



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS  
FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES  
(HFMA) SOBRE UN SISTEMA SUELO-PLANTA DE  
CACAO EN SUELOS CONTAMINADOS CON CADMIO EN  
ETAPA DE VIVERO**

**Diana Milena Jácome Molina**

**Alia Rodriguez Villate**

**Directora**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2017

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS  
FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES  
(HFMA) SOBRE UN SISTEMA SUELO-PLANTA DE  
CACAO EN SUELOS CONTAMINADOS CON CADMIO EN  
ETAPA DE VIVERO**

**Diana Milena Jácome Molina**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias**

Directora:

Ph.D. Alia Rodriguez Villate

Línea de Investigación:

Suelos y Aguas

Grupo de Investigación:

Microbiología Agrícola –Biotecnología de las Micorrizas Arbusculares en Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2017

*“La ciencia es como la tierra, sólo se puede poseer un poco de ella”.*

**Voltaire** (1694-1778, escritor y pensador francés)



## **Agradecimientos**

A la profesora Alia Rodríguez por su dedicación y guía durante la ejecución de la tesis, su implementación, conceptualización y descripción de resultados. Por creer en el proyecto y los resultados obtenidos. Por su paciencia y buena disposición, sin las cuales no hubiese sido posible finalizar este trabajo a pesar de todas las dificultades encontradas, por ser un ejemplo de perseverancia y dedicación al trabajo científico en fin, por ser esencial en mi proceso de formación en los últimos años.

A Cristhian Fernández por su apoyo en toda la logística del ensayo, en la revisión y análisis de datos obtenidos como resultado de la experimentación, por su acompañamiento en todo el proceso y sus grandes aportes conceptuales y prácticos, por sus largas horas de dedicación y por ser, sin duda, un amigo en todo este proceso.

A los estudiantes de Utopía de Ingeniería Agronómica de primer y segundo año en 2015 que ayudaron incansablemente en la construcción del vivero para el establecimiento del ensayo.

A los estudiantes del grupo de investigación de agricultura tropical, CIAT de la Universidad de La Salle, sede Utopía en el año 2015, que apoyaron el proyecto tanto en su implementación como en su mