se suministró la cantidad suficiente de este elemento en el sustrato. Esto mismo pudo suceder con Ca, Fe y Mn resultando en una interacción positiva. Sumado a esto, la interacción positiva de estos nutrientes con el N en cuanto a la absorpci n sugiere una sinergia a nivel de su transporte a larga distancia. Por una parte, tanto el K como el Ca se han asociado con el transporte de $N-NO_3$ por el xilema (Mengel y Kirkby, 2001) y por otra parte, Ca, Fe y Mn pueden ser transportados en el xilema como cationes acompañantes de ácidos orgánicos (Marschner, 2012), cuya producción puede ser mayor en plantas fertilizadas con N dado su efecto positivo sobre la fotosíntesis.

En conjunto, estos resultados obedecen a que el incremento en el suministro de N, aumenta el crecimiento de las plantas, incrementando la demanda por otros nutrientes y en algunos casos causando posibles deficiencias (Fageria, 2001).

El P solamente se correlacionó negativamente con Ca y Mn, lo que puede obedecer a un efecto indirecto dada la estrecha correlación positiva entre estos dos nutrientes y el N, y la correlación negativa entre N y P por las razones expuestas previamente (Tab. 6). Finalmente, el K se correlacionó positivamente con

todos los nutrientes evaluados en este estudio, especialmente a nivel de la eficiencia en la absorpci n y en la extracción. Sodr  et al. (2012) encontraron que la aplicación de K aumentó la concentración de Ca, Mg, Zn y Mn disponibles en el sustrato, en tanto que la disponibilidad de Cu y Zn no se alteraron y las de Al y Fe disminuyeron. Las diferencias radican en que Sodr  et al. (2012) utilizaron un sustrato con mayor cantidad de materia orgánica lo que facilitó la complejización de los cationes con ácidos orgánicos. En el presente estudio, la cantidad de materia orgánica fue baja (1,05%) lo cual explica la mayor disponibilidad de cationes.

Eficiencia agronómica

En el ensayo A, la eficiencia agronómica del N fue mayor en N_{30} -P-K, así por cada gramo de N aplicado, se obtuvo un incremento de 4,22 g en la biomasa seca, en tanto que la eficiencia agronómica del P y del K fueron más alta en N_{150} -P-K (8,53 g g^{-1} y 2,19 g g^{-1} , respectivamente). Sin embargo, en N_{30} -P-K esta eficiencia solo se disminuyó un 4% (8,19 g g^{-1} y 2,11 g g^{-1} , respectivamente) (Fig. 4a). Dado que la dosis N_{150} -P-K requiere tres veces más cantidad de N que la dosis N_{30} -P-K, se sugiere que la dosis más apropiada de N es N_{30} -P-K.

En el ensayo B, la eficiencia agronómica de los tres elementos aplicados fue mayor en la dosis N-P-K. Así, N tuvo una eficiencia de 1,72 g g^{-1} , P de 6,68 g g^{-1} y K de 1,72 g g^{-1} (Fig. 4b). En el ensayo C, la eficiencia agronómica de los tres elementos aplicados fue mayor en la dosis N-P-K, así N tuvo una eficiencia de 2,37 g g^{-1} , P de 9,23 g g^{-1} y K de 4,75 g g^{-1} (Fig. 4c).

Los resultados de la EAgr en los tres ensayos siguen un patrón que es coherente con la dinámica nutricional descrita a lo largo de este documento. Consecuentemente, diferencias en las magnitudes probablemente corresponden a desbalances nutricionales. Puentes et al. (2014b) encontraron notorias diferencias en varios tratamientos de fertilización de cacao en campo y lo explicaron a partir de desbalances nutricionales del cultivo asociados a cambios en la composición de la solución del suelo.

En las dosis superiores a N_{30} y especialmente a N_{150} se presentaron efectos de dilución de otros nutrientes y de consumo de lujo en tanto que en las dosis superiores a K_{30} se presentaron desbalances con respecto al TBI (en K_{150}), lo que explicaría porque N_{50} y K_{50}



tuvieran la mayor EAgr. De hecho, Wessel (1971) encontró, a partir de una revisión de investigaciones desarrolladas en Ghana, que las plantas jóvenes de cacao son sensibles al N y al K.

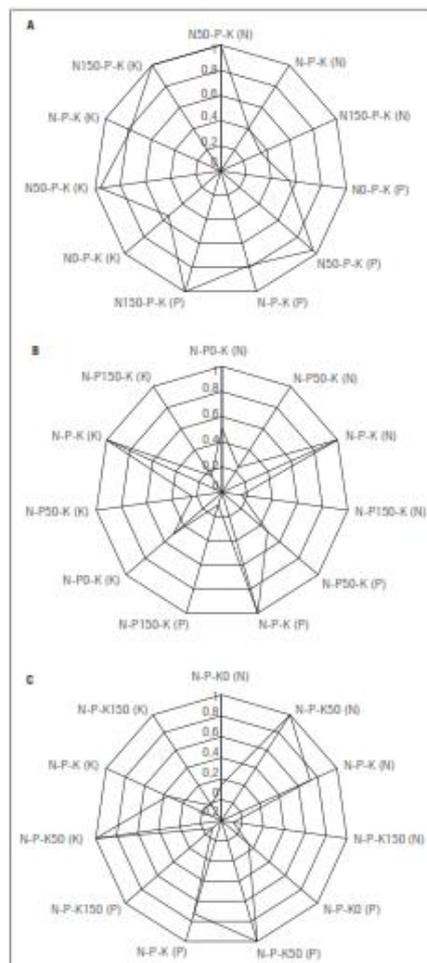


Figura 4. EAgr de las diferentes dosis utilizadas en los ensayos A, B y C para N, P y K en cada ensayo. Se estandarizaron los valores de EAgr con respecto al mayor valor obtenido en cada ensayo.

La mayor EAgr del P se obtuvo en el 100% de la dosis debido a que, cuanto estaba en presencia de N_{100} y K_{100} , parece haberse obtenido un balance apropiado en la solución del suelo que permitió, no solo una alta extracción de P, sino también una alta eficiencia en su uso, a diferencia del tratamiento $N_0-P_0-K_0$.

Tomado en conjunto, los resultados con los tres grupos de tratamientos evaluados sugieren que los futuros estudios en nutrición de plantas de cacao en vivero bajo las condiciones evaluadas, deberían incluir el estudio de relaciones entre los nutrientes a nivel del suelo y de la planta utilizando dosis de Urea (1,3 g/planta), SPT (1,52 g/planta) y KCl (1,205 g/planta). Esto sería un avance importante para la obtención de material vegetal de cacao de alta calidad desde el punto de vista nutricional.

CONCLUSIONES

La dinámica nutricional de N, P y K cambió en relación a los tratamientos implementados. Así, la dinámica del N en cacao se relacionó con su concentración en el sustrato y mostró un valor crítico en términos de tejido foliar ($23,89 \text{ mg g}^{-1}$) por encima del cual el consumo no fue eficiente. La dinámica del P en cacao se modificó con la relación N/P_2O_5 (disponibles) en el suelo que fue más favorable en un valor de 1,58. La dinámica del K en cacao se modificó con la relación entre las BTI y entre estas y el N en el suelo.

La dinámica nutricional del N, P y K afectó la dinámica prácticamente de todos los otros nutrientes evaluados, principalmente debido a los desbalances a nivel del sustrato y al efecto de dilución cuando aumenta el tamaño de las plantas al ser fertilizadas con N. Por último, es importante resaltar que la dinámica e interacciones entre los nutrientes fueron consistentes en los tres ensayos evaluados y que la eficiencia agronómica de todos los tratamientos de fertilización implementados es coherente con la dinámica de los nutrientes analizados.

La importancia de estos resultados radica en que se contribuye al entendimiento del manejo de los balances nutricionales más que de las dosis de fertilizantes para la obtención de material vegetal de calidad para trasplante en cultivo de cacao en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias por la financiación de esta investigación a través

del proyecto "Análisis de tecnologías novedosas para el cultivo del cacao en el departamento de Casanare-Colombia" código 1101-569-33833.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agronet. 2014. Estadísticas cacao Colombia. En: <http://www.agronet.gov.co>; consulta: febrero de 2015.
- Ahenkorah, Y., B. Halm, M. Appiah, G. Akrofi y J. Yirenkyi. 1987. Twenty years' results from a shade and fertilizer trial on Amazon cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. *Exp. Agric.* 23, 31-39.
- Appiah, M., K. Ofori-Frimpong y A. Afrifa. 2000. Evaluation of fertilizer application on some peasant cocoa farms in Ghana. *Ghana J. Agric. Sci.* 33, 183-190.
- Clough, Y., H. Faust y T. Tschardt. 2009. Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conserv. Lett.* 2(5), 197-205. Doi: 10.1111/j.1755-265X.2009.00072.x
- Fageria, V. D. 2001. Nutrient Interactions in crop plants. *J. Plant Nutr.* 24(8), 1269-1290. Doi: 10.1081/FLN-100106981
- Frederick, H. 1961. Manual de cacao. Antonio Lehmann, Turrialba, Costa Rica.
- García L., J., M. Romero C. y L.A. Ortiz. 2005. Evaluación edafoclimática de las tierras del trópico bajo colombiano para el cultivo de cacao. Corpoica, Produmedios, Mosquera, Colombia.
- Ghulam, H., A. Karimulla y S. Al-Jaloud. 1996. Effect of treat de fluent irrigation and nitrogen on yield and nitrogen use efficiency of wheat. *Agric. Water Manage.* 30, 175-184.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies y R.L. Geneve. 2011. Plant propagation: principles and practices. 6th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Hidalgo, E. 1989. Propiedades fisicoquímicas de los suelos y respuestas a la fertilización en microparcelas en áreas para cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Lotodé, R. y P. Jadin. 1981. Calcul des besoins en engrais des cacaoyers. *Café Cacao Thé.* 23(1), 4-24.
- MADR. 2012. Plan de Desarrollo Cacaotero 2012-2021. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá.
- Marschner, F. (ed.). 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Mengel, K., E. Kirkby, H. Kosegarten y T. Appel (eds.). 2001. Principles of plant nutrition. 5th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Oliveira, R., J. Olimpio, G. Sodr e y B. Chanabasappa. 2015. Growth and nutrition of cacao seedlings influenced by zinc application in soil. *Rev. Bras. Frutic.* 37(4), 1055-1064.
- Oyewole, O.S., O.J. Ajayi e I. Rotimi. 2012. Growth of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings on old cocoa soils amended with organic and inorganic fertilizers. *Afr. J. Agric. Res.* 7(24), 3604-3608. Doi: 10.5897/AJAR11.2045
- Puentes P., Y.J., A.G. Carabali y J.C. Menjivar F. 2016. Influence of the relationship among nutrients on yield of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. *Acta Agron.* 65(2), 176-182.
- Ribeiro, M.C., J. O. da Silva, W.M. Aitken, R.C.R. Machado y V.C. Baligar. 2008. nitrogen use efficiency in cacao genotypes. *J. Plant Nutr.* 31(2), 239-249. Doi: 10.1080/01904160701835720
- Santiago, M.A., I.R. Canacuan, J.J. Franco, W. Bohórquez y J.C. Fernández. 2016. Determinación de los estados críticos de nutrientes de cacao en etapa de vivero. pp. 191-204. En: *Construyendo investigación: semilleros generadores de ideas*. Ediciones Unisalle, Bogotá.
- Snoeck, D., M.K. Abekoe, A.A. Afrifa y M.R. Appiah. 2007. The Soil diagnostic method to compute fertilizer requirements in cocoa plantations. pp. 7-11. En: *Proc. 15th International Cocoa Research Conference*, Lagos.
- Snoeck, D., A. A. Afrifa, E. Boateng y M. K. Abekoe. 2010. Mapping Fertilizer Recommendations for Cocoa Production in Ghana Using Soil Diagnostic and GIS Tools. *West Afr. J. Appl. Ecol.* 17, 97-107.
- Snoeck, D., L. Koko, J. Joffre, F. Bastide y E. Jagoret. 2016. Cacao nutrition and fertilization. pp. 155-202. En: *Lichtfouse, E. (ed.). Sustainable Agriculture Reviews 19*, Springer International Publishing, Suiza.
- Sodr e, G.A., M.T. Venturini, D. Ribeiro y C. Lima. 2012. Extrato da casca do fruto do cacau como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacau. *Rev. Bras. Frutic.* 34(3), 881-887.
- Soon, Y. 1992. Differential response of wheat genotypes to phosphorus in acid soils. *J. Plant Nutr.* 15, 515-526.
- Souza, J.O. y Q.A. de Camargo. 2008. Formas de adubação e doses de uréia para mudas clonais de cacau cultivadas em substrato. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 32, 2367-2374. Doi: 10.1590/S0100-06832008000600015
- Souza, J.O. y Q.A. de C. Carmello. 2008. Formas de adubação e doses de uréia para mudas clonais de cacau cultivadas em substrato. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 32(6), 2367-2374.
- Thong, K.C. y W.L. Ng. 1978. Growth and nutrient composition of monocrop cocoa plants on inland Malaysian soils. pp. 262-286. *Proc. Int. Conf. Cocoa coconuts*, Kuala Lumpur 1978.



- Van Vliet, J., M. Slingerland y K.E. Giller. 2015. Mineral nutrition of cocoa : a review. Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.
- Wang, E.Y., X.G. Lin y R. Yin. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiol.* 51(2), 99-109. Doi: 10.1016/j.pedobi.2007.02.005
- Wessel, M. 1971. Fertilizer requirements of cacao (*Theobroma Cacao* L.) in South-Western Nigeria. Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, The Netherlands.
- World Cocoa Foundation. 2014. Cocoa market update. 1-7 p. En: <http://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-4-1-2014.pdf>; consulta: febrero de 2016.

B. ANEXO: Artículo científico de revisión realizado en el marco de esta investigación.

Fernández-Lizarazo, J. C., and L. P. Moreno-Fonseca. 2016. Mechanisms for tolerance to water-deficit stress in plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Colomb.* 34(2):179 Available online at: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/55569>.

Mechanisms for tolerance to water-deficit stress in plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. A review

Mecanismos de tolerancia al estrés por déficit hídrico en plantas inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. Una revisión

John Crithian Fernández-Lizarazo¹ and Liz Patricia Moreno-Fonseca²

ABSTRACT

The expansion of areas affected by drought worldwide has a negative effect on yield and crops production, making water deficits the most significant abiotic stress that limits the growth and development of plants. The use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a strategy that mitigates the effects of this stress in a sustainable way, given the increase in the tolerance to water deficit stress in plants inoculated with these fungi; however, the exact mechanism is unknown because the response depends on the water-deficit stress type and is specific to the AMF and the plant. This review describes the mechanisms that explain how the AMF colonization of roots can modify the response of plants during a water deficit, as well as its relationship with physiological processes that determine yield, photosynthesis and photoassimilate partitioning. These mechanisms may include modifications in the content of plant hormones, such as strigolactones, jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA). The JA appears to be involved in the stress signal in mycorrhizal plants through an increase of ABA concentrations and, at the same time, ABA has a regulating effect on strigolactone concentrations. Also, there is improvement of plant water status, stomatal conductance, nutritional status and plant responses to cope with a water deficit, such as osmotic adjustment, and antioxidant activity. These modifications cause an increase in CO₂ assimilation and photoassimilate production, improving plant growth during a drought.

Key words: micorrizas, hormonal control, stomatal conductance, nutritional status, antioxidants, photosynthesis.

RESUMEN

La extensión de áreas afectadas por la sequía en todo el mundo tiene un efecto negativo en la producción y rendimiento de los cultivos, haciendo que el déficit hídrico sea el estrés abiótico más limitante del crecimiento y desarrollo de las plantas. El uso de hongos micorrízicos arbusculares (HFMA) es una estrategia que mitiga los efectos de este estrés de una manera sostenible, numerosos estudios han demostrado un aumento en la tolerancia a déficit hídrico en plantas inoculadas con estos hongos. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual los HFMA inducen esta tolerancia ya que se ha encontrado que la respuesta depende del tipo de estrés hídrico y además es específica, tanto a nivel del HFMA como de la planta. Esta revisión describe los mecanismos potenciales que explican cómo la colonización de las raíces por HFMA puede modificar el comportamiento de la planta durante el estrés por déficit hídrico, así como su relación con procesos fisiológicos determinantes de la producción como la fotosíntesis y la partición de fotoasimilados. Estos mecanismos incluyen modificaciones en las plantas en el contenido de hormonas como las estrictolactonas, el ácido jasmónico (JA) y el ácido abscísico. The JA parece estar involucrado en las señales de estrés en las plantas micorrizadas incrementando la concentración del ácido abscísico (ABA) y, a su vez el ABA regula el efecto de las estrictolactonas. Igualmente hay una mejora del estado hídrico de la planta, la conductancia estomática, el estado nutricional y un aumento de la respuesta de la planta para contender con el déficit hídrico como el ajuste osmótico y la actividad antioxidante. Estas modificaciones causan un aumento en la asimilación de CO₂ y la producción de fotoasimilados mejorando el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía.

Palabras clave: micorriza, control hormonal, conductancia estomática, estado nutricional, antioxidantes, fotosíntesis.

Introduction

Currently, the scarcity of water is a problem seen around the world and it is expected that climate change will accelerate the severity of droughts (Kahil *et al.*, 2015).

Under this scenario, the agricultural use of water is limited, resulting in an increase in areas affected by water deficits, causing significant losses in crops and reducing average yields by more than 50% (Wang *et al.*, 2003). For these reasons, water-deficit stress is the most important

Received for publication: 2 February, 2016. Accepted for publication: 30 June, 2016.

Doi: 10.15446/agron.colomb.v34n2.55569

¹ Program of Agricultural Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad de La Salle, Yopal (Colombia). jofernandez@unisalle.edu.co

² Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).



abiotic stress that limits plants growth and development (Yang *et al.*, 2008).

One of the main effects of water-deficit stress on plant development is related to a restriction in water uptake and, therefore, in the nutrient uptake (Sardans *et al.*, 2007). This restriction results from the decrease in transpiration rate and alteration in the active transport and permeability of membranes (Sardans *et al.*, 2007), which affect the biochemical and physiological processes as well as the metabolism of nutrients and plant growth regulators, photosynthesis, respiration, and translocation of photoassimilates, reducing plant growth (Jaleel *et al.*, 2008).

Since crops production and, therefore, food security depend on the management of limiting factors, it is necessary to develop efficient strategies that allow for the improvement of crop yield under water-deficit stress (FAO, 2012). Recently, it has been observed that the symbiotic interaction of plants with AMF, in addition to being important from the agricultural and ecological point of view (Yang *et al.*, 2008), could be a sustainable mitigation practice for water-deficit stress (Aroca, 2012).

AMF are obligate symbiotic fungi that need host plants in order to complete their life cycles (Schüßler *et al.*, 2001) and colonize approximately 90% of plant species in the world and the majority of cultivatable species (Bonfante and Genre, 2010). This interaction is mainly based on the exchange of carbon from the host plant and nutrients from the fungi to the host plant in a symbiotic system (Atul-Nayyar *et al.*, 2009). Additionally, AMF allow host plants to grow more efficiently under biotic and abiotic stress conditions (Gholamhoseini *et al.*, 2013). It has been reported that the AMF effect increases with the intensity of water deficit (Miransari *et al.*, 2008); however, the effect is not predictable and the magnitude and type of response depend on the AMF and plant species and on the degree of the prevailing water-deficit stress (Zhongqun *et al.*, 2007) (Tab. 1).

It has been reported that the response of the plant-AMF symbiosis to a water deficit results from the combination of nutritional, physical, and cellular effects that mitigate this water deficit (Augé, 2001). The mechanisms that explain how AMF can affect the response of host plants coping with water deficit stress include, 1) modification of hormonal balance (Estrada-Luna and Davies, 2003), 2) improvement of plant water status by increasing hydraulic conductivity through an increase of water absorption by the external hyphae (Augé *et al.*, 2007), 3) osmotic adjustment

(Porcel and Ruiz-Lozano, 2004), 4) increase in antioxidant activity (Goicoechea *et al.*, 2005) and 5) higher nutrients absorption (Al-Karaki, 2006). This paper describes these potential tolerance mechanisms for water-deficit stress in mycorrhizal plants and the relationship with the physiological process that determines the yield, photosynthesis and photoassimilate partitioning.

Modification of hormonal balances

AMF produce changes in isoprenoids content in leaves of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), favoring the production of essential instead of nonessential isoprenoids, especially in water stress conditions or after JA applications (Asensio *et al.*, 2012) (Tab. 1). The increasing production of essential isoprenoids has been associated with the increasing demand and biosynthesis of compounds derived from carotenoids such as ABA and strigolactones in mycorrhizal plants under water-deficit stress conditions (Asensio *et al.*, 2012). The literature mostly includes ABA, strigolactones, and JA as the plant hormones related to the mycorrhizal interaction in water deficit conditions (Ludwig-Müller, 2010).

Abscisic acid and strigolactones. Contrasting effects have been observed for ABA concentrations in mycorrhizal plants in water deficit conditions, which reflects the complexity of interactions. In some plants, the beneficial effect of symbiosis with AMF in stress conditions has been attributed to increases of transpiration and water absorption by roots (Augé, 2001) and it is associated with lower concentrations of ABA (Aroca *et al.*, 2013); however, in plants such as tomato, a water stress significantly increases the ABA content, with or without of mycorrhizal colonization (Asensio *et al.*, 2012). These changes in hormonal levels can be highly dependent on AMF genotype (Ludwig-Müller, 2010); it has been determined that, in water-deficit stress conditions, the symbiosis with AMF regulates the ABA content (Estrada-Luna and Davies, 2003). ABA can be indispensable for sustaining AMF colonization, particularly in unfavorable conditions for plants, such as water-deficit stress (Ludwig-Müller, 2010). In fact, in tomato, ABA increases the susceptibility of plants to AMF colonization and appears to play an important role in the development and functionality of arbuscules (Herrera-Medina *et al.*, 2007).

A significant correlation has been reported between ABA production and strigolactones (Aroca *et al.*, 2013). Strigolactones correspond to a new class of plant hormones that regulate the architecture and reproductive development of plants (Foo and Reid, 2013), but the function for which they were initially recognized for is the intermediation capacity

in the mycorrhizal symbiosis process, where they act as a molecular signal in unfavorable conditions for plants (López-Ráez *et al.*, 2010).

ABA and strigolactones are apocarotenoids (Auldridge *et al.*, 2006) and their biosynthesis is analog (Walter *et al.*, 2010). One of the possible roles of ABA comes from its regulating effect on the strigolactone concentrations. For example, tomato plants that were deficient in the synthesis of ABA or treated with ABA specific inhibitors demonstrated a reduced capacity for strigolactone biosynthesis (López-Ráez *et al.*, 2010).

Jasmonic acid and abscisic acid. The biochemical and molecular responses to AMF colonization in host plants also include the activation of the JA signal pathway (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2008). Particularly, JA appears to be involved in the stress signal in mycorrhizal plants through an increase of ABA concentrations (Asensio *et al.*, 2012).

Other JA functions include the development and functionality of arbuscules together with ABA (Isayenkov *et al.*, 2005). The increase of JA could be related to the variation of the root osmotic potential, caused by an increase of carbohydrates from shoots (Ludwig-Müller, 2010). It has been suggested that sugar could induce the expression of genes related to JA biosynthesis, which could elevate the JA level and produce an increase in the sink strength through the extracellular invertase, whose expression is induced in mycorrhizal roots (Schaarschmidt *et al.*, 2006).

The narrow relationship found between ABA and AMF colonization in water deficit conditions, as well as the functionality of the arbuscules suggests that the association between AMF and some plants could be one strategy to deal with a water deficit, probably regulated by the interaction of ABA with other hormones.

Improvement of plant water status

It has been demonstrated that AMF participate in the uptake and transport of water in host plants (Augé, 2004). In sunflowers (*Helianthus annuus* L.) with a water deficit, independently colonizing AMF species (*Funneliformis mosseae* or *Glomus hoi*) had a positive effect that has been observed on the water use efficiency (WUE), as compared to non-inoculated plants (Gholamhoseini *et al.*, 2013) (Tab. 1). This suggests that the stomatal conductance, transpiration rate, hydraulic conductivity and water potential of leaves can be higher in mycorrhizal plants with a water-deficit stress (Augé, 2004) and that the decrease in

leaves and xylem water potentials, because of the decrease in the soil water potential, is lower in mycorrhizal plants (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004).

As a consequence of a decrease in the soil water content, there is stomatal closure that decreases net photosynthesis in plants (Goicoechea *et al.*, 2005). In this way, AMF could increase net photosynthesis by improving the plant water status because the increase of stomatal conductance could result in a greater diffusion of CO₂ within the mesophyll (Boldt *et al.*, 2011).

Hydraulic conductivity in extraradical hyphae and roots.

One of the possible mechanisms for tolerance improvement of mycorrhizal plants to water deficit could be related to the increase in hydraulic conductivity of roots (Augé *et al.*, 2008). This increase results from a larger root system due to AMF hyphae that increase the exploration area in soil, which has a direct effect on the relative water content (RWC) (Meddich *et al.*, 2015) (Tab. 1), water potential, transpiration rate, and crop yield (Augé, 2001).

Living hyphae that are involved in water transport (Allen, 2009) possess a diameter between 2 µm and 5 µm and can penetrate smaller soil pores that are inaccessible to root hairs (10 µm to 20 µm diameter) and thereby absorb water that is not available to non-mycorrhizal plants (Marulanda *et al.*, 2003). In addition, AMF have demonstrated a beneficial effect on soil structures, specifically generating stable aggregates due to the production of a glycoprotein known as glomalin (Wu *et al.*, 2008).

As a consequence, soil colonization may be as important as root colonization in the AMF effect on water relationship in host plants (Augé *et al.*, 2007). It has been postulated that differences between AMF species regarding efficiency of irrigation water in production are due to differences in their ability to produce external mycelium (Augé, 2004) and that the length of hyphae is an important parameter for the characterization of AMF functionality (Cseresnyés *et al.*, 2013).

Stomatal conductance. The existence of variations in the stomatal conductance during water deficit periods has been demonstrated although the effect of AMF is not always apparent and is unpredictable (Augé *et al.*, 2015). In mycorrhizal plants, such as rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004), tangerine (*Citrus tangerine*) (Wu and Xia, 2006) and rice (*Oryza sativa* L.) (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011) under water deficit and inoculated with AMF, an increase in the stomatal conductance has been observed

(Table 1); however, white clover (*Trifolium repens* L.) have displayed a decrease in stomatal conductance and an increase in the RWC in the same conditions (Benabdellah *et al.*, 2011), both associated with a more water use efficiency (Tab. 1).

However, this symbiosis does not always generate the expected results in terms of the water status of plants. For example, in roses inoculated with *Rhizophagus irregularis* in water deficit conditions, the hydration of buds and the aesthetic appearance during water deficit did not significantly improve (Klingeman *et al.*, 2005). Likewise, it has been reported that tomato plants inoculated with AMF in water deficit conditions did not present differences in the RWC, as compared to non-mycorrhizal plants (García-Sánchez *et al.*, 2014).

Membrane conductivity. Some studies have demonstrated that the symbiosis with AMF induces the expression of genes coding for aquaporins (Ruiz-Lozano, 2003). In tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.), it has been demonstrated that inoculation with AMF not only increases the expression of genes coding for aquaporins, but also reflects a greater absorption of water by the plants (Porcel *et al.*, 2005). In contrast, it was found that, in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and soy plants (*Glycine max* L.) inoculated with *F. mosseae* and *R. irregularis*, the water-deficit stress rapidly and intensely decreased the expression of some aquaporin genes (*PIP*), as compared with non-inoculated plants, presenting a less negative hydric potential and higher RWC (Porcel *et al.*, 2006). These differences in the expression could indicate differential mechanisms for modifying the hydraulic conductivity and avoiding water loss at the cellular level.

Osmotic adjustment

It has been observed that most mycorrhizal plants have a better osmotic adjustment than non-mycorrhizal plants (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004). For example, AMF colonization of pistachio (*Pistacia vera* L.) increased tolerance to water deficits by increasing accumulation of compounds for osmotic adjustment (Abbaspour *et al.*, 2012) (Tab. 1). Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants inoculated with a mix of *Glomus* sp. and *Acaulospora* sp. demonstrated a greater decrease in the osmotic potential than non-mycorrhizated plants, indicating higher osmotic adjustment ability (Yooyongwech *et al.*, 2016) (Tab. 1). However, inoculation of plants subjected to water deficit does not always induce osmotic adjustment (Augé, 2001).

Proline is one of the most important osmolytes for osmotic adjustment and its accumulation has been reported in inoculated plants such as white clover (Medina *et al.*, 2010), Sweet potato (Yooyongwech *et al.*, 2016), Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) (Zhang *et al.*, 2015), rice (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2011) and pistachio (Abbaspour *et al.*, 2012) in water stress (Tab. 1). Nevertheless, some plants do not increase proline concentration as a tolerance mechanism to water deficits. For example, mycorrhizal plants of the indian coral tree (*Erythrina variegata* L.) displayed high tolerance to a water-deficit stress, associated with an accumulation of chlorophylls and carotenoids, but not proline (Manoharan *et al.*, 2010).

Antioxidant activity

Two mechanisms have been proposed to explain the low oxidative damage in plants subjected to water deficits and inoculated with AMF. The first consists of the direct water absorption by hyphae and its transfer to the host plant, increasing the water content and decreasing the generation of reactive oxygen species (ROS). Caravaca *et al.* (2005) reported that non-inoculated plants of *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* subjected to a drought increased their superoxide dismutase (SOD) and total peroxidase (POX) activity as compared to inoculated plants because these plants had a lesser oxidative stress.

The second mechanism entails an increase in the production of enzymatic and non-enzymatic antioxidants induced by the symbiosis with AMF (Abbaspour *et al.*, 2012), especially in water-deficit conditions (Zou *et al.*, 2014; Amiri *et al.*, 2015). Recently, maize plants under water deficit conditions have been found to be benefited by the AMF symbiosis not only by a lower oxidative stress, but also by local restriction and non-systemic oxidative stress (Bárzana *et al.*, 2015) (Tab. 1). However, the exact mechanism involved is not yet clear and requires further experiments to better understand the actual function of AMF in the changes of reactive oxygen metabolism and antioxidants production.

Higher nutrients absorption

It has been established that the increase of pigment levels, stomatal conductance, transpiration rate and CO₂ assimilation rate in mycorrhizal plants subjected to a water deficit is caused by a better nutritional supply. This would explain why host plants of corn (*Zea mays* L.) (Zhao *et al.*, 2015) and loquat (Zhang *et al.*, 2014) inoculated with different species

of mycorrhizal fungi and subjected to moderate and severe water stress significantly improve contents of nitrogen (N), phosphorus (P) and magnesium (Mg) among others in shoots, as compared to non-inoculated plants (Tab. 1).

However, this behavior has not been observed in all plants. For example, it has been determined that differences of various photosynthetic parameters observed in tomato plants, cv. 'Moneymaker', inoculated with *F. mosseae* are not the consequence of increases in P induced by the fungi in the plants (Boldt *et al.*, 2011).

Phosphorus. Since P is less mobile in soils with little water, an increase in its acquisition as a consequence of association with AMF is important for improvement of water relations in host plants (Augé, 2004). It has been observed that, although the P absorption during water deficit is reduced, the reduction rate is lower in inoculated plants. This has been observed in marigold (*Tagetes erecta* L.) (Asrar and Elhindi, 2011), wheat (*Triticum aestivum* L.) (Al-Karaki *et al.*, 2004), tangerine (Wu and Xia, 2006), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and squash (*Cucurbita pepo* L.) (Augé *et al.*, 2007). These variations in the P absorption rate can increase roots growth in comparison with non-inoculated plants (Miransari *et al.*, 2007), which can be favorable for the uptake of water and nutrients.

Nitrogen. AMF can make the assimilation of N more efficient in plants, increasing the activity of the enzyme Nitrate Reductase (NR), which is induced by the increase of the substrate (Garg, 2013). Increase in N status in mycorrhizal is due to increasing N transport through hyphae, which also increases P concentration, that is required for the phosphorylation of NR when there are low concentrations of N (Caravaca *et al.*, 2005). Likewise, in mycorrhizal plants, aquaporins could be related to the increase in N due to its participation in the low affinity transport of ammonium (Uehlein *et al.*, 2007).

Photosynthesis, partitioning and production of photoassimilates

It is known that plants subjected to water-deficit stress decrease photosynthesis because of an accumulation of ROS that damages the photosynthetic apparatus (Abbaspour *et al.*, 2012), which can limit the supply of NADPH and ATP to the Calvin cycle. As a consequence of AMF symbiosis, plants improve the water status, which increases photosynthesis by increasing stomatal conductance and, therefore, CO₂ fixing (Boldt *et al.*, 2011). This relationship between the stomatal opening and the relative increase in

the photosynthetic activity have been described in corn (Estrada *et al.*, 2013), guava (*Psidium guajava* L.) (Estrada-Luna *et al.*, 2000) and rosemary (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004) although other plants, such as the 'Iceberg' rose hybrid, do not present this relationship (Klingeman *et al.*, 2005).

On the other hand, high photosynthetic rates in mycorrhizated plants subjected to water deficit can also be explained by non-stomatal factors (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004), mainly by photosynthetic pigments contents and efficiency of photosynthetic apparatus. The increase of photosynthetic pigments in plants inoculated with AMF in a water deficit has been observed in the marigold (Asrar and Elhindi, 2011), indian coral tree (Manoharan *et al.*, 2010), sweet potato (Yooyongwech *et al.*, 2016) and tangerine (Wu and Xia, 2006). In this way, symbiosis avoids the photoinhibition and photodestruction of photosynthetic apparatus by ROS in stress conditions (Asrar and Elhindi, 2011), which has been interpreted as a higher tolerance of mycorrhizal plants, as compared to non-mycorrhizal plants.

A water stress decreases the efficiency of photosystem II (PSII) (Fv/Fm) and it has been reported that AMF have a positive effect (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004) or no effect (García-Sánchez *et al.*, 2014) on this parameter. Rice (Ruíz-Sánchez *et al.*, 2010), sweet potato (Yooyongwech *et al.*, 2016), corn (Estrada *et al.*, 2013), tomato (Boldt *et al.*, 2011), olive (*Olea europaea* L.) and black hawthorn plants (*Rhamnus lycioides* L.) (Caravaca *et al.*, 2003) present significant increases in Fv/Fm, which probably decrease the photorespiration and ROS production (Estrada *et al.*, 2013). As a consequence of this modification, there is an increase in the ability of the plant to use the excitation energy more efficiently for CO₂ assimilation. This increase in the CO₂ assimilation causes a higher accumulation of ATP and reducing equivalents, which could result in a higher quantity of carbohydrates destined to ensure demands of AMF (Boldt *et al.*, 2011).

It has been observed that, in indian coral tree plants in a water deficit, the symbiosis with *F. mosseae* increases the contents of chlorophylls, carotenoids, and proteins, but also reduces the contents of sugars, starches and proline (Manoharan *et al.*, 2010). Likewise, in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L.) in water stress, high chlorophylls and carotenoids contents and low sugars and starches quantities have been observed in plants inoculated with *Glomus versiforme* (Wu *et al.*, 2006). These behaviors can be explained by the increase in the sink strength of AMF, which conducts a greater removal of sugars from plants,

increasing the demand for photoassimilates (Kaschuk *et al.*, 2009). The transfer of organic carbon to AMF is not necessarily an energy load for the plant if its photosynthesis is limited by the sink (Smith and Smith, 2012).

The mutualistic relationship is only efficient if the gains in water and nutrients by the plant are greater than the carbon supply to the fungi (Torres *et al.*, 2011). This is possible through two mechanisms, the first involves competition from the AMF for the carbon partitioned towards the fungi at expense of the production of other organs, such as roots, which can be beneficial due to a positive effect of extraradical colonization on the water status of the mycorrhizated plants (Miransari *et al.*, 2008). The second mechanism has AMF that increase the growth of the roots and the level of carbohydrates in the organ, altering its morphology and producing a greater absorption area, which can be considered a mechanism of tolerance for water deficit (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004; Caravaca *et al.*, 2005; Roldán *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Finally, as has been demonstrated in numerous studies, AMF positively affect plant growth (Tab. 1), modifying the water balance and nutrient absorption in a water deficit (Subramanian *et al.*, 2006). As a consequence, AMF are experiencing an increased use as an inoculum in sustainable production systems (Jeffries *et al.*, 2003) because of the fact that their application can produce economic

benefits, especially in crops of high commercial value (Borde *et al.*, 2011).

Conclusion

AMF increase the tolerance of plants to a water deficit; however, the complexity and diversity of responses caused by the symbiosis against environmental stresses have prevented the establishment of a clear mechanism and appear to have differential modulations according to the species of AMF, plant species and the conditions in which the symbiosis is set. Another important component in the complexity of this relationship could be the susceptibility of the plant to a water deficit and the effect that this one has in its physiology and metabolism since the presence of an additional sink during a stress condition cannot always be supported by the plant. Thus, it is probable that, only in a mild or moderate water stress, where the symbiosis quickly generates a benefit for the plant, the symbiotic association be advantageous. Although the advances in the last decade have confirmed, for many mycorrhizal plants, an increase of tolerance to a water deficit as a result of multiple-level controlled mechanisms, a more holistic approach is required to understand this phenomenon.

Acknowledgments

This work was supported by a study grant from a project co-financed by Colciencias, code 1101-569-33833.

TABLE 1. Recent studies (since 2011) showing the effect of AMF on plants subjected to a drought stress.

Plant species	AMF	Effect		Reference
		Increased	Decreased	
<i>(Ipomoea batatas (L.) Lam.</i>	Commercial inoculum containing <i>Glomus</i> sp. and <i>Acaulospora</i> sp.	Growth		Yooyongwech <i>et al.</i> (2016)
		P content		
		Proline		
		Soluble sugars		
		Leaf osmotic potential		
		Photosynthetic pigments	Chlorophyll degradation	
		Maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm)		
		Photon yield of PSII (ϕ PSII)		
		Net photosynthetic rate		
		Tubers per plant		
Tuber fresh weight				
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	<i>Funneliformis mosseae</i>	Growth		Zhang <i>et al.</i> (2015)
		Leaf water (leaf)	Lipid peroxides (leaf and root)	
		Proline		
		Osmotic adjustment (root)		

Plant species	AMF	Effect		Reference
		Increased	Decreased	
<i>Zea mays</i> L.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Growth P content WUE Rehydration rate Leaf moisture percentage	C:P ratio N:P ratio	Zhao <i>et al.</i> (2015)
<i>Phoenix dactylifera</i> L.	<i>Funneliformis monosporum</i> , <i>Rhizophagus clarus</i> and <i>Glomus deserticola</i> †	Growth Nutrient absorption RWC Water potential	Stomatal resistance	Meddich <i>et al.</i> (2015)
<i>Pelargonium graveolens</i> (L.) Herit.	<i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i>	Essential oil content and Oil yield Catalase activity Ascorbate activity Peroxidase activity Glutathione activity	MDA accumulation H ₂ O ₂ accumulation	Amiri <i>et al.</i> (2015)
<i>Zea mair</i> L.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Proline Aquaporins were differently regulated	Systemically MDA accumulation	Bárzana <i>et al.</i> (2015)
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	<i>Acaulospora laevis</i> , <i>Glomus mosseae</i> , and <i>Glomus caledonium</i>	Growth Plant height, Leaf area Leaf number N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu content		Zhang <i>et al.</i> (2014)
<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai	Mixed inoculum of <i>Rhizophagus irregularis</i> and <i>Funneliformis mosseae</i>	WUE Yield (fruit) P and N content (root)		Omirou <i>et al.</i> (2013)
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Funneliformis mosseae</i> and <i>Glomus hoi</i> †	Growth Seeds quality N and P content (leaves and seeds)		Gholamhoseini <i>et al.</i> (2013)
<i>Knautia arvensis</i> (L.) Coult.	<i>Glomus</i> sp. and complex of AMF inoculum obtained from rhizosphere soil of <i>K. arvensis</i> plants	Growth P content	Proline	Doubková <i>et al.</i> (2013)
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Funneliformis mosseae</i> and <i>Claroideoglobus etunicatum</i>	P and N content Oil percentage (seeds)		Heidari and Karami (2012)
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Commercial inoculum containing <i>Funneliformis mosseae</i> and <i>Rhizophagus irregularis</i>	Foliar production of essentials isoprenoids		Asensio <i>et al.</i> (2012)
<i>Pistacia vera</i> seedlings L.	<i>Claroideoglobus etunicatum</i>	Growth P, K, Zn and Cu content Soluble sugars Proteins Flavonoids Proline Peroxidase activity		Abbaspour <i>et al.</i> (2012)

Plant species	AMF	Effect		Reference
		Increased	Decreased	
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	<i>Rhizophagus diaphanus</i> , <i>Funnelliformis mosseae</i> and <i>Glomus versiforme</i>	Growth Higher soil acid and total phosphatase activities P contents (leaf and root)	Soil available P contents	Wu <i>et al.</i> (2011)
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Growth Efficiency of photosystem II Stomatal conductance Ascorbate and proline	Glutathione Lipid peroxidation	Ruiz-Sánchez <i>et al.</i> (2011)
<i>Tribolium repens</i> L.	Mixture of <i>Glomus</i> species	RWC	Stomatal conductance	Benabdellah <i>et al.</i> (2011)
<i>Cicer arietinum</i> L.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Yield P content (seed and root)		Erman <i>et al.</i> (2011)
<i>Tagetes erecta</i> L.	<i>Septoglomus constrictum</i>	Growth Photosynthetic pigments Phosphorous content Flower quality		Asrar and Elhindi (2011)

Y indicates different responses among the AMF. WUE, water use efficiency; RWC, relative water content.

Literature cited

- Abbaspour, H., S. Saedi-Sar, H. Afshari, and M. Abdel-Wahhab. 2012. Tolerance of mycorrhiza infected pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *J. Plant Physiol.* 169, 704-709. Doi: 10.1016/j.jplph.2012.01.014
- Al-Karaki, G.N. 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci. Hortic.* 109, 1-7. Doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.019
- Al-Karaki, G., B. McMichael, and J. Zak. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14, 263-269. Doi: 10.1007/s00572-003-0265-2
- Allen, M.F. 2009. Bidirectional water flows through the soil-fungal-plant mycorrhizal continuum. *New Phytol.* 182, 290-293. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02815.x
- Amiri, R., A. Nikbakht, and N. Etemadi. 2015. Alleviation of drought stress on rose geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.] in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. *Sci. Hortic.* 197, 373-380. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.062
- Aroca, R. (ed.). 2012. Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features. Springer-Verlag Berlin: GmbH & Co. K, Heidelberg, Germany.
- Aroca, R., J.M. Ruiz-Lozano, A.M. Zamarreño, J.A. Paz, J.M. García-Mina, M.J. Pozo, and J. A. López-Ráez. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *J. Plant Physiol.* 170, 47-55. Doi: 10.1016/j.jplph.2012.08.020
- Asensio, D., F. Rapparini, and J. Peñuelas. 2012. AM fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs. nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. *Phytochemistry* 77, 149-61. Doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.012
- Asrar, A.-W. and K.M. Elhindi. 2011. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* 18, 93-98. Doi: 10.1016/j.sjbs.2010.06.007
- Atul-Nayyar, A., C. Hamel, K. Hanson, and J. Germida. 2009. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza* 19, 239-246. Doi: 10.1007/s00572-008-0215-0
- Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3-42. Doi: 10.1007/s005720100097
- Augé, R.M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Can. J. Soil Sci.* 84, 373-381. Doi: 10.4141/S04-002
- Augé, R.M., H.D. Toler, J.L. Moore, K. Cho, and A. M. Saxton. 2007. Comparing contributions of soil versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *J. Plant Physiol.* 164, 1289-1299. Doi: 10.1016/j.jplph.2006.08.005
- Augé, R.M., H.D. Toler, C.E. Sams, and G. Nasim. 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza* 18, 115-21. Doi: 10.1007/s00572-008-0162-9
- Augé, R.M., H.D. Toler, and A.M. Saxton. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13-24. Doi: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Auldridge, M.E., D.R. McCarty, and H.J. Klee. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 315-21. Doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.005
- Bárrzana, G., R. Aroca, and J.M. Ruiz-Lozano. 2015. Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial

- root drying. *Plant, Cell Environ.* 38, 1613-1627. Doi: 10.1111/pce.12507
- Benabdellah, K., Y. Abbas, M. Abourouh, R. Aroca, and R. Azcón. 2011. Influence of two bacterial isolates from degraded and non-degraded soils and arbuscular mycorrhizae fungi isolated from semi-arid zone on the growth of *Trifolium repens* under drought conditions: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 303-309. Doi: 10.1016/j.ejsobi.2011.07.004
- Boldt, K., Y. Pürs, B. Haupt, M. Bitterlich, C. Kühn, B. Grimm, and P. Franken. 2011. Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *J. Plant Physiol.* 168, 1256-1263. Doi: 10.1016/j.jplph.2011.01.026
- Bonfante, P. and A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 48. Doi: 10.1038/ncomms1046
- Borde, M., M. Dudhane, and P. Jite. 2011. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Prot.* 30, 265-271. Doi: 10.1016/j.cropro.2010.12.010
- Caravaca, F., M.M. Alguacil, J.A. Hernández, and A. Roldán. 2005. Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. *Plant Sci.* 169, 191-197. Doi: 10.1016/j.plantsci.2005.03.013
- Caravaca, M.F., E. Díaz, J.M. Barea N., C. Azcón G.A., and A. Roldán G. 2003. Photosynthetic and transpiration rates of *Olea europaea* subsp. *syvestris* and *Rhamnus lycioides* as affected by water deficit and mycorrhiza. *Biol. Plant.* 46, 637-639. Doi: 10.1023/A:1024880121096
- Cserenyés, I., T. Takács, K.R. Végh, A. Anton, and K. Rajkai. 2013. Electrical impedance and capacitance method: a new approach for detection of functional aspects of arbuscular mycorrhizal colonization in maize. *Eur. J. Soil Biol.* 54, 25-31. Doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.11.001
- Doubková, P., E. Vlasáková, and R. Sudová. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil* 370, 149-161. Doi: 10.1007/s11104-013-1610-7
- Erman, M., S. Demir, E. Ocak, Ş. Tüfenkçi, F. Oğuz, and A. Akköprü. 2011. Effects of Rhizobium, arbuscular mycorrhiza and whey applications on some properties in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed conditions I—Yield, yield components, nodulation and AMF colonization. *F. Crop. Res.* 122, 14-24. Doi: 10.1016/j.fcr.2011.02.002
- Estrada, B., R. Aroca, J.M. Barea, and J.M. Ruiz-Lozano. 2013. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Sci.* 201-202, 42-51. Doi: 10.1016/j.plantsci.2012.11.009
- Estrada-Luna, A.A., F.T. Davies Jr., and J.N. Egilla. 2000. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza* 10, 1-8. Doi: 10.1007/s005720050280
- Estrada-Luna, A.A., and F.T. Davies. 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. *J. Plant Physiol.* 160, 1073-1083. Doi: 10.1078/0176-1617-00989
- FAO. 2012. Coping with water scarcity an action framework for agriculture and food security. Rome.
- Foo, E. and J.B. Reid. 2013. Strigolactones: new physiological roles for an ancient signal. *J. Plant Growth Regul.* 32, 429-442. Doi: 10.1007/s00344-012-9304-6
- García-Sánchez, M., J.M. Palma, J.A. Ocampo, I. García-Romera, and E. Aranda. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate oxidative stress induced by ADOR and enhance antioxidant responses of tomato plants. *J. Plant Physiol.* 171, 421-428. Doi: 10.1016/j.jplph.2013.10.023
- Garg, S.K. 2013. Role and hormonal regulation of nitrate reductase activity in higher plants: a review. *Plant Sci. Feed.* 3, 13-20.
- Gholambhoseini, M., A. Ghalavand, A. Dolatabadian, E. Jamshidi, and A. Khodaei-Joghan. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, yield, nutrient uptake and irrigation water productivity of sunflowers grown under drought stress. *Agric. Water Manag.* 117, 106-114. Doi: 10.1016/j.agwat.2012.11.007
- Goicoechea, N., S. Merino, and M. Sánchez-Díaz. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi can contribute to maintain antioxidant and carbon metabolism in nodules of *Anthyllis cytisoides* L. subjected to drought. *J. Plant Physiol.* 162, 27-35. Doi: 10.1016/j.jplph.2004.03.011
- Heidari, M. and V. Karami. 2012. Effects of different mycorrhiza species on grain yield, nutrient uptake and oil content of sunflower under water stress. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 13, 10-14. Doi: 10.1016/j.jssas.2012.12.002
- Herrera-Medina, M.J., S. Steinkellner, H. Vierheilig, J.A. Ocampo B., and J.M. García Garrido. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 175, 554-64. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x
- Isayenkov, S., C. Mrosk, I. Stenzel, D. Strack, and B. Hause. 2005. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol.* 139, 1401-1410. Doi: 10.1104/pp.105.069054.Two
- Jaleel, C.A., R. Gopi, B. Sankar, M. Gomathinayagam, and R. Panneerselvam. 2008. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *C.R. Biol.* 331, 42-47. Doi: 10.1016/j.crv.2007.11.003
- Jeffries, P., S. Gianinazzi, and S. Perotto. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils.* 37, 1-16. Doi: 10.1007/s00374-002-0546-5
- Kahil, M.T., A. Dinar, and J. Albiac. 2015. Modeling water scarcity and droughts for policy adaptation to climate change in arid and semiarid regions. *J. Hydrol.* 522, 95-109. Doi: 10.1016/j.jhydrol.2014.12.042
- Kaschuk, G., T.W. Kuyper, P.A. Leffelaar, M. Hungria, and K.E. Giller. 2009. Are the rates of photosynthesis stimulated by the

- carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biol. Biochem.* 41, 1233-1244. Doi: 10.1016/j.soilbio.2009.03.005
- Klingeman, W.E., M.W. Van Iersel, J.G. Kang, R.M. Augé, J.L. Moore, and P.C. Flanagan. 2005. Whole-plant gas exchange measurements of mycorrhizal "Iceberg" roses exposed to cyclic drought. *Crop Prot.* 24, 309-317. Doi: 10.1016/j.cropro.2004.08.012
- López-Ráez, J., W. Kohlen, T. Charnikhova, P. Mulder, A.K. Undas, M.J. Sergeant, F. Verstappen, T.D.H. Bugg, A.J. Thompson, C. Ruyter-Spira, and H. Bouwmeester. 2010. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol.* 187, 343-354. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03291.x
- Ludwig-Müller, J. 2010. Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. pp. 169-190. In: Koltai, H. and Y. Kapulnik (eds.). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Springer Netherlands, Dordrecht, Germany. Doi: 10.1007/978-90-481-9489-6_8
- Manoharan, P.T., V. Shanmugaiab, N. Balasubramanian, S. Gomathinayagam, M.P. Sharma, and K. Muthuchelian. 2010. Influence of AM fungi on the growth and physiological status of *Erythrina variegata* Linn. grown under different water stress conditions. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 151-156. Doi: 10.1016/j.ejsobi.2010.01.001
- Marulanda, A., R. Azcón, and J.M. Ruiz-Lozano. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiol. Plant.* 119, 526-533. Doi: 10.1046/j.1399-3054.2003.00196.x
- Meddich, A., F. Jaiti, W. Bourzik, A. El Asli, and M. Hafidi. 2015. Use of mycorrhizal fungi as a strategy for improving the drought tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera*). *Sci. Hortic.* 192, 468-474. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.06.024
- Medina, A., A. Roldán, and R. Azcón. 2010. The effectiveness of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Aspergillus niger* or *Phanerochaete chrysosporium* treated organic amendments from olive residues upon plant growth in a semi-arid degraded soil. *J. Environ. Manage.* 91, 2547-2553. Doi: 10.1016/j.jenvman.2010.07.008
- Miransari, M., H.A. Bahrami, F. Rejali, and M.J. Malakouti. 2008. Using arbuscular mycorrhiza to alleviate the stress of soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1197-1206. Doi: 10.1016/j.soilbio.2007.12.014
- Miransari, M., H.A. Bahrami, F. Rejali, M.J. Malakouti, and H. Torabi. 2007. Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressful effects of soil compaction on corn (*Zea mays* L.) growth. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2014-2026. Doi: 10.1016/j.soilbio.2007.02.017
- Omirou, M., I.M. Ioannides, and C. Ehalotis. 2013. Mycorrhizal inoculation affects arbuscular mycorrhizal diversity in watermelon roots, but leads to improved colonization and plant response under water stress only. *Appl. Soil Ecol.* 63, 112-119. Doi: 10.1016/j.apsoil.2012.09.013
- Porcel, R., R. Aroca, R. Azcón, and J.M. Ruiz-Lozano. 2006. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 60, 389-404. Doi: 10.1007/s11103-005-4210-y
- Porcel, R., M. Gómez, R. Kaldenhoff, and J.M. Ruiz-Lozano. 2005. Impairment of NtAQPI gene expression in tobacco plants does not affect root colonisation pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. *Mycorrhiza* 15, 417-23. Doi: 10.1007/s00572-005-0346-5
- Porcel, R. and J.M. Ruiz-Lozano. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J. Exp. Bot.* 55, 1743-1750. Doi: 10.1093/jxb/erh188
- Roldán, A., P. Díaz-Vivancos, J.A. Hernández, L. Carrasco, and F. Caravaca. 2008. Superoxide dismutase and total peroxidase activities in relation to drought recovery performance of mycorrhizal shrub seedlings grown in an amended semiarid soil. *J. Plant Physiol.* 165(7):715-722. Doi: 10.1016/j.jplph.2007.02.007
- Ruiz-Lozano, J.M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13, 309-317. Doi: 10.1007/s00572-003-0237-6
- Ruiz-Sánchez, M., E. Armada, Y. Muñoz, I.E. García de Salamone, R. Aroca, J.M. Ruiz-Lozano, and R. Azcón. 2011. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *J. Plant Physiol.* 168, 1031-1037. Doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.019
- Ruiz-Sánchez, M., R. Aroca, Y. Muñoz, R. Polón, and J.M. Ruiz-Lozano. 2010. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *J. Plant Physiol.* 167, 862-869. Doi: 10.1016/j.jplph.2010.01.018
- Sánchez-Blanco, M.J., T. Ferrández, M.A. Morales, A. Morte, and J.J. Alarcón. 2004. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* 161, 675-182. Doi: 10.1078/0176-1617-01191
- Sardans, J., J. Peñuelas, and R. Ogaya. 2007. Drought's impact on Ca, Fe, Mg, Mo and S concentration and accumulation patterns in the plants and soil of a Mediterranean evergreen *Quercus ilex* forest. *Biogeochemistry* 87, 49-69. Doi: 10.1007/s10533-007-9167-2
- Schaarschmidt, S., T. Roitsch, and B. Hause. 2006. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J. Exp. Bot.* 57, 4015-4023. Doi: 10.1093/jxb/erl172
- Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421. Doi: 10.1017/S0953756201005196
- Smith, S.E., and F.A. Smith. 2012. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104, 1-13. Doi: 10.3852/11-229
- Subramanian, K.S., P. Santhanakrishnan, and P. Balasubramanian. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Sci. Hortic.* 107, 245-253. Doi: 10.1016/j.scienta.2005.07.006
- Tejeda-Sartorius, M., O. Martínez de la Vega, and J.P. Délano-Frier. 2008. Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the expression of genes involved

- in carbohydrate partitioning. *Physiol. Plant.* 133, 339-353. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01081.x
- Torres, Y.A., C. Busso, O. Montenegro, L. Ibhurrart, H. Giorgetti, G. Rodríguez, D. Bentivegna, R. Brevedan, O. Fernández, M. de la Merced Mujica, S. Baioni, J. Entio, M. N. Fioretti, and G. Tucut. 2011. Defoliation effects on the arbuscular mycorrhizas of ten perennial grass genotypes in arid Patagonia, Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 49, 208-214. Doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.004
- Uehlein, N., K. Fileschi, M. Eckert, G.P. Bienert, A. Bertl, and R. Kaldenhoff. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68, 122-129. Doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.033
- Walter, M.H., D.S. Floss, and D. Strack. 2010. Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232, 1-17. Doi: 10.1007/s00425-010-1156-3
- Wang, W., B. Vinocur, and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14. Doi: 10.1007/s00425-003-1105-5
- Wu, Q.-S., and R.-X. Xia. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J. Plant Physiol.* 163, 417-425. Doi: 10.1016/j.jplph.2005.04.024
- Wu, Q.-S., R.-X. Xia, and Y.-N. Zou. 2006. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *J. Plant Physiol.* 163, 1101-1110. Doi: 10.1016/j.jplph.2005.09.001
- Wu, Q.-S., R.-X. Xia, and Y.-N. Zou. 2008. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 122-128. Doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.10.001
- Wu, Q.-S., Y.-N. Zou, and X.-H. He. 2011. Differences of hyphal and soil phosphatase activities in drought-stressed mycorrhizal trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) seedlings. *Sci. Hort.* 129, 294-298. Doi: 10.1016/j.scienta.2011.03.051
- Yang, Y., Y. Chen, and W. Li. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi infection in desert riparian forest and its environmental implications: a case study in the lower reach of Tarim River. *Prog. Nat. Sci.* 18, 983-991. Doi: 10.1016/j.pnsc.2008.02.009
- Yooyongwech, S., T. Samphumphuang, R. Tisarum, C. Theerawitaya, and S. Cha-Um. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved water deficit tolerance in two different sweet potato genotypes involves osmotic adjustments via soluble sugar and free proline. *Sci. Hort.* 198, 107-117. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.002
- Zhang, Y., Q. Yao, J. Li, Y. Hu, and J. Chen. 2014. Growth Response and nutrient uptake of *Eriobotrya japonica* plants inoculated with three isolates of arbuscular mycorrhizal fungi under water stress condition. *J. Plant Nutr.* 37, 690-703. Doi: 10.1080/01904167.2013.868478
- Zhang, Y., Q. Yao, J. Li, Y. Wang, X. Liu, Y. Hu, and J. Chen. 2015. Contributions of an arbuscular mycorrhizal fungus to growth and physiology of loquat (*Eriobotrya japonica*) plants subjected to drought stress. *Mycol. Prog.* 14(10). Doi: 10.1007/s11557-015-1108-1
- Zhao, R., W. Guo, N. Bi, J. Guo, L. Wang, J. Zhao, and J. Zhang. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Appl. Soil Ecol.* 88, 41-49. Doi: 10.1016/j.apsoil.2014.11.016
- Zhongqun, H., H. Chaoxing, Z. Zhang, Z. Zhirong, and H. Wang. 2007. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular Mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids Surf., B. Biointerfaces.* 59, 128-133. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.04.023
- Zou, Y.N., Y.M. Huang, Q.S. Wu, and X.H. He. 2014. Mycorrhiza-induced lower oxidative burst is related with higher antioxidant enzyme activities, net H₂O₂ effluxes, and Ca²⁺ influxes in trifoliolate orange roots under drought stress. *Mycorrhiza* 25, 143-152. Doi: 10.1007/s00572-014-0598-z

C. ANEXO: Certificación y presentación de resultados obtenidos durante la pasantía doctoral en el Instituto de Botánica de la Académica Checa de Ciencias.

Explorando la variabilidad genética del hongo formador de micorrizas arbusculares *Rhizophagus irregularis* en *Medicago truncatula* bajo condiciones de invernadero



Institute of Botany CAS
Department of Mycorrhizal Symbioses
Zámek 1
252 43 Průhonice

John Cristhian Fernández Lizarazo
Universidad Nacional de Colombia

Průhonice, 19th of October 2017

Object: Confirmation of scientific stay

To Whom It May Concern,

I hereby confirm that John Cristhian Fernández Lizarazo carried out his scientific stay in Institute of Botany, CAS, from 2nd of April till 23rd of September.

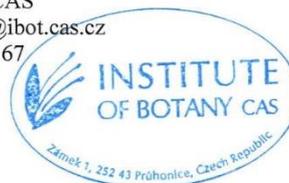
During this stay, he conducted an experiment addressing phenotypic and functional differences within a set of isolates of arbuscular mycorrhizal fungi and participated at other scientific activities of Department of Mycorrhizal Symbioses.

He carried out his tasks independently and with diligence, including literature surveys, protocolling and data analysis. Due to his good knowledge of English, communication was always smooth and straightforward. For these reasons, I can qualify his performance with grade 5 (the highest possible).

Yours faithfully,

Mgr. Martina Janoušková, Ph.D.

Head of Department of Mycorrhizal Symbioses
Institute of Botany, CAS
martina.janouskova@ibot.cas.cz
phone: +420271015367



Explorando la variabilidad genética del hongo
formador de micorrizas arbusculares *Rhizophagus*
irregularis en *Medicago truncatula* bajo
condiciones de invernadero

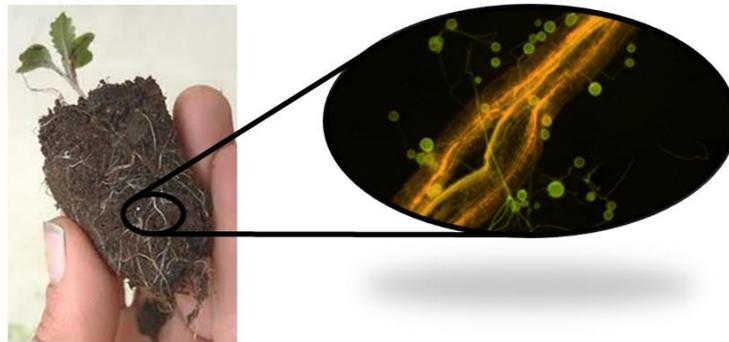
JOHN CRISTHIAN FERNÁNDEZ LIZARAZO M.Sc.

DIRECTORA: ALIA RODRÍGUEZ V. Ph.D.

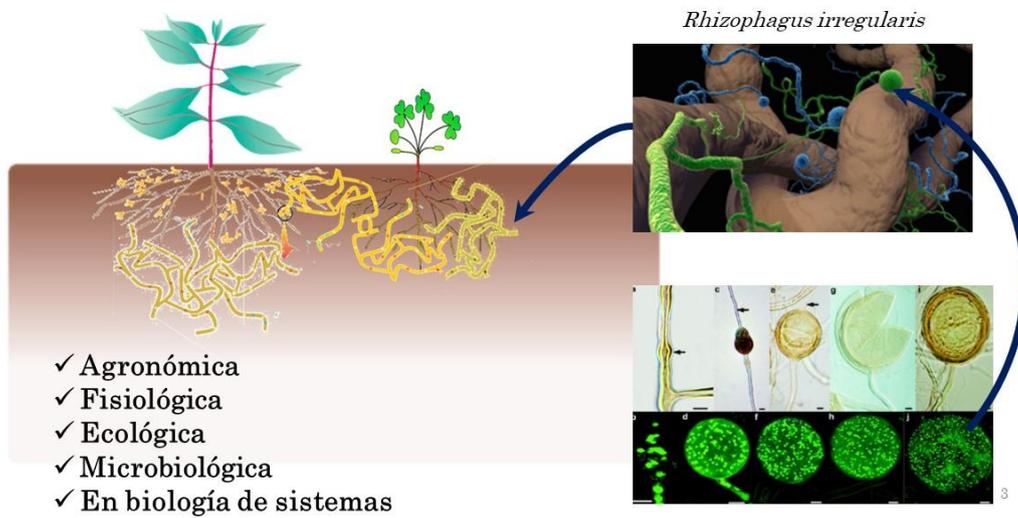
Universidad Nacional de Colombia
Doctorado en Ciencias Agraria
Línea de investigación Fisiología Vegetal

¿Quiénes son los hongos formadores de
micorrizas arbusculares?

INTRODUCCIÓN



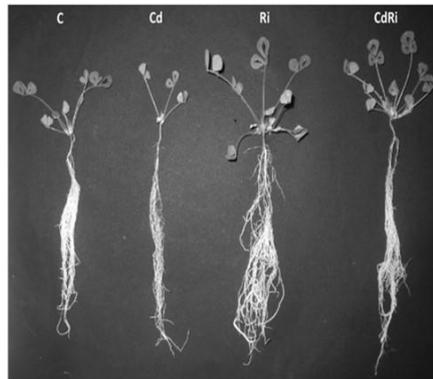
¿Cuál es la importancia de los hongos FMA? *INTRODUCCIÓN*



Un ejemplo de su importancia...

INTRODUCCIÓN

Existe un efecto **amortiguador** de los hongos FMA en las plantas hospederas frente al estrés por cadmio



Medicago truncatula

(Aloui et al., 2013)

Un ejemplo de su importancia...

INTRODUCCIÓN

Las variaciones en fito-remediación por hongos FMA pueden ser atribuibles a factores genéticos y/o ambientales

- Factores genéticos:** Especie de planta (Rivera-Becerril et al. 2002)
 Genotipo de planta (Leung et al. 2010; Malcová et al. 2003)
 Especie del hongo FMA (Hassan et al. 2013)
Aislado del hongo FMA (Kaldorf et al. 1999; Rendon et al. 2009). Variación intraespecífica o epigenética.

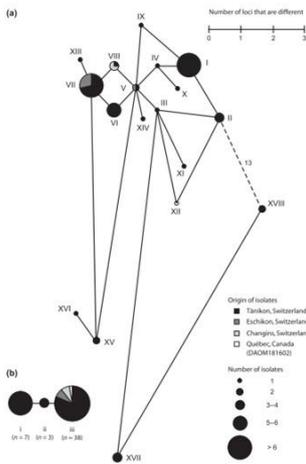


- Factores ambientales:** pH (El-Kherbawy et al. 1989)
 Nutrición (P) (Ultra et al. 2007)
 Interacción con otros micro-organismos (Rendon et al. 2009)
 Concentración de metales pesados (Chen et al. 2003)
 Estrés hídrico (Leung et al. 2010)

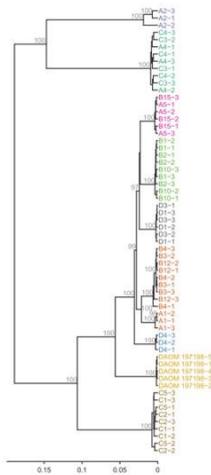
De estos factores, es importante resaltar la variación intra-específica de los hongos FMA debido a los descubrimientos recientes en su genética

Existe variación genética intraespecífica entre los hongos FMA, pero...

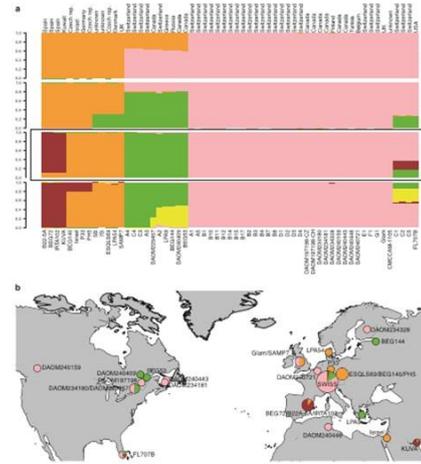
INTRODUCCIÓN



Croll et al (2008)



Wyss et al., (2016)



Savary et al., (2017)

INTRODUCCIÓN

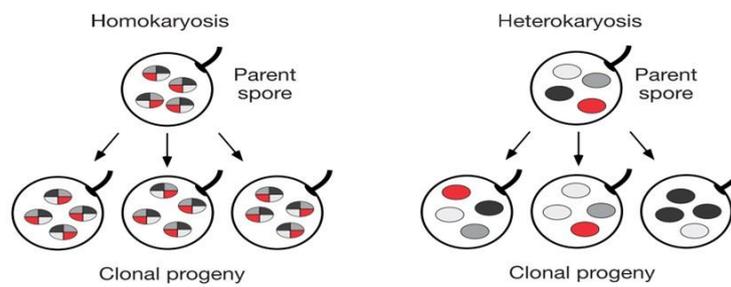
Hay preguntas fundamentales acerca de la variación genética en hongos FMA



Entonces... ¿Porqué hay variabilidad genética (funcional) entre diferentes aislamientos?

INTRODUCCIÓN

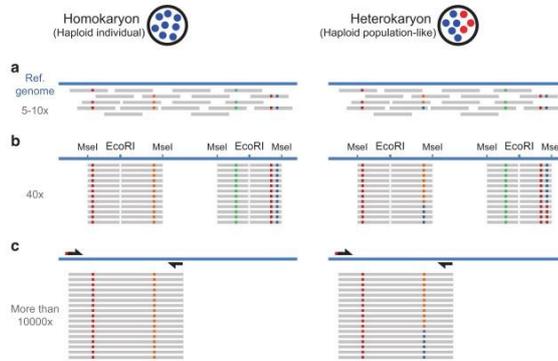
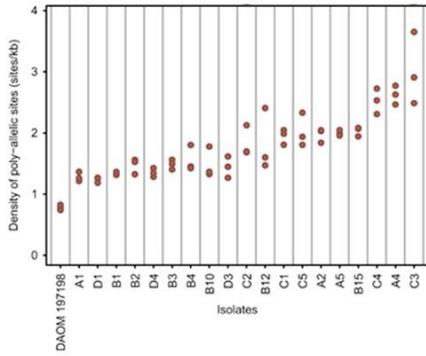
Dos modelos pueden explicar la organización de la variación genética en los hongos FMA.



Pawlowska, T. E., and J. W. Taylor. (2004)

INTRODUCCIÓN

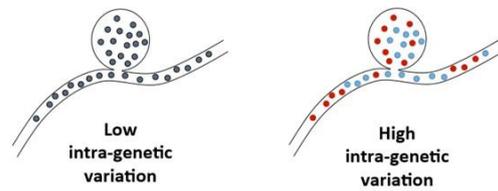
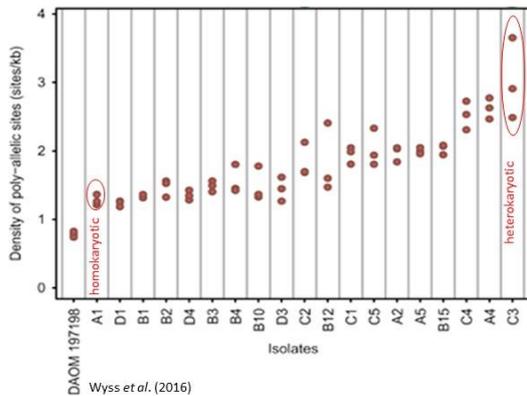
Algunos aislados de *Rhizophagus irregularis* tienen mayor variabilidad genética que otros



Wyss *et al.* (2016)

INTRODUCCIÓN

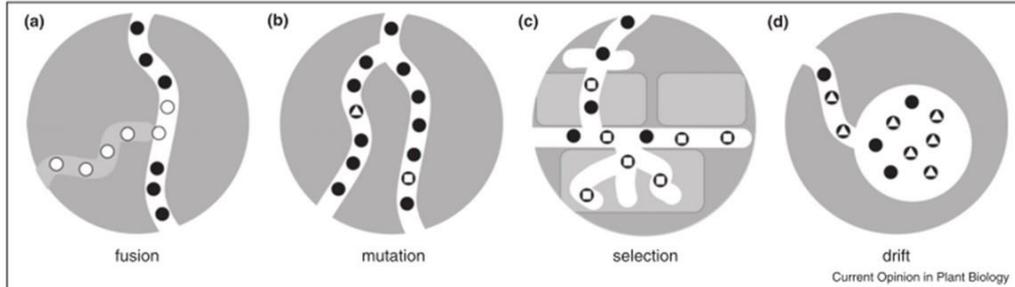
Algunos de estos aislados son homocarióticos y otros heterocarióticos



Wyss *et al.* (2016)

INTRODUCCIÓN

Estas son las posibles causas de la variabilidad genética intraespecífica en hongos FMA



(Giovannetti et al., 1999)

(Corradi & Sanders. 2006)

(Angelard et al., 2014)

(Sanders & Croll 2010)

(Croll et al., 2009)

(Angelard et al., 2010)

(Sanders & Croll 2010)

(Young, 2015)

INTRODUCCIÓN

Variabilidad genética intra-específica de los hongos FMA y su funcionalidad

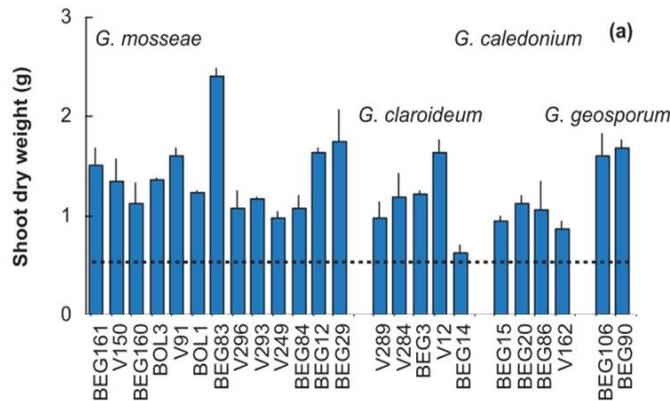
Podría tener un efecto en el metabolismo de las plantas hospederas en:

1. Los cambios en la expresión genética y el proteoma de plantas inoculadas con hongos FMA (Rivera-Becerril et al. 2005; Aloui et al. 2011)
2. La regulación positiva de vías metabólicas relacionadas con mecanismos de respuestas a estrés en plantas (Rivero et al. 2015)
3. La variabilidad intra específica de hongos FMA en términos de tolerancia a estreses (Cd) (Biro et al. 2009).
4. Relevancia de heterogeneidad intra específica en términos de respuestas simbióticas (Munkvold et al. 2004)

(Croll and Sanders 2009)

INTRODUCCIÓN

Existe una mayor heterogeneidad funcional intra-específica con respecto a la inter-específica en los parámetros evaluados

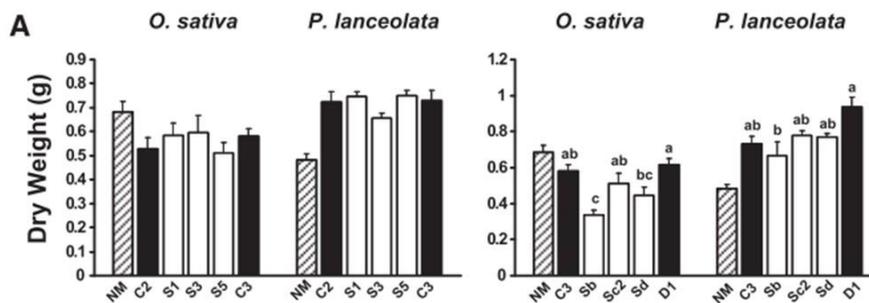


Munkvold et al. (2004)

La diversidad intra-específica podría ser el nivel más apropiado para el estudio de la influencia de los hongos FMA en la estructura, funcionamiento y productividad de los ecosistemas (Sanders & Rodríguez; 2014)

INTRODUCCIÓN

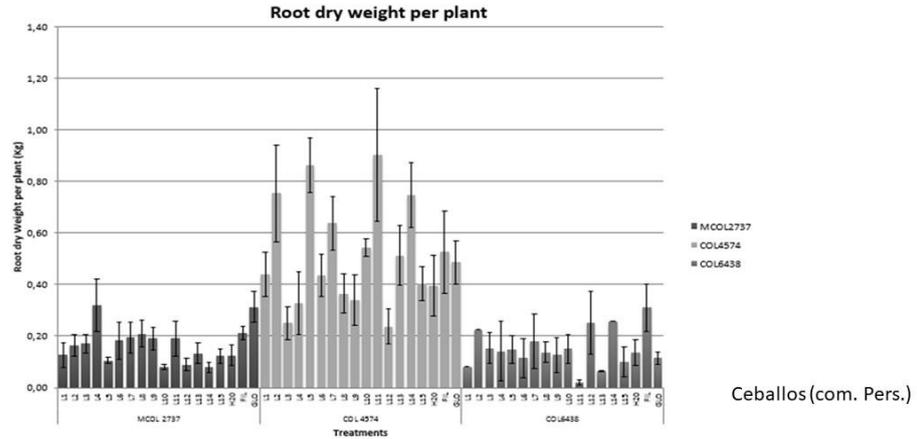
Líneas monospóricas (SSL's) tienen efectos diferentes sobre el crecimiento vegetal y sobre su expresión genética (cond. contr.)



(Angelard et al., 2010)

INTRODUCCIÓN

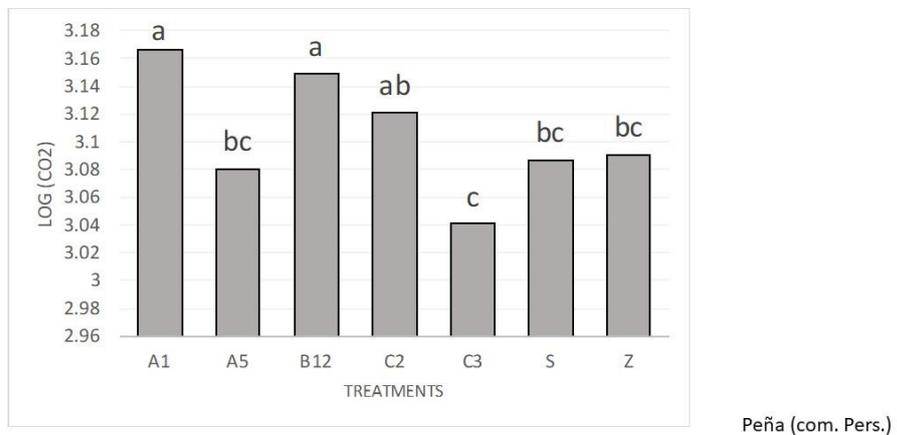
Diferentes líneas (SSL's y parentales) producen respuestas diferentes en crecimiento de yuca a nivel de campo



La alteración de la composición genética de los hongos FMA en laboratorio utilizando intercambio genético y segregación podría ser una herramienta poderosa para estudiar las funciones simbióticas de la interacción (Sanders and Croll 2010)

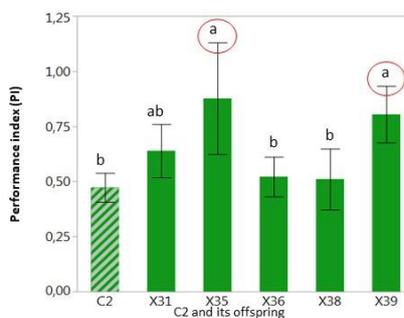
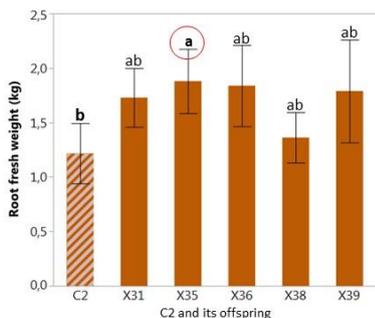
INTRODUCCIÓN

Diferentes líneas parentales producen respuestas diferentes en respiración del suelo en cultivo de yuca a nivel de campo



INTRODUCCIÓN

**SSL's tienen efectos diferentes sobre el rendimiento de yuca en campo...
ipero también en parámetros de fluorescencia de la clorofila!**



Peña (com. Pers.)

17

INTRODUCCIÓN

**Diferencias en índices de tolerancia a estrés por cadmio y déficit hídrico
en plantas de cacao... los parámetros de fluorescencia son
determinantes en su estimación.**

Líneas	General	Estresada	Hidratada		General	Con Cd	Sin Cd
A1	0,61778712	0,57730801	0,65826623		0,37921581	0,28169582	0,58312125
A5	0,44476476	0,64544128	0,24408824		0,40378983	0,44626439	0,31497937
C2	0,58205945	0,82683417	0,33728474		0,46549286	0,49047857	0,41325
C3	0,34302898	0,1999229	0,48613506		0,30405703	0,2358197	0,44673509
Control Hongo	0,44913345	0,55382121	0,34444569		0,59944596	0,73503535	0,31594088
X38	0,41820675	0,35137499	0,4850385		0,65206167	0,70987739	0,53117426
Z15	0,61439101	0,65854256	0,57023947		0,47466594	0,47093402	0,48246903
Z25	0,53215655	0,36334114	0,70097196		0,58631305	0,53814038	0,68703773

- Fv/Fo
- Dlo/RC * -1
- phi(Po)
- phi(Eo)
- phi(Ro)
- DF Total
- LER
- POT. HIDR.
- Long. Raiz
- PS Raiz
- PS Tallo
- PS Hojas

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

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

She et al., (2011)

- Cdt. (mg/Kg)
- Cdd. (mg/Kg)
- Root Cd (mg/Kg)2
- Shoot Cd (mg/kg)2
- Extracción de Cd -Raiz (mg)2
- Extracción de Cd -PA (mg)2
- Extracción de Cd -Total (mg)2
- Concentración de Cd en Total (mg/Kg)2
- Eabs2
- Etrs.2
- FCB (Cdt)2
- FCB (Cdd)2

INTRODUCCIÓN

¿Existe una relación entre el crecimiento y parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas inoculadas con líneas de hongos FMA genéticamente diferentes?

- ✓ Multiplicidad de factores que afectan las respuestas de las plantas en campo
- ✓ Efecto de los genotipos, de plantas y de hongos FMA
- ✓ Complejidad funcional, fisiológica o genética aun no contemplada

Necesidad de realizar un experimento en condiciones controladas



Department of Invasion Ecology
 Department of Experimental Phycology and Ecotoxicology
 Department of Functional Ecology
 Department of Genetic Ecology
 Department of GIS and Remote Sensing
Department of Mycorrhizal Symbioses
 Department of Population Ecology
 Department of Flow Cytometry
 Department of Taxonomy
 Department of Vegetation Ecology



Objetivo

Estudiar la relación entre el crecimiento y parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con diferentes líneas parentales de *Rhizophagus irregularis* bajo condiciones de invernadero

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales

- Sustrato: Zeolita + arena 1:1 estéril
- Tubetes plásticos estériles de siembra
- Material vegetal: *Medicago truncatula* cv Jemalong
- Riego: 80% CC
- Temperatura: 22°C
- HR: 75%
- Nutrición: Sln White modificada semanal (10 ml) + *Sinorhizobium* sp. cepa LT10 ($1,9 \times 10^9$)

MATERIALES Y MÉTODOS

Pre-ensayo: Conocer el crecimiento de *M. truncatula* en diferentes concentraciones de Cd

Diseño estadístico: DCA

Tratamientos: 11 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100 ppm Cd)

Réplicas: 3

Unidad experimental: Tubete con dos plantas

Parámetros (7 dds): pH de sustrato
 Concentración de Cd en sustrato
 (digestión ácida y valoración por
 absorción atómica)
 Longitud de raíz
 Adición de Cd en suelo previa a siembra
 de semillas (un día).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo principal:

Arreglo: factorial 2²: Cd (0, 100 ppm) x genotipo del hongo FMA (A5, B10, B15, B4, C1, C2, C3, C4, C5, D1, D4, sin inoculación)

Diseño estadístico: DCA

Réplicas: 6

Unidad experimental: Tubete con una plantas pregerminadas

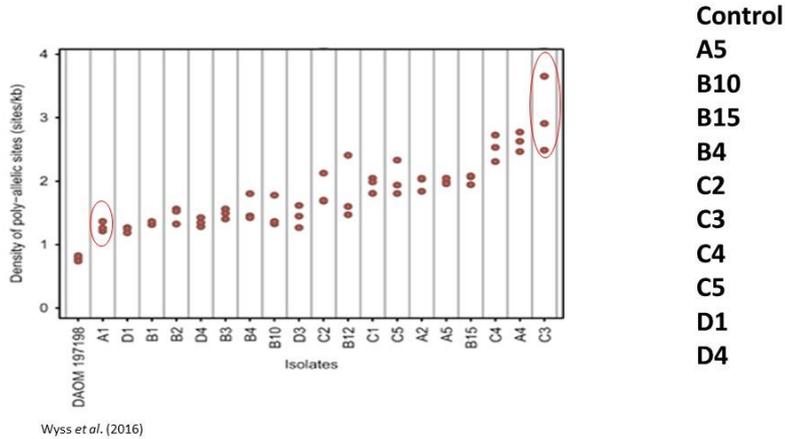
Parámetros (30 ddt):

Parámetros OJIP (FluorPen FP 100)
Biomasa
Colonización intra-radical (Phillips & Hayman, 1970)
Actividad vital ALF intra-radical (Wu et al, 2011)
Cuantificación de hifa extra-radical (Brundett et al, 1994)
Actividad vital ALF extra-radical (Wu et al, 2011)
Índice de tolerancia (She et al., 2011)

MATERIALS AND METHODS

Selección de aislados

Líneas parentales con diferencias en sitios poli-alélicos

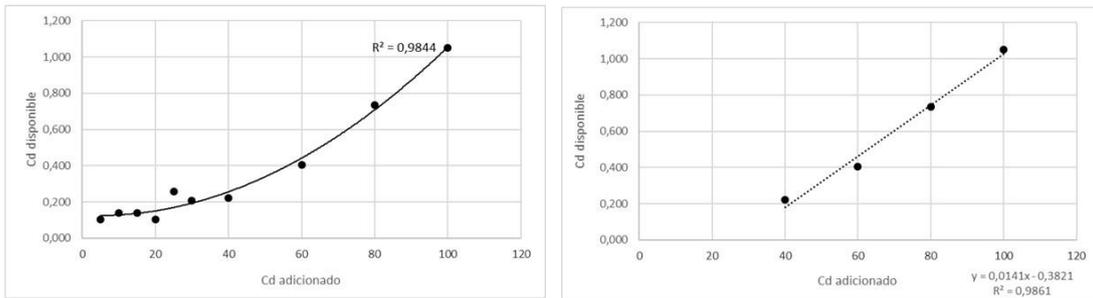


25

RESULTADOS

Hay una relación directa entre el Cd adicionado y el Cd disponible, no obstante su disponibilidad es baja.

Pre-ensayo

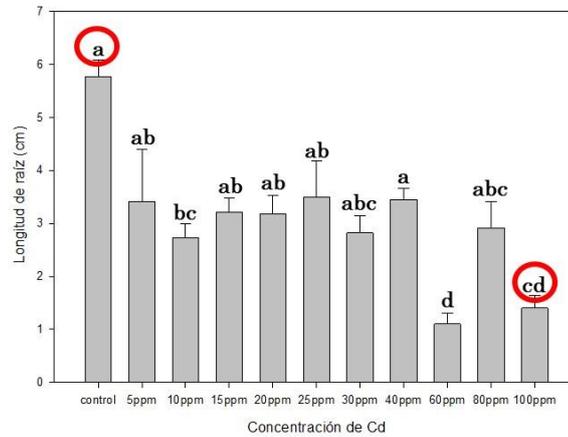


pH:8

RESULTADOS

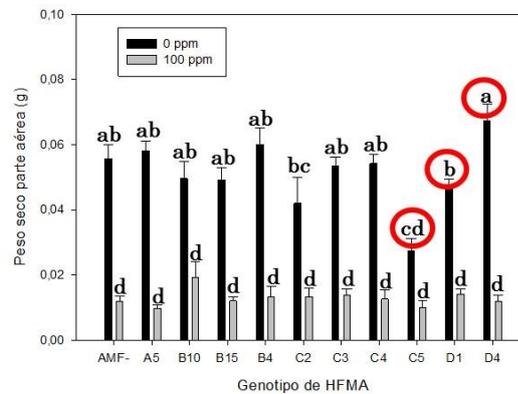
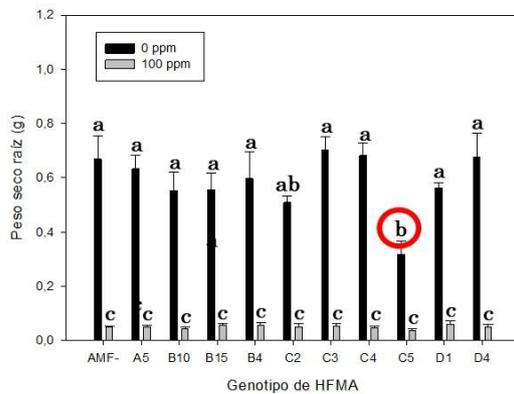
La adición de 100 ppm de Cd parece proveer las condiciones tóxicas no letales para su utilización en *M. truncatula*.

Pre-ensayo

**RESULTADOS**

Hay diferencias significativas en el crecimiento solamente cuando no hay estrés por Cd.

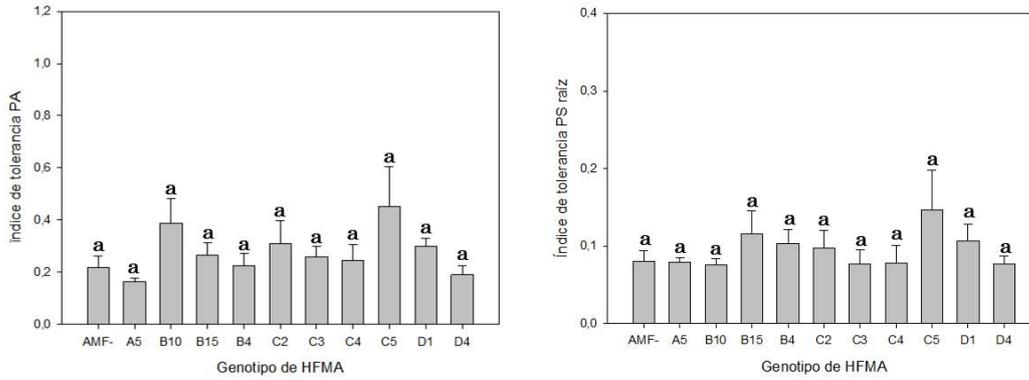
Ensayo principal:



RESULTADOS

No hay diferencias significativas en los índices de tolerancia a estrés por Cd.

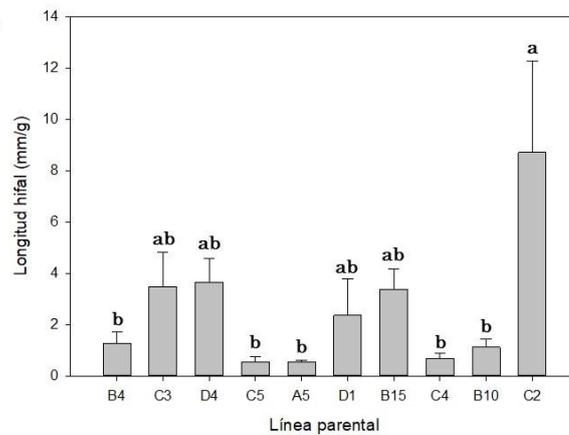
Ensayo principal:



RESULTADOS

Hay diferencias significativas en la longitud de hifa extra-radical.

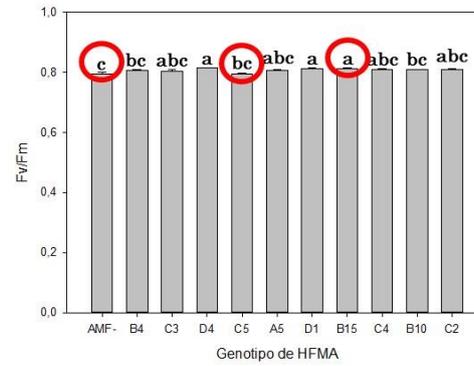
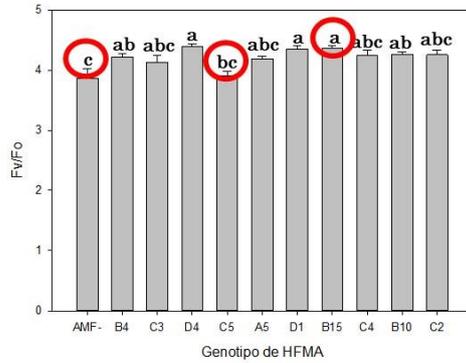
Ensayo principal:



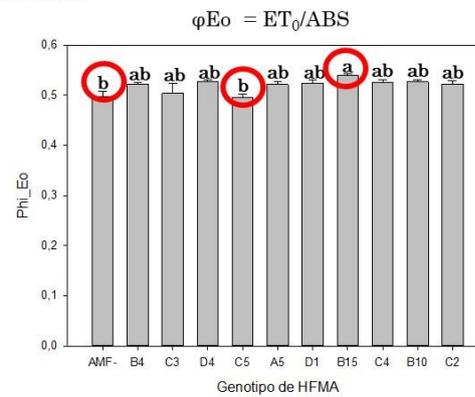
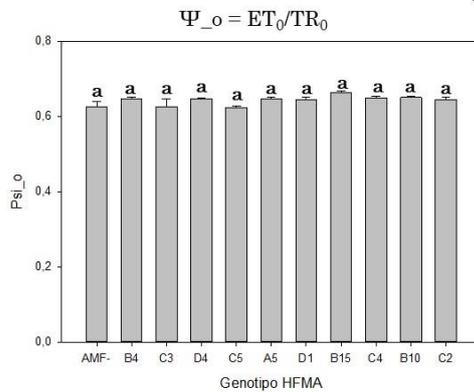
No hay diferencias significativas en colonización intra-radical, actividad ALF intra-radical ni actividad ALF extra-radical

RESULTADOS

Hay diferencias significativas en el rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria a F_0 y a F_m .

**RESULTADOS**

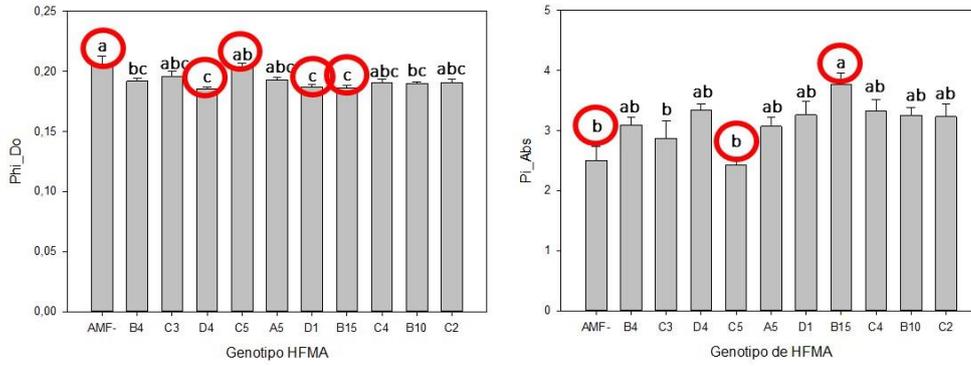
No hay diferencias significativas en la eficiencia del transporte de electrones pero si en el rendimiento cuántico para el transporte de electrones.



Diferencias en la probabilidad de que un electron se mueva más allá de la Q_A .

RESULTADOS

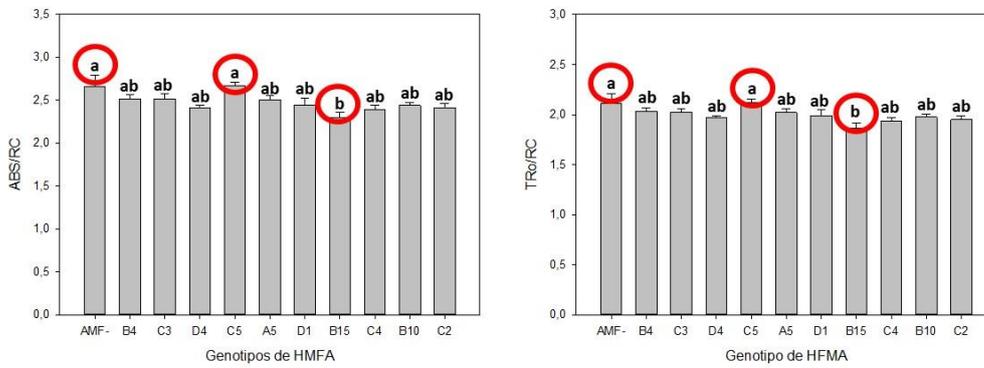
Hay diferencias significativas en el rendimiento cuántico para la disipación y en el índice de vitalidad para la conservación de energía.



Diferencias en la conservación de energía desde el excitón hasta la reducción de los aceptores de electrones antes del PSI.

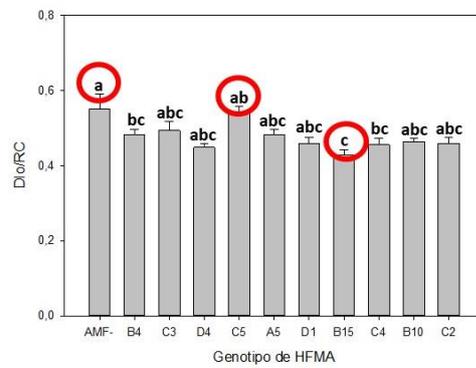
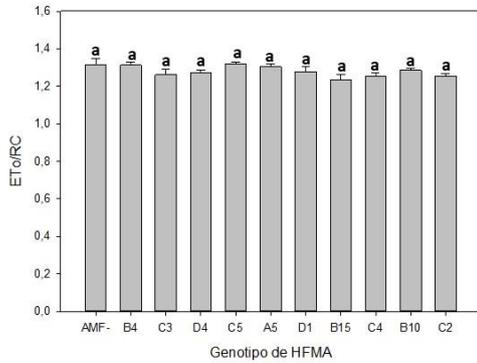
RESULTADOS

Hay diferencias significativas en el flujo específico de absorción y en el atrapamiento de energía.



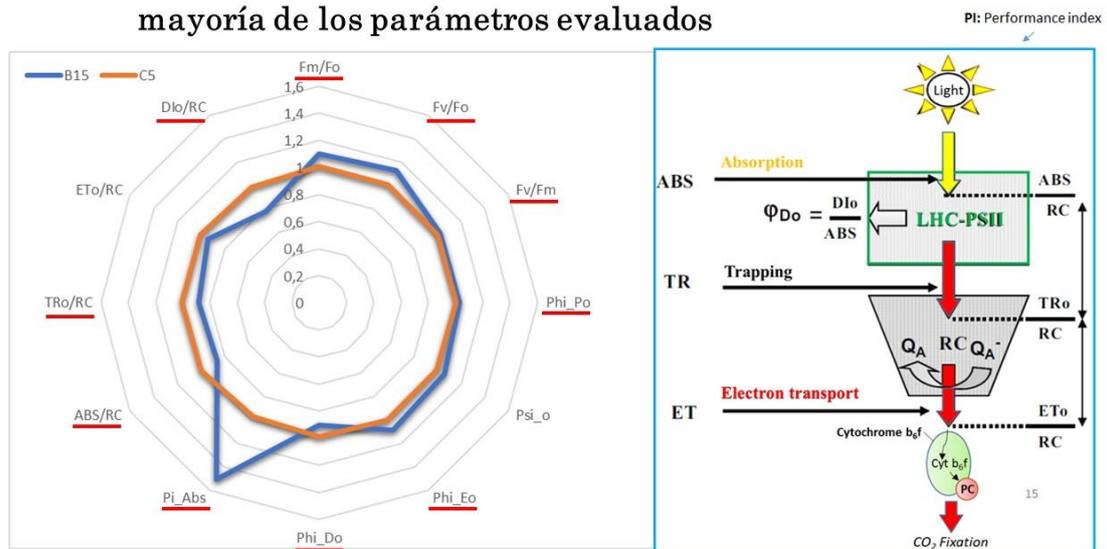
RESULTADOS

No hay diferencias significativas en el flujo específico de transporte de electrones pero si en el de disipación.



B15 y C5 tuvieron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados

RESULTADOS



Pi_Abs podría ser un mejor indicador (Strasser, 2007)

Existe una correlación entre el crecimiento y parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas inoculadas con líneas de hongos FMA genéticamente diferentes

Órgano	Variable	Correlación	Prob. de significancia
RFW	Psi_o	0,6488	0,0308
	Phi_Eo	0,6305	0,0376
	Pi_Abs	0,6189	0,0423
	ABS/RC	-0,6308	0,0374
	TRo/RC	-0,6334	0,0364
	Dlo/RC	-0,6111	0,0458
SDW	Fm/Fo	0,6973	0,0171
	Fv/Fo	0,6973	0,0171
	Fv/Fm	0,6756	0,0225
	Phi_Po	0,6756	0,0225
	Psi_o	0,791	0,0037
	Phi_Eo	0,777	0,0049
	Phi_Do	-0,6756	0,0225
	Pi_Abs	0,7776	0,0048
	ABS/RC	-0,7895	0,0039
	TRo/RC	-0,7924	0,0036
ETo/RC	-0,7194	0,0126	
Dlo/RC	-0,7674	0,0058	

CONCLUSIONES

- ✓ La variabilidad genética de las líneas parentales utilizadas se reflejó en diferencias en la longitud de hifa extra-radical, en el crecimiento (cuando no hay estrés por Cd) y en la mayoría de los parámetros de fluorescencia.
- ✓ De forma interesante, se estableció una correlación entre el crecimiento y los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas inoculadas con las líneas parentales más contrastantes.

Preguntas abiertas:

- ✓ ¿Predicción de rendimiento biológico?
- ✓ ¿Identificación de líneas contrastantes en campo?



Gracias



9. LITERATURA CITADA

- Abu-Elsaoud, A. M., N. A. Nafady, and A. M. Abdel-Azeem. 2017. Arbuscular mycorrhizal strategy for zinc mycoremediation and diminished translocation to shoots and grains in wheat. *PLoS One*. 12(11):1–21.
- Al-Karaki, G. N. 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 109(1):1–7 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423806001075>; last accessed February 28, 2013.
- Alguacil, M., F. Caravaca, P. Díaz-Vivancos, J. a. Hernández, and a. Roldán. 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 Soil*. 279(1–2):209–218 Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-005-1238-3>; last accessed September 17, 2013.
- Allen, J. W., and Y. Shachar-Hill. 2009. Sulfur Transfer through an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiol*. 149(1):549–560 Available online at: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.129866>.
- Allen, M. F. 2009. Bidirectional water flows through the soil-fungal-plant mycorrhizal continuum. *New Phytol*. 182(2):290–293.
- Allen, R., L. Pereira, D. Raes, and M. Smith. 2006. *Evapotranspiración del cultivo: Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos*. FAO (ed.) Departamento para el Desarrollo Sostenible, Roma, Italia. 208 p. Available online at: <http://www.fao.org/docrep/009/x0490s/x0490s00.htm>.
- Almeida, A. F. De, and R. R. Valle. 2008. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian J. Plant Physiol*. 19(4):425–448.
- Andrade, S. A. L., P. L. Gratão, R. A. Azevedo, A. P. Silveira, M. Schiavinato, and P. Mazzafera. 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ*.

- Exp. Bot.* 68(2):198–207 Available online at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847209002500>; last accessed April 14, 2014.
- Anga, J. 2012. Conférence Mondiale sur le Cacao Œuvrer pour une économie cacaoyère mondiale durable. P. 20 in *World Cocoa Conference 2012*, ICCO, Costa de Marfil.
- Angelard, C., A. Colard, H. Niculita-Hirzel, D. Croll, and I. R. Sanders. 2010. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Curr. Biol.* 20(13):1216–21 Available online at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541408>; last accessed April 7, 2014.
- Angelard, C., and I. R. Sanders. 2011. Effect of segregation and genetic exchange on arbuscular mycorrhizal fungi in colonization of roots. *New Phytol.* 189(3):652–7 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166810>.
- Angelard, C., C. Tanner, P. Fontanillas, H. Niculita-Hirzel, F. G. Masclaux, and I. R. Sanders. 2014. Rapid genotypic change and plasticity in arbuscular mycorrhizal fungi is caused by a host shift and enhanced by segregation. *ISME J.* 8:284–294 Available online at:
<http://www.nature.com/ismej/journal/v8/n2/abs/ismej2013154a.html>; last accessed April 21, 2015.
- Aranzazu, F., N. Martínez, D. Rincón, and G. Palencia. 2009. *Materiales de cacao en Colombia, su compatibilidad sexual y modelos de siembra*. Fedecacao-Corpoica, Bucaramanga, Colombia. 27 p.
- Araque, O., R. E. Jaimez, W. Tezara, I. Coronel, R. Urich, and W. Espinoza. 2012. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Exp. Agric.* 48(4):513–522.
- Araújo, G. G. L. de. 2015. Impacts of climate change on water resources and animal production in semi-arid regions. *Rev. Bras. Geogr. Física.* 8(November 2018):598–609 Available online at: <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2019.01.015>.
- Arévalo-Gardini, E., C. O. Arévalo-Hernández, V. C. Baligar, and Z. L. He. 2017. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Sci. Total Environ.* 605–606(December):792–800.

- Aroca, R. 2012. *Plant responses to drought stress*. Aroca, R. (ed.) Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg. 466 p.
- Asensio, D., F. Rapparini, and J. Peñuelas. 2012. AM fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs. nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. *Phytochemistry*. 77:149–61 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22296838>; last accessed March 21, 2013.
- Atul-Nayyar, A., C. Hamel, K. Hanson, and J. Germida. 2009. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*. 19(4):239–46 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101737>; last accessed June 4, 2013.
- Audet, P., and C. Charest. 2008. Allocation plasticity and plant-metal partitioning: meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environ. Pollut.* 156(2):290–6 Available online at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974910800105X>; last accessed April 9, 2014.
- Audet, P., and C. Charest. 2007. Dynamics of arbuscular mycorrhizal symbiosis in heavy metal phytoremediation: meta-analytical and conceptual perspectives. *Environ. Pollut.* 147(3):609–14 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118259>; last accessed April 8, 2014.
- Augé, R. M. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil / plant water relations. *Can. J. Soil Sci.* (84):373–381.
- Augé, R. M. 2001. Water relations , drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11:3–42.
- Augé, R. M., J. L. Moore, K. Cho, J. C. Stutz, D. M. Sylvia, A. K. al-Agely, and A. M. Saxton. 2003. Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *J. Plant Physiol.* 160(10):1147–56 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610883>.
- Augé, R. M., H. D. Toler, J. L. Moore, K. Cho, and A. M. Saxton. 2007. Comparing contributions of soil versus root colonization to variations in stomatal behavior and soil drying in mycorrhizal *Sorghum bicolor* and *Cucurbita pepo*. *J. Plant Physiol.* 164(10):1289–99 Available online at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189660>; last accessed May 13, 2013.
- Augé, R. M., H. D. Toler, C. E. Sams, and G. Nasim. 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza*. 18(3):115–21 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228050>; last accessed June 5, 2013.
- Augstburger, F., J. Berger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz, and C. Streit. 2000. *Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico*.
- Azizian, A., S. Amin, M. Maftoun, Y. Emam, and M. Noshadi. 2013. Response of corn to cadmium and drought stress and its potential use for phytoremediation. *J. Agric. Sci. Technol.* 15(2):357–368.
- Bacelar, E., J. Moutinho-Pereira, B. Gonçalves, C. Brito, J. Gomes-Laranjo, H. Ferreira, and C. Correia. 2012. Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features. P. 1–466 in *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*, Aroca, R. (ed.). Springer Berlin Heidelberg.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, and Y. Shachar-hill. 2000. Update on Symbiosis Arbuscular Mycorrhizas. 124(November):949–957.
- Bahri, S. 2018. Viability and vigor of cocoa seed (*Theobroma cacao* L.) to some levels of water content and old period of save. *Int. J. if Agron. Agric. Res.* 13(2):157–167.
- Bai, Y., C. Kissoudis, Z. Yan, R. G. F. Visser, and G. van der Linden. 2018. Plant behaviour under combined stress: tomato responses to combined salinity and pathogen stress. *Plant J.* 93(4):781–793.
- Baker, N. R., and K. Hardwick. 1973. Biochemical and physiological aspects of leaves development in cocoa (*Theobroma cacao* L.): I. Deveopment of chlorophyll and photosynthetic activity. *New Phytol.* 72:1315–1324.
- Baker, N. R., K. Hardwick, and P. Jones. 1975. Biochemical and physiological aspects of leaves development in cocoa (*Theobroma cacao* L.): II. Development of chloroplast ultrastructure and carotenoids. *New Phytol.* 75:513–518.
- Barcelo, J., and C. Poschenrieder. 2002. Fast root growth responses , root exudates , and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ. Exp. Bot.* 48:75–92.

- Barea, J. M., J. Palenzuela, P. Cornejo, I. Sánchez-Castro, C. Navarro-Fernández, a. López-García, B. Estrada, R. Azcón, N. Ferrol, and C. Azcón-Aguilar. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *J. Arid Environ.* 75(12):1292–1301 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140196311001844>; last accessed March 25, 2013.
- Bécard, G., and J. A. Fortin. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108:211–218.
- Beg, M. S., S. Ahmad, K. Jan, and K. Bashir. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends Food Sci. Technol.* 66:108–116 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>.
- Bever, J. D., and J. B. Morton. 1999. Heritable variation and mechanisms of inheritance of spore shape within a population of *Scutellospora pellucida*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Am. J. Bot.* 86(9):1209–1216.
- Bonomelli, C., C. Bonilla, and A. Valenzuela. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 38(1):1179–1186.
- Borde, M., M. Dudhane, and P. Jite. 2011. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Prot.* 30(3):265–271 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219410003613>; last accessed April 7, 2013.
- Brachmann, and M. Parniske. 2006. The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS Biol.* 4(7):e239 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1489982&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed May 31, 2013.
- Bravo, A., M. Brands, V. Wewer, P. Dörmann, and M. J. Harrison. 2017. Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* 214(4):1631–1645.
- Brodribb, T. J., and R. S. Hill. 2000. Increases in Water Potential Gradient Reduce Xylem Conductivity in Whole Plants. Evidence from a Low-Pressure Conductivity Method. *Plant Physiol.* 123(July):1021–1027.

- Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154:275–304.
- Brunetti, P., L. Zanella, A. De Paolis, D. Di Litta, V. Cecchetti, G. Falasca, M. Barbieri, M. M. Altamura, P. Costantino, and M. Cardarelli. 2015. Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 66(13):3815–3829.
- Bucking, H., E. Liepold, and P. Ambilwade. 2012. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. P. 107–138 in *Plant Science*, In Tech. Available online at: <http://www.intechopen.com/books/plant-science/the-role-of-the-mycorrhizal-symbiosis-in-nutrient-uptake-of-plants-and-the-regulatory-mechanisms-und>.
- Byrne, C., S. D. Divekar, G. B. Storchan, D. a Parodi, and M. B. Martin. 2009. Cadmium--a metallo hormone? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238(3):266–71 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2709711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed April 10, 2014.
- CacaoNet. 2012. *A Global Strategy for the Conservation and Use of Cacao Genetic Resources, as the Foundation for a Sustainable Cocoa Economy*. Laliberté, B. (ed.) Montpellier, France. 186 p.
- Cadahia, C. 2005. *Fertirrigación en cultivos hortícolas, frutales y ornamentales*. 3rd ed. Mundiprensa (ed.) Madrid. 681 p.
- Caravaca, F., M. M. Alguacil, J. A. Hernández, and A. Roldán. 2005. Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. *Plant Sci.* 169(1):191–197 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016894520500107X>; last accessed June 4, 2013.
- Cárdenas, N. J. 2017. Efecto de la simbiosis de *Rhizophagus irregularis* con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora* (Butler)). Universidad Nacional de Colombia. 1-5 p. Available online at: <http://bdigital.unal.edu.co/62108/7/NéstorJ.CárdenasPardo.2017.pdf>.

- Carr, M. K. V., and G. Lockwood. 2011. the Water Relations and Irrigation Requirements of Cocoa (*Theobroma Cacao* L.): a Review. *Exp. Agric.* 47(04):653–676 Available online at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0014479711000421; last accessed September 17, 2013.
- Castilla, C. 2009. Cacao, caso Colombia. P. 51 in *Reunión de la Red de Investigación Desarrollo e Innovación de Cacao Cacao , Caucho , Palma , Forestales*, Available online at: http://www.procitropicos.org.br/portal/newbb/viewtopic.php?viewmode=flat&type=&topic_id=5&forum=10.
- Castro, A. V., A. A. F. de Almeida, C. P. Pirovani, G. S. M. Reis, N. M. Almeida, and P. A. O. Mangabeira. 2015. Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115:174–186 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003>.
- Castro, G., and M. Sosa. 2016. Comparative analysis of agroclimatological variables in Yopal. in *XII Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ingeniería Agrícola*.
- Ceballos, I., M. Ruiz, C. Fernández, R. Peña, A. Rodríguez, and I. R. Sanders. 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 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3737348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed March 22, 2014.
- 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. 171 p. Available online at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/54313/>.
- CEPLAC. 2012. *Manejo do cacaueiro clonado*. Bahia, Brasil. 83 p.
- Chagnon, P.-L. 2014. Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88(3):437–444 Available online at: <http://femsec.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/1574-6941.12321>.
- Chavez, E., Z. L. He, P. J. Stoffella, R. S. Mylavarapu, Y. C. Li, B. Moyano, and V. C.

- Baligar. 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Sci. Total Environ.* 533:205–214.
- Chen, B. D., X. L. Li, H. Q. Tao, P. Christie, and M. H. Wong. 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):839–46 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688500>.
- Chen, E. C. H., E. Morin, D. Beaudet, J. Noel, G. Yildirim, S. Ndikumana, P. Charron, et al. 2018. High intraspecific genome diversity in the model arbuscular mycorrhizal symbiont *Rhizophagus irregularis*. *New Phytol.* 220(4):1161–1171.
- Chen, X., J. Wang, Y. Shi, M. Q. Zhao, and G. Y. Chi. 2011. Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Bot. Stud.* (52):41–46.
- Chibuike, G. U., and A. J. Daymond. 2015. Mycorrhizae Inoculation Did Not Influence the Response of Cocoa Seedlings to Water Stress Department of Soil Science and Land Resources Management ,. *Am. J. Agric. Environ. Sci.* 15(5):944–956.
- Cho, K., H. Toler, J. Lee, B. Ownley, J. C. Stutz, J. L. Moore, and R. M. Augé. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *J. Plant Physiol.* 163(5):517–28 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473656>; last accessed May 19, 2013.
- Chulan, A., and P. Ragu. 1986. Growth response of *Theobroma cacao* L. seedlings to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi Planting of cocoa seedlings in polythene bags is a widely practised Growth response of plants looked more vigorous and had produced more leaves (*F. Plant Soil.* 285:279–285.
- Clemens, S., M. G. Palmgren, and P. A. Krämer. 2002. Long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7:309–315.
- Clough, Y., H. Faust, and T. Tschardt. 2009. Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conserv. Lett.* 2(5):197–205 Available online at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-263X.2009.00072.x>; last accessed April 12, 2014.
- 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. Available online at: <https://www.siac.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=668&conID=1293>.
- Corradi, N., and A. Brachmann. 2017. Fungal Mating in the Most Widespread Plant Symbionts? *Trends Plant Sci.* 22(2):175–183 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.010>.
- Croll, D., M. Giovannetti, A. M. Koch, C. Sbrana, M. Ehinger, P. J. Lammers, and I. R. Sanders. 2009. Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 181(4):924–37 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140939>.
- Croll, D., and I. R. Sanders. 2009. Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evol. Biol.* 9:13 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2630297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed December 10, 2014.
- Croll, D., L. Wille, H. Gamper, N. Mathimaran, P. J. Lammers, N. Corradi, and I. R. Sanders. 2008. Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal. *New Phytol.* 178:672–687 Available online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2008.02381.x/full>; last accessed April 21, 2015.
- Cryer, N., and P. Hadley. 2012. Cadmium Uptake and Partitioning within the Cocoa Plant. :19 Available online at: <http://www.icco.org/sites/sps/documents/CadmiumWorkshop/ReadingUniversity.pdf>.
- Cuenca, G., and E. Meneses. 1996. Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. *Plant Soil.* 183:315–322.
- Dalal, V. K., and B. C. Tripathy. 2018. Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. *Sci. Rep.* 8(1):10–16 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14419-4>.
- Davies, F. T., J. D. Puryear, R. J. Newton, J. N. Egilla, and J. A. S. Grossi. 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (

- Helianthus annuus). *J. Plant Physiol.* 786:777–786.
- Davis, R. D. 1984. Cadmium-a complex environmental problem. Part II: Cadmium in sludges used as fertilizer. *Experientia.* 40(15):117–126.
- Davison, J., M. Opik, T. Daniell, M. M., and M. Zobel. 2011. random assemblages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78:103–115.
- Deressa, T. G., and M. K. Schenk. 2008. Contribution of roots and hyphae to phosphorus uptake of mycorrhizal onion.pdf. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171(5):810–820.
- Dezhban, A., A. Shirvany, P. Attarod, M. Delshad, M. Matinizadeh, and M. Khoshnevis. 2015. Cadmium and lead effects on chlorophyll fluorescence, chlorophyll pigments and proline of Robinia pseudoacacia Cadmium and lead effects on chlorophyll fluorescence , chlorophyll pigments and proline of Robinia pseudoacacia. *J. For. Res.* 26(2):323–329.
- Dharma-wardana, M. W. C. 2018. Fertilizer usage and cadmium in soils, crops and food. *Environ. Geochem. Health.* 40(6):2739–2759.
- Domínguez, M. T., T. Marañón, J. Manuel, and S. Redondo-gómez. 2011. Chemosphere Response of Holm oak (*Quercus ilex* subsp . *ballota*) and mastic shrub (*Pistacia lentiscus* L .) seedlings to high concentrations of Cd and Tl in the rhizosphere. 83:1166–1174.
- Dostert, N., A. Cano, M. La Torre, and M. Weigend. 2012. Hoja botánica : Cacao. :20.
- Doubková, P., E. Vlasáková, and R. Sudová. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil.* 370(1–2):149–161 Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-013-1610-7>; last accessed May 29, 2013.
- Drake, J. E., S. A. Power, R. A. Duursma, B. E. Medlyn, M. J. Aspinwall, B. Choat, D. Creek, et al. 2017. Agricultural and Forest Meteorology Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis for four tree species under drought : A comparison of model formulations. *Agric. For. Meteorol.* 247(September):454–466 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.08.026>.
- Droh, G., A.-B. Kouassi, Z. C. G. Kouadjo, A. Zeze, A. S. Nguetta, and I. R. Sanders. 2016. Effect of two AMF on growth of cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) in greenhouses. *Glob. J. Adv. Res.* 3(3):157–164.

- Echeverry, A., and H. Reyes. 2016. Determinación de la concentración de cadmio en un chocolate colombiano con 65% de cacao y chocolates extranjeros con diferentes porcentajes de cacao. *Entre Cienc. e Ing.* (19):22–32.
- El-Kherbawy, M., J. S. Angle, A. Heggo, and R. L. Chaney. 1989. Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Soil Biol. Fertil. Soils.* 8:61–65.
- Ellen, T. P., and M. Costa. 2010. Carcinogenic Inorganic Chemicals. in *Comprehensive Toxicology*, McQueen, C.A. (ed.). Elsevier, Oxford, UK.
- Ellouzi, H., K. Ben Hamed, M. A. Asensi-Fabado, M. Müller, C. Abdelly, and S. Munné-Bosch. 2013. Drought and cadmium may be as effective as salinity in conferring subsequent salt stress tolerance in *Cakile maritima*. *Planta.* 237(5):1311–1323.
- Estrada-Luna, A. A., and F. T. Davies. 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. *J. Plant Physiol.* 160(9):1073–83 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593809>.
- European Commission. 2000. *Cadmium in fertilisers: Risks from cadmium accumulation in agricultural soils due to the use of fertilisers containing cadmium*. Copenhagen, Denmark. 96 p.
- European Commission. 2018. Cadmium in food. *Cadmium*. Available online at: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/cadmium_en; last accessed September 29, 2018.
- European Commission. 2013. Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. 9 p. Available online at: https://members.wto.org/crnattachments/2013/sps/EEC/13_3645_00_e.pdf.
- European Food Safety Authority. 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.* 10(1):1–37 Available online at: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- 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. *EFSA J.* 980:1–139.

Fachin, L. 2013. ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA CON RELACIONES ALOMÉTRICAS EN DOS ESPECIES DE FRUTALES : THEOBROMA CACAO L . (CACAO) Y THEOBROMA. (July 2017).

FAOSTAT. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online at: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Farooq, M., M. Hussain, and K. H. M. Siddique. 2012. Drought Stress in Plants: An Overview. P. 1–33 in *Plant Responses to Drought Stress*, Aroca, R. (ed.). Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.

Fedecacao. 2004. *Cacaocultura en el departamento de Cundinamarca*. 24 p.

Fedecacao. 2012. *Guía técnica para el manejo del cacao*. 5a edición. Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural, Bogotá, Colombia. 189 p.

Fedecacao. 2013. *Guía ambiental para el cultivo del cacao*. Rojas, F., and E. Sacristan (eds.) Fedecacao. 111 p.

Fedecacao. 2009. *Manejo del recurso genético para incrementar la producción del sistema cacao en Colombia*. Bogotá, Colom. 128 p.

Fernández-Lizarazo, J. C., and L. P. Moreno-Fonseca. 2016. Mechanisms for tolerance to water-deficit stress in plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Colomb.* 34(2):179 Available online at: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/55569>.

Fernández, J. C., W. Bohórquez, and A. Rodríguez. 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. *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas.* 10(2):367–380.

Ferrol, N., E. Tamayo, and P. Vargas. 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *J. Exp. Bot.* 67(22):6253–6565.

Filipič, M. 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat. Res.* 733(1–2):69–77 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945723>; last accessed April 14, 2014.

Fischerová, Z., P. Tlustoš, J. Száková, and K. Šichorová. 2006. A comparison of

- phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ. Pollut.* 144:93–100.
- Flexas, J., J. Galmes, M. Ribas-Carbo, and H. Medrano. 2005. The effects of water stress on plant respiration. P. 85–94 in *Plant Respiration*, Lambers, H. (ed.). Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Fusconi, A., O. Repetto, E. Bona, N. Massa, C. Gallo, E. Dumas-Gaudot, and G. Berta. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum*. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 58:252–260.
- Gadkar, V., R. David-schwartz, T. Kunik, and Y. Kapulnik. 2001. Update on Mycorrhizal Symbiosis Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition. 127(December):1493–1499.
- Gallego, J. 2018. Cacao for peace Activities for tackling the cadmiu in cacao issue in Colombia. P. 1–7 in *Cacao for Peace Program*, Cali, Colombia. Available online at: <https://es.slideshare.net/CIAT/cacao-for-peace-activities-for-tackling-the-cadmium-in-cacao-issue-in-colombia>.
- García Lozano, J., M. Romero Carrascal, and L. A. Ortiz. 2005. *Evaluación edafoclimática de las tierras del trópico bajo colombiano para el cultivo de cacao*. Mosquera. 74 p.
- García Lozano, J. 2014. Caracterización de las respuestas fisiológicas y bioquímicas en tres clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) sometidos a diferentes niveles de déficit hídrico. :166 Available online at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46575/>.
- Garg, N., S. Singh, and L. Kashyap. 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Heavy Metal Tolerance in Plants: An Insight into Physiological and Molecular Mechanisms. in *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Eco restoration*, Varma, A., R. Prasad, and N. Tuteja (eds.). Springer, Cham.
- Gateau-Rey, L., E. V. J. Tanner, B. Rapidel, J. P. Marelli, and S. Royaert. 2018. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. *PLoS One.* 13(7):1–17.
- Ge, W., Y. Q. Jiao, B. L. Sun, R. Qin, W. S. Jiang, and D. H. Liu. 2012. Cadmium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of poplar

- cultivars. *South African J. Bot.* 83:98–108 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629912001196>; last accessed April 14, 2014.
- van Genuchten, M. T. 1980. A Closed-form Equation for Predicting the Hydraulic Conductivity of Unsaturated Soils¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44(5):892 Available online at: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/44/5/SS0440050892>.
- Gholamhoseini, M., a. Ghalavand, a. Dolatabadian, E. Jamshidi, and a. Khodaei-Joghan. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, yield, nutrient uptake and irrigation water productivity of sunflowers grown under drought stress. *Agric. Water Manag.* 117:106–114 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378377412002922>; last accessed May 19, 2013.
- Gimenez, C., M. Gallardo, and R. B. Thompson. 2005. PLANT – WATER RELATIONS. P. 231–238 in *PLANT – WATER RELATIONS*,.
- Giovannetti, M., and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489–500.
- Glendinning, D. R. 1966. FURTHER DEVELOPMENTS IN THE BREEDING PROGRAMME AT THE COCOA RESEARCH INSTITUTE , TAFO. *Ghana J. Sci.* 6(1):52–62.
- Gobernación de Casanare, P. D. 2008. No Title Proyecto establecimiento de tres mil hectáreas de cacao clonado en zona rural de los municipios del norte de Casanare.
- Gockowski, J., and D. Sonwa. 2008. *Biodiversity and smallholder cocoa production systems in West Africa. STCP Working Paper Series 6 (Version January 2008)*. Accra, Ghana. 1-21 p.
- Goicoechea, N., S. Merino, and M. Sánchez-Díaz. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi can contribute to maintain antioxidant and carbon metabolism in nodules of *Anthyllis cytisoides* L. subjected to drought. *J. Plant Physiol.* 162(1):27–35 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700418>; last accessed February 28, 2013.
- 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. 179 p.

González, A. I. 2010. Determinación y validación de cadmio total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del departamento de Santander. Universidad Industrial de Santander. 172 p.

González Moreno, S., H. Perales Vela, and M. Salcedo Alvarez. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educ. Bioquímica*. 27(4):119–129.

Greco, M., A. Chiappetta, L. Bruno, and M. B. Bitonti. 2012. Effects of combined drought and heavy metal stresses on xylem structure hydraulic conductivity in red maple (*Acer rubrum* L .). *J. Exp. Bot.* 63(16):5957–5966.

Grobelak, A., J. Świątek, A. Murtaś, and M. Jaskulak. 2019. Cadmium-Induced Oxidative Stress in Plants, Cadmium Toxicity, and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation. P. 213–231 in *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*,.

Gururani, M. A., J. Venkatesh, and L. S. P. Tran. 2015. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol. Plant*. 8(9):1304–1320 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>.

Halary, S., S.-B. Malik, L. Lildhar, C. H. Slamovits, M. Hijri, and N. Corradi. 2011. Conserved meiotic machinery in *Glomus* spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biol. Evol.* 3:950–8 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3184777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed January 20, 2015.

Han, F. X. 2007. *Biogeochemistry of Trace Elements in Arid Environments*. Alloway, B.J., and J.T. Trevors (eds.) Springer Netherlands, Netherlands. 386 p.

Hashem, A., E. F. A. Allah, A. A. Alqarawi, A. A. Al, D. Egamberdieva, and S. Wirth. 2016a. Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L . by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. *Saudi J. Biol. Sci.* 23(2):272–281 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.002>.

Hashem, A., E. F. A. Allah, A. A. Alqarawi, and D. Egamberdieva. 2016b. Bioremediation of adverse impact of cadmium toxicity on *Cassia italica* Mill by arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* 23(1):39–47 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.007>.

- Hassan, S. E., M. Hijri, and M. St-Arnaud. 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *N. Biotechnol.* 30(6):780–7 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876814>; last accessed April 2, 2014.
- Hsu, Y. T., and C. H. Kao. 2008. Distinct roles of abscisic acid in rice seedlings during cadmium stress at high temperature. *Bot. Stud.* 49:335–342.
- Hu, J., S. Wu, F. Wu, H. M. Leung, X. Lin, and M. H. Wong. 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):1359–65 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011894>; last accessed March 23, 2014.
- Huamaní-Yupanqui, H. A., M. A. Huauya-Rojas, L. G. Mansilla-Minaya, N. Florida-Rofner, and G. M. Neira-Trujillo. 2012. Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) orgánico. *Acta agronómica.* 4:339–344.
- Hugalde, I. P., and H. F. Vila. 2014. Comportamiento isohídrico o anisohídrico en vides.... ¿Una controversia sin fin? *Rev. Investig.* 40(1):75–82.
- Hunt, R. 2013. *Basic growth analysis: Plant growth analysis for beginners.* Unwin Hyman Ltd., Londres.
- Hurtado, L. E. 2012. Evaluación de varias enmiendas para recuperación de suelos cacaoteros contaminados con cadmio (Cd) en condiciones de invernadero. Universidad técnica estatal de Quevedo.
- Hussain, A., S. Ali, M. Rizwan, M. Zia-ur-Rehman, T. Yasmeen, M. Tahir Hayat, I. Hussain, Q. Ali, and S. Makhdoom Hussain. 2019. Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity. P. 47–72 in *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*, Hasanuzzaman, M., M.N.V. Prasad, and M. Fujita (eds.). Elsevier Inc. Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00003-6>.
- Huybrechts, M., E. Keunen, A. Cuypers, J. Vangronsveld, C. Loix, and M. Gielen. 2017. Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Front. Plant Sci.* 8(October):1–19.
- ICCO. 2012. *ICCO Workshop on Cd.* 1-13 p.

- ICCO. 2013. Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World. Available online at: <http://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>.
- ICCO. 2015. Quarterly bulletin of ICCO statistics.
- Iegang, J. G. U., L. Q. I. Iwang, W. U. J. Iang, and D. O. L. Iu. 2007. Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars. *Acta Biol. cracoviensia*. 49(2):7–14.
- Ii, N. E. R., C. Trontin, L. Duan, J. R. Dinneny, P. Biology, and N. E. R. California. 2014. Beyond the Barrier: Communication in the Root through the Endodermis 1. *Plant Physiol*. 166:551–559.
- International Organization for Standardization. 1995. ISO 11466, "Soil Quality, Extraction of Trace Elements Soluble in Aqua Regia."
- INVIMA. 2017. *Programa nacional de vigilancia y control de cadmio en productos derivados del cacao (licor de cacao, chocolate de mesa, cocoa en polvo y chocolatina de leche)*. 22 p.
- IPCC. 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge University Press (ed.) 881 p. Available online at: [http://www.acrim.com/%5C/Reference Files/CLIMATECHANGE 2001 - The Scientific Basis.pdf](http://www.acrim.com/%5C/Reference%20Files/CLIMATECHANGE%202001%20-%20The%20Scientific%20Basis.pdf).
- Irfan, M., S. Hayat, A. Ahmad, and M. N. Alyemeni. 2013. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.* 20(1):1–10 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed April 1, 2014.
- Jaleel, C. A., R. Gopi, B. Sankar, M. Gomathinayagam, and R. Panneerselvam. 2008. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *C. R. Biol.* 331(1):42–7 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187121>; last accessed June 4, 2013.
- Janoušková, M., D. Pavlíková, T. Macek, and M. Vosátka. 2005. Influence of arbuscular mycorrhiza on the growth and cadmium uptake of tobacco with inserted metallothionein gene. *Appl. Soil Ecol.* 29(3):209–214 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139305000284>; last accessed April 14, 2014.

- Janousková, M., D. Pavlíková, and M. Vosátka. 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere*. 65(11):1959–65 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905176>; last accessed March 22, 2014.
- Jha, A., M. Kamalvanshi, A. Kumar, N. Chakravarty, A. Shukla, and S. K. Dhyani. 2014. The effects of arbuscular mycorrhizal inoculations and cotyledon removal on early seedling growth of *Pongamia Pinnata*. *Turk. J. Botany*. 38(3):526–535.
- Jiang, Y., W. Wang, Q. Xie, N. Liu, L. Liu, D. Wang, X. Zhang, et al. 2017. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science (80-)*. 356(6343):1172–1173.
- Jing, D., W. U. Fei-bo, and Z. Guo-ping. 2005. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J. Zhejiang Univ.* 6(10):974–980.
- Johnson, D. J., and W. K. Ferrell. 1983. Stomatal response to vapour pressure deficit and the effect of plant water stress. *Plant, Cell Environ.* 6:451–456.
- Johnson, N., J. Graham, and F. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism – parasitism continuum *. *New Phytol.* 135:575–585.
- Joseph, P. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238(3):272–9 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371617>; last accessed April 14, 2014.
- Judson, O. P., and B. B. Normark. 1996. Ancient asexual scandals. *Trends Ecol. Evol.* 11(2 SPEC. ISS.):41–46.
- Kabata-pendias, A., and H. Pendias. 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 403 p.
- Kaldorf, M., a. J. Kuhn, W. H. Schröder, U. Hildebrandt, and H. Bothe. 1999. Selective Element Deposits in Maize Colonized by a Heavy Metal Tolerance Conferring Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *J. Plant Physiol.* 154(5–6):718–728 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161799802508>; last accessed April 6, 2014.
- Kaznina, N. M., G. F. Laidinen, and A. F. Titov. 2006. The Effect of Cadmium on Shoot Apical Meristems of Barley. *Russ. J. Dev. Biol.* 37(6):371–374.

- Keymer, A., P. Pimprakar, V. Wewer, C. Huber, M. Brands, S. L. Bucerius, P. M. Delaux, et al. 2017. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *Elife*. 6:1–33.
- 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. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*. 137(1–2):19–32 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706106002540>; last accessed April 14, 2014.
- Kirkham, M. B. 2005. *Principles of Soil and Plant Water Relations*.
- Klironomos, J. N. 2016. Variation in Plant Response to Native and Exotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Ecology*. 84(9):2292–2301.
- Koch, A. M., G. Kuhn, P. Fontanillas, L. Fumagalli, J. Goudet, and I. R. Sanders. 2004. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(8):2369–74 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=356957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Koltai, H., and Y. Kapulnik. 2010. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. 2nd ed. Springer. 324 p.
- Konvalinkova, T., and J. Jansa. 2016. Lights Off for Arbuscular Mycorrhiza : On Its Symbiotic Functioning under Light Deprivation. *Front. Plant Sci.* 7:1–11.
- Kuhn, G., M. Hijri, and I. R. Sanders. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 414:745–748.
- Kumar Yadav, K., N. Gupta, A. Kumar, L. M. Reece, N. Singh, S. Rezanian, and S. Ahmad Khan. 2018. Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecol. Eng.* 120(June):274–298 Available online at: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.039>.
- Kyllo, D. a., V. Velez, and M. T. Tyree. 2003. Combined effects of arbuscular

- mycorrhizas and light on water uptake of the neotropical understory shrubs, Piper and Psychotria. *New Phytol.* 160(2):443–454 Available online at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-8137.2003.00896.x>; last accessed June 4, 2013.
- Läderach, P., a. Martinez-Valle, G. Schroth, and N. Castro. 2013. Predicting the future climatic suitability for cocoa farming of the world's leading producer countries, Ghana and Côte d'Ivoire. *Clim. Change.* 119(3–4):841–854 Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s10584-013-0774-8>; last accessed March 20, 2014.
- Lau, C., A. Jarvis, and J. Ramírez. 2013. *Agricultura Colombiana : Adaptación al Cambio Climático.* 1-4 p.
- Lee, E. H., J. K. Eo, K. H. Ka, and A. H. Eom. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their roles in ecosystems. *Mycobiology.* 41(3):121–125.
- Leung, H.-M., Z.-W. Wang, Z.-H. Ye, K.-L. Yung, X.-L. Peng, and K.-C. Cheung. 2013. Interactions Between Arbuscular Mycorrhizae and Plants in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere.* 23(5):549–563 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002016013600491>; last accessed March 20, 2014.
- Leung, H. M., F. Y. Wu, K. C. Cheung, Z. H. Ye, and M. H. Wong. 2010a. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate rock on heavy metal uptake and accumulation by an arsenic hyperaccumulator. *J. Hazard. Mater.* 181(1–3):497–507 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541316>; last accessed April 19, 2014.
- Leung, H. M., F. Y. Wu, K. C. Cheung, Z. H. Ye, and M. H. Wong. 2010b. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate amendment on arsenic uptake, accumulation and growth of *Pteris vittata* in As-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation.* 12(4):384–403 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734915>; last accessed April 19, 2014.
- Lewis, C., A. M. Lennon, G. Eudoxie, and P. Umaharan. 2018. Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Sci. Total Environ.* 640–641:696–703 Available online at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>.

- Li, R., M. Zhang, L. Chen, X. Kou, and A. Skorokhod. 2017. CMAQ simulation of atmospheric CO₂ concentration in East Asia: Comparison with GOSAT observations and ground measurements. *Atmos. Environ.* 160:176–185 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.03.056>.
- Lim, T. K. 2012. *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht. 208-251 p. Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2534-8>; last accessed March 27, 2014.
- Lin, Y.-F., and M. G. M. Aarts. 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 69(19):3187–206 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903262>; last accessed March 27, 2014.
- Lingua, G., C. Franchin, V. Todeschini, S. Castiglione, S. Biondi, B. Burlando, V. Parravicini, P. Torrigiani, and G. Berta. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ. Pollut.* 153(1):137–47 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888550>; last accessed March 24, 2014.
- Liu, C., R. Yu, and G. Shi. 2017. Effects of drought on the accumulation and redistribution of cadmium in peanuts at different developmental stages. *Arch. Agron. Soil Sci.* 63(8):1049–1057 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2016.1271120>.
- Liu, L.-Z., Z.-Q. Gong, Y.-L. Zhang, and P.-J. Li. 2011. Growth, Cadmium Accumulation and Physiology of Marigold (*Tagetes erecta* L.) as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere.* 21(3):319–327 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S100201601160132X>; last accessed April 9, 2014.
- López-Climent, M. F., V. Arbona, R. M. Pérez-Clemente, and A. Gómez- Cadenas. 2011. Effects of cadmium on gas exchange and phytohormone contents in citrus. *Biol. Plant.* 55:187–190.
- López-Ráez, J. A., M. J. Pozo, and J. M. García-garrido. 2011. Strigolactones : a cry for help in the rhizosphere. *Botany.* 89(July):513–522.
- Lozano, J. G., and L. P. M. Fonseca. 2016. Respuestas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. En etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agron.* 65(1):44–50.

- Lu, L., P. H. Brown, Y. Hu, H. Wang, H. Yang, J. M. Labavitch, D. Hou, et al. 2017. Uptake, sequestration and tolerance of cadmium at cellular levels in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. *J. Exp. Bot.* 68(9):2387–2398.
- Lux, A., M. Martinka, M. Vaculík, and P. J. White. 2011. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J. Exp. b.* 62(1):21–37.
- Maggio, a, M. Reddy, and R. Joly. 2000. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *Environ. Exp. Bot.* 44(1):31–38 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10927126>.
- Malcová, R., and M. Gryndler. 2003. Amelioration of Pb and Mn Toxicity to Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* by Maize Root Exudates.pdf. *Biol. Plant.* 47(2):297–299.
- Mann, S. S., A. W. Rate, and R. J. Gilkes. 2002. Cadmium accumulation in agricultural soils in western australia. *Water. Air. Soil Pollut.* 141:281–297.
- Mardukhi, B., F. Rejali, G. Daei, M. R. Ardakani, M. J. Malakouti, and M. Miransari. 2011. Arbuscular mycorrhizas enhance nutrient uptake in different wheat genotypes at high salinity levels under field and greenhouse conditions. *C. R. Biol.* 334(7):564–71 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784366>; last accessed March 6, 2013.
- Marschner, P. 2011. *Mineral Nutrition of higher plants*. third. Elsevier (ed.) 668 p. Available online at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>; last accessed July 28, 2013.
- Martínez-vilalta, J., and N. Garcia-forner. 2017. Water potential regulation , stomatal behaviour and hydraulic transport under drought : deconstructing the iso / anisohydric concept. *Plant, Cell Environ.* 40:962–976.
- Martínez, G. R., and C. Palacio. 2010. Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao frescos y fermentados mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. 98 p.
- Maruthi, B. B. S., S. V Dile, D. L. Han, F XMonts, and Y. Su. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Exp. Bot.* 54:131–141.

- Mclaughlin, M. 2016. Heavy metals in agriculture with a focus on cadmium. in *Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo XV*, Quito, Ecuador.
- Meier, S., F. Borie, N. Bolan, and P. Cornejo. 2012. Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42(7):741–775.
- Melgarejo, L. M., ed. 2010. *Experimentos en fisiología vegetal*. 277 p.
- Mendoza-Cózatl, D. G., T. O. Jobe, F. Hauser, and J. I. Schroeder. 2011. Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(5):554–62 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed April 14, 2014.
- Miransari, M. 2011. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol. Adv.* 29(6):645–53 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557996>; last accessed April 9, 2014.
- Miransari, M., H. A. Bahrami, F. Rejali, and M. J. Malakouti. 2008. Using arbuscular mycorrhiza to alleviate the stress of soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. *Soil Biol. Biochem.* 40(5):1197–1206 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071707004944>; last accessed May 19, 2013.
- Miransari, M., H. A. Bahrami, F. Rejali, M. J. Malakouti, and H. Torabi. 2007. Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressful effects of soil compaction on corn (*Zea mays* L.) growth. *Soil Biol. Biochem.* 39(8):2014–2026 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071707001071>; last accessed May 19, 2013.
- Mishra, V., and K. A. Cherkauer. 2010. Agricultural and Forest Meteorology Retrospective droughts in the crop growing season : Implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States. *Agric. For. Meteorol.* 150(7–8):1030–1045 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2010.04.002>.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, and M. Gollery. 2004. Reactive oxygen gene net work of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490–498.

- Mohammadi, K., S. Khalesro, Y. Sohrabi, and G. Heidari. 2011. A Review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 1(9):310–319.
- Moral, R. G., I. Palacios, J. N. Gomez, and J. Mataix. 1994. Distribution and accumulation of heavy metals (Cd, Ni, and Cr) in tomato plants. *Distrib. Accumul. heavy Met. (Cd, Ni, Cr) tomato plants.* 3:395–399.
- Motamayor, J. C., P. Lachenaud, J. W. da Silva E Mota, R. Loor, D. N. Kuhn, J. S. Brown, and R. J. Schnell. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One.* 3(10):e3311 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2551746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed September 17, 2013.
- Müller, M. W., and R. R. Valle. 2012. Ecofisiologia do cultivo do cacauzeiro. P. 17–41 in *Ciência, tecnologia e manejo do cacauzeiro*, Valle, R.R. (ed.). Gráfica e Editora Vital Ltda, Itabuna - Bahia, Brasil.
- Munkvold, L., R. Kjølner, M. Vestberg, S. Rosendahl, and I. Jakobsen. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164(2):357–364 Available online at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>.
- Murata, N., S. I. Allakhverdiev, and Y. Nishiyama. 2012. The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1817(8):1127–1133 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.020>.
- Murtaza, G., F. Rasool, R. Habib, T. Javed, K. Sardar, M. Mohsin, M. A. Ayub, and A. Rasool. 2016. A Review of Morphological , Physiological and Biochemical Responses of Plants under Drought Stress Conditions. *Imp. J. Interdiscip. Res.* 2(12):1600–1606.
- Nadimi, M., L. Daubois, and M. Hijri. 2016. Mitochondrial comparative genomics and phylogenetic signal assessment of mtDNA among arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Phylogenet. Evol.* 98:74–83 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.01.009>.

- Navarro García, A., S. Del Pilar Bañón Árias, A. Morte, and M. J. Sánchez-Blanco. 2011. Effects of nursery preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. *Mycorrhiza*. 21(1):53–64 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405149>; last accessed May 27, 2013.
- 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. *For. Ecol. Manage.* 260(10):1623–1639 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378112710004743>; last accessed September 16, 2013.
- Nilsen, E. T., and D. M. Orcutt. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. 1st ed. John Wiley, New York, NY. 689 p.
- Niyogi, K. K. 1999. PHOTOPROTECTION REVISITED: *Genetic and Molecular Approaches*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50(1):333–359 Available online at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.50.1.333>.
- Nordic Council of Ministers. 2003. *Cadmium Review*. 26 p.
- Odigie, E. E., and E. I. Eziashi. 2013. Anatomy of Arbuscular Mycorrhiza Fungus (AMF) *Acaulospora scrobiculatu* on Roots of the Shea tree *Vitellaria paradoxa* in Nigeria. *J. Agric. Food Sci.* 1(July):123–127.
- Olaiya, A. O. 2016. Growth and Development of Cacao Seedlings in the Nursery As Influenced By Pod Maturity and Retaining Period After Harvesting. *Niger. J. Ecol.* 1(February):19–23.
- Omirou, M., I. M. Ioannides, and C. Ehaliotis. 2013. Mycorrhizal inoculation affects arbuscular mycorrhizal diversity in watermelon roots, but leads to improved colonization and plant response under water stress only. *Appl. Soil Ecol.* 63:112–119 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139312002363>; last accessed May 19, 2013.
- Oono, Y., T. Yazawa, Y. Kawahara, H. Kanamori, F. Kobayashi, H. Sasaki, S. Mori, et al. 2014. Genome-wide transcriptome analysis reveals that cadmium stress signaling controls the expression of genes in drought stress signal pathways in rice. *PLoS One*. 9(5).
- Öpik, M., and M. Moora. 2012. Commentary Missing nodes and links in mycorrhizal

- networks. *New Phytol.* 194:304–306.
- Ordoñez, Y. M. 2016. Dinámica de la comunidad de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares después de inocular *Rhizophagus irregularis* en un sistema agrícola en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. 264 p. Available online at: <http://bdigital.unal.edu.co/54900/1/yulimarcelaordoñezcastañeda.2016.pdf>.
- Orrell, P., and A. E. Bennett. 2013. How can we exploit above-belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? *Front. Plant Sci.* 4(October):432 Available online at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3812866&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>; last accessed May 24, 2014.
- Ouziad, F., U. Hildebrandt, E. Schmelzer, and H. Bothe. 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162:634–649.
- Özyiğit, I. I., and Ş. Akinci. 2009. Effects of some stress factors (aluminum, cadmium and drought) on stomata of roman nettle (*Urtica pilulifera* L.). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 37(1):108–115.
- Page, A. L., C. Chang, and M. El-Amamy. 1987. Cadmium Levels in Soils and Crops in the United States. in *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*,.
- Palencia, G. E., R. Gómez, and L. A. Mejía. 2007. *Patrones de cacao*. Bucaramanga, Colombia. 24 p.
- Palencia, G. E., and L. A. Mejía. 2004. *Injertación temprana en la producción masiva de clones de cacao*. Corpoica, Bucaramanga, Colombia. 39 p.
- Pandey, P., V. Irulappan, M. V. Bagavathiannan, and M. Senthil-Kumar. 2017. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Front. Plant Sci.* 8(April):1–15 Available online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00537/full>.
- Parry, C., J. M. Blonquist, and B. Bugbee. 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. P. 2508–2520 in *Plant Cell and Environment*,.

- Paschalidis, C., V. Kavvadias, S. Dimitrakopoulou, and A. Koriki. 2013. Accumulation in Cabbag Effects of Cadmium and Lead on Growth , Yield , and Metale. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 44(1–4):632–644.
- Paunov, M., L. Koleva, A. Vassilev, and J. Vangronsveld. 2018. Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 19:787–800.
- Pawlowska, T. E., and J. W. Taylor. 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. 427(February):733–737.
- Pereira, M. P., F. F. Corrêa, and E. M. De Castro. 2017. Leaf ontogeny of *Schinus molle* L . plants under cadmium contamination: the meristematic origin of leaf structural changes. *Protoplasma.* 254(6):2117–2126.
- Pérez-Harguindeguy, N., S. Diaz, E. Garnier, S. Lavorel, H. Poorter, P. Jaureguiberry, M. S. S. Bret-Harte, et al. 2013. New Handbook for standardized measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 61(34):167–234 Available online at: http://www.uv.es/jgpausas/papers/PerezHarguindeguy-2013-AJB_traits-handbook2.pdf.
- Peterson, C. A., and D. E. Enstone. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. *Physiol. plan.* 97:592–598.
- Phillips-mora, W., A. Arciniegas-leal, A. Mata-quirós, and J. C. Motamayor-arias. 2012. *Catálogo Catálogo seleccionados por el catie para siembras comerciales*. 1st ed. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 68 p.
- Pinheiro, C., and M. M. Chaves. 2011. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *J. Exp. Bot.* 62(3):869–882.
- Pipitone, L. 2012. Impact of EU legislation on cadmium on EU cocoa trade. P. 1–8 in *World Cocoa Conference 2012*, Costa de Mar.
- Pirovani, C. P., V. C. Baligar, P. A. O. Mangabeira, R. Pereira de Araújo, J. Olimpio Souza, A.-A. Furtado de Almeida, L. Silva Pereira, and D. Ahnert. 2017. Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144(January):148–157 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>.
- Porcel, R., J. M. Barea, and J. M. Ruiz-Lozano. 2003. Antioxidant activities in

- mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytol.* 157(1):135–143 Available online at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-8137.2003.00658.x>.
- Porcel, R., and J. M. Ruiz-Lozano. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J. Exp. Bot.* 55(403):1743–50 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208335>; last accessed June 4, 2013.
- Premachandra, G. S., and R. J. Joly. 1992. Solutes Contributing to Osmotic Potential in Young versus Mature Leaves of Cacao Seedlings. *J. Plant Physiol.* 139(3):355–360 Available online at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80350-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80350-0).
- Purin, S., and M. C. Rillig. 2008. Parasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: Reviewing the evidence. *FEMS Microbiol. Lett.* 279(1):8–14.
- Rada, F., R. E. Jaimez, C. García Núñez, A. Azócar, and M. E. Ramírez. 2005. Relaciones hídricas e intercambio de gases en *Theobroma cacao* var. Guasare bajo períodos de déficit hídrico Resumen Introducción. *Rev. la Fac. Agron. LUZ.* 22:112–120.
- Rajkumar, M., M. N. V. Prasad, S. Swaminathan, and H. Freitas. 2013. Climate change driven plant-metal-microbe interactions. *Environ. Int.* 53:74–86 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347948>; last accessed March 28, 2014.
- Rajkumar, M., S. Sandhya, M. N. V Prasad, and H. Freitas. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30(6):1562–74 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580219>; last accessed March 28, 2014.
- Ramtahal, G., I. C. Yen, I. Bekele, F. Bekele, L. Wilson, K. Maharaj, and L. Harrynanan. 2016. Relationships between Cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago. *Food Nutr. Sci.* 07(01):37–43 Available online at: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/fns.2016.71005>.
- Rao, Z. X., D. Y. Huang, J. S. Wu, Q. H. Zhu, H. H. Zhu, C. Xu, J. Xiong, H. Wang, and M. M. Duan. 2018. Distribution and availability of cadmium in profile and aggregates of a paddy soil with 30-year fertilization and its impact on Cd accumulation in rice plant. *Environ. Pollut.* 239:198–204 Available online at:

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.024>.

- Rasmussen, S. R., W. Füchtbauer, M. Novero, V. Volpe, N. Malkov, and A. Genre. 2016. Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitooligosaccharide receptor. *Sci. Rep.* (July):1–12.
- Reddy, A. R., K. V. Chaitanya, and M. Vivekanandan. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161(11):1189–1202.
- Redecker, D. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* (80-.). 289(5486):1920–1921 Available online at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5486.1920>; last accessed October 21, 2014.
- Redecker, D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* :67–73.
- Redon, P.-O., T. Béguiristain, and C. Leyval. 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):187–95 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169716>; last accessed April 8, 2014.
- Rini, M. V., A. Hashim, M. Idris, and Z. Abidin. 1996. The Effectiveness of Two Arbuscular Mycorrhiza Species on Growth of Cocoa. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 19(2/3):197–204.
- Rivera-Becerril, F., C. Calantzis, K. Turnau, J.-P. Caussanel, A. a Belimov, S. Gianinazzi, R. J. Strasser, and V. Gianinazzi-Pearson. 2002. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J. Exp. Bot.* 53(371):1177–85 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971928>.
- Roberts, D., M. Nachtegaal, and D. L. Sparks. 2005. Speciation of Metals in Soils. P. 619–654 in *Soil Science of America Book Series*.
- Robson, T. C., C. B. Braungardt, J. Rieuwerts, and P. Worsfold. 2014. Cadmium contamination of agricultural soils and crops resulting from sphalerite weathering. *Environ. Pollut.* 184:283–289 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.001>.

- Rodríguez, H. S. 2017. Dinámica del cadmio en suelos con niveles altos del elemento, en zonas productoras de cacao de Nilo y Yacopí, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. 133 p. Available online at: <http://bdigital.unal.edu.co/62280/352/1019048469.2017.pdf>.
- Ropars, J., K. S. Toro, J. Noel, A. Pelin, P. Charron, L. Farinelli, T. Marton, et al. 2016. Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat. Microbiol.* (March):16033 Available online at: <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol201633>.
- Rucker, R. 2009. Nutritional Properties of Cocoa. :943–946.
- Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 13(6):309–17 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690537>; last accessed May 28, 2013.
- Ruiz-Lozano, M., R. Porcel, and R. Aroca. 2006. Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytol.* 171(4):693–698.
- Ryan, M. H., A. F. Van Herwaarden, J. F. Angus, and J. a. Kirkegaard. 2005. Reduced growth of autumn-sown wheat in a low-P soil is associated with high colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 270(1):275–286 Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-004-1611-7>; last accessed April 23, 2014.
- Sánchez Viveros, G., R. Carrillo González, A. Martínez Garza, and M. C. González. 2004. Tolerancia adaptativa de hongos micorrízicos arbusculares al crecer en sustratos contaminados con As y Cu. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 20(4):147–158.
- Sanders, I. R. 2010. “Designer” mycorrhizas?: Using natural genetic variation in AM fungi to increase plant growth. *ISME J.* 4(9):1081–3 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613789>; last accessed April 23, 2014.
- Sanders, I. R., and D. Croll. 2010. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annu. Rev. Genet.* 44:271–92 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20822441>; last accessed April 6, 2014.
- Sardans, J., J. Peñuelas, and R. Ogaya. 2007. Drought’s impact on Ca, Fe, Mg, Mo and S concentration and accumulation patterns in the plants and soil of a Mediterranean evergreen *Quercus ilex* forest. *Biogeochemistry*. 87(1):49–69

Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s10533-007-9167-2>; last accessed June 4, 2013.

- Saxton, K. E., and W. J. Rawls. 2006. Soil Water Characteristic Estimates by Texture and Organic Matter for Hydrologic Solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70(5):1569
Available online at: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/70/5/1569>.
- Sayed, O. H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica.* 41(3):321–330.
- Schmidt, B., S. Gaşpar, D. Camen, I. Ciobanu, and R. Umălan. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi in terms of symbiosis-parasitism continuum. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 76(4):653–659.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum , the Glomeromycota : phylogeny and evolution *. 105(December):1413–1421.
- Seckbach, J., and M. Grube. 2010. *Symbioses and Stress*. Springer. 422 p.
- Seregin, I. V., and V. B. Ivanov. 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. 48(4):523–544.
- Shah, K., S. Nahakpam, V. Chaturvedi, and P. Singh. 2019. Cadmium-Induced Anatomical Abnormalities in Plants. P. 111–139 in *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*, Elsevier Inc. Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00005-X>.
- Shanying, H. E., Y. Xiaoe, Z. He, and V. C. Baligar. 2017. Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity : A Review. *Pedosph. An Int. J.* 27(3):421–438 Available online at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4).
- Sharma, N., K. Yadav, and A. Aggarwal. 2017. Role of potassium and arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of water stress on *Vigna mungo*. *Environ. Exp. Bot.* 15:15–24.
- Sharma, R. K., and G. Archana. 2016. Cadmium minimization in food crops by cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria. *Appl. Soil Ecol.* 107:66–78 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.009>.
- She, W., Y.-C. Jie, H.-C. Xing, Y.-W. Lu, M. Huang, W.-L. Kang, and D. Wang. 2011. Tolerance to Cadmium in Ramie (*Boehmeria nivea*) Genotypes and Its Evaluation

- Indicators. *Acta Agron. Sin.* 37(2):348–353 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875278011600102>; last accessed April 14, 2014.
- Shi, G., S. Xia, J. Ye, Y. Huang, C. Liu, and Z. Zhang. 2015. PEG-simulated drought stress decreases cadmium accumulation in castor bean by altering root morphology. *Environ. Exp. Bot.* 111:127–134 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.008>.
- Shiri, M., M. Rabhi, A. El Amrani, and C. Abdelly. 2015. Cross-tolerance to abiotic stresses in halophytes: application for phytoremediation of organic pollutants. *Acta Physiol. Plant.* 37(10):1–14.
- Siedlecka A, K. Z. 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 34(6):833–841.
- Sieh, D., M. Watanabe, E. A. Devers, F. Brueckner, R. Hoefgen, and F. Krajinski. 2013. The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 197(2):606–616.
- Siliang, L., Y. Wenhao, Y. Tingting, C. Yan, and N. Wuzhong. 2015. Effects of Cadmium Stress on Leaf Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis of *Elsholtzia argyi* — A Cadmium Accumulating Plant Effects of Cadmium Stress on Leaf Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis of *Elsholtzia argyi* — A Cadmium Accumulating Pla. *Int. J. Phytoremediation.* 17(1):37–41.
- Simonneau, T., and L. Urban. 2010. An overview of models of stomatal conductance at the. *Plant, cell Environ.* 33:1419–1438.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. in *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, Smirnoff, V. (ed.). BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Smith, F. A., and S. E. Smith. 2013. How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant Soil.* 363(1–2):7–18.
- Smith, F. W. 2002. The phosphate uptake mechanism. *Plant Soil.* 245:105–114.
- Smith, S. E., I. Jakobsen, M. Gronlund, and F. A. Smith. 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 Physiol.* 156(3):1050–1057 Available online at:
<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.174581>.
- Smith, S. E., and F. A. Smith. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:227–50 Available online at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21391813>; last accessed September 17, 2013.
- Smith, S., and D. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Song, Y., L. Jin, and X. Wang. 2017. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int. J. Phytoremediation.* 19(2):133–141 Available online at:
<http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>.
- Sonwa, D. J., and S. F. Weise. 2008. *Diversifying and intensifying the cocoa agroforest landscape: review and strategic approaches for managing the shade matrix in West and Central Africa STCP Working Paper Series 4 (Version January 2008)*. Accra, Ghana. 1-60 p.
- Stanisljevic, J. 2018. Could we facing a “chocapocalypse”? *BBC Cap.* Available online at:
<http://www.bbc.com/capital/story/20180926-could-we-be-facing-a-chocapocalypse>; last accessed September 29, 2018.
- Stirbet, A., and Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 104(1–2):236–257.
- Stockinger, H., C. Walker, and A. Schüßler. 2009. “Glomus intraradices DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not Glomus intraradices. *New Phytol.* 183(4):1176–1187.
- Stoltz, E., and M. Greger. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 47(3):271–280.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. P. 443–480 in

- Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation*, Available online at: [http://www.hansatech-instruments.com/docs/the fluorescence transient.pdf](http://www.hansatech-instruments.com/docs/the%20fluorescence%20transient.pdf).
- Strasser, R. J., M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava. 2004. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. P. 1–47 in *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 19.*, Papageorgiou, G.C., and Govindjee (eds.). Springer, Dordrecht.
- Strullu-Derrien, C., M. A. Selosse, P. Kenrick, and F. M. Martin. 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytol.* 220(4):1012–1030.
- Sun, J., J. Cui, C. Luo, L. Gao, Y. Chen, and Z. Shen. 2013. Contribution of cell walls, nonprotein thiols, and organic acids to cadmium resistance in two cabbage varieties. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64(2):243–252.
- Suzuki, N., R. M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwald, and R. Mittler. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* 203(1):32–43 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720847>.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 782 p. Available online at: <http://www.amazon.com/dp/0878938567>.
- Tardieu, F., C. Granier, and B. Muller. 2011. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(3):283–289.
- Tezara, W., R. Urich, R. Jaimez, I. Coronel, O. Araque, C. Azócar, and I. Chacón. 2016. Does griollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as forastero? *Bot. Sci.* 94(3):563–574.
- Tisserant, E., M. Malbreil, A. Kuo, A. Kohler, A. Symeonidi, R. Balestrini, P. Charron, et al. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(50):20117–22 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277808>; last accessed May 25, 2014.
- Tokalioğlu, Ş., Ş. Kartal, and L. Elçi. 2000. Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta.* 413(1–2):33–40.
- Di Toppi, L. S., and R. Gabbriellini. 1999. Response to cadmium in higher plants.

- Environ. Exp. Bot.* 41(2):105–130.
- Tsimilli-Michael, M., and R. Strasser. 2008. In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. P. 679–703 in *Mycorrhiza*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ultra, V. U., S. Tanaka, K. Sakurai, and K. Iwasaki. 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 Soil.* 290(1–2):29–41 Available online at: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-006-9087-2>; last accessed April 19, 2014.
- United Nations. 2010. *Final review of scientific information on cadmium*. 324 p.
- Vierheilig, H., A. P. Coughlan, U. Wyss, and Y. Piché. 1998a. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):5004–5007.
- Vierheilig, H., A. P. Coughlan, U. Wyss, and Y. Piché. 1998b. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):5004–5007.
- Wang, F. Y., X. G. Lin, and R. Yin. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia (Jena)*. 51(2):99–109 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031405607000182>; last accessed April 14, 2014.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo, and A. Gomez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theor. Appl. Genet.* 96:621–627.
- Wright, S. F., and A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 198(1):97–107.
- Wu, F., G. Zhang, and P. Dominy. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50:67–78.

- Wu, Q.-S., and R.-X. Xia. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J. Plant Physiol.* 163(4):417–25 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455355>; last accessed May 19, 2013.
- Wu, Q. S., A. K. Srivastava, and Y. N. Zou. 2013. AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: A review. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 164:77–87 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.010>.
- Wu, Q., and Y. Zou. 2017. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Drought Stress in Plants. P. 25–41 in *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*,.
- Wyss, T., F. G. Masclaux, P. Rosikiewicz, M. Pagni, and I. R. Sanders. 2016. Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *ISME J.* :1–13 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26953600>.
- Xia, S., X. Wang, G. Su, and G. Shi. 2015. Effects of drought on cadmium accumulation in peanuts grown in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(23):18707–18717.
- Yang, Y., Y. Chen, and W. Li. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi infection in desert riparian forest and its environmental implications: A case study in the lower reach of Tarim River. *Prog. Nat. Sci.* 18(8):983–991 Available online at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108001779>; last accessed May 19, 2013.
- Yanus, R. L., H. Sela, E. J. C. Borojovich, Y. Zakon, M. Saphier, A. Nikolski, E. Gutflais, A. Lorber, and Z. Karpas. 2014. Trace elements in cocoa solids and chocolate: an ICPMS study. *Talanta*. 119:1–4 Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401377>; last accessed April 14, 2014.
- Yee, M.-C., D. Livingstone, C. D. Bustamante, E. Strandberg, P. Umaharan, N. R. Tawari, K. Mockaitis, et al. 2018. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Commun. Biol.* 1(1):1–12 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0168-6>.
- Ying, R., R. Qiu, Y. Tang, P. Hu, H. Qiu, H. Chen, T. Shi, and J. Morel. 2010. Cadmium

tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn / Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. *Jl Plant Physiol.* 167(2):81–87 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.005>.

Yooyongwech, S., T. Samphumphuang, R. Tisarum, C. Theerawitaya, and S. Cha-Um. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved water deficit tolerance in two different sweet potato genotypes involves osmotic adjustments via soluble sugar and free proline. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 198:107–117 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.002>.

Yoshida, T., J. Mogami, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2014. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21:133–139 Available online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>.

Zhang, D., A. Figueira, L. Motilal, P. Lachenaud, and L. W. Meinhardt. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Kole, C. (ed.). Available online at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-21201-7>; last accessed September 17, 2013.

Živčák, M., M. Brestič, K. Olšovská, and P. Slamka. 2008. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil Environ.* 54:133–139.

Zlatev, Z. S., and I. T. Yordanov. 2005. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. 30:3–18.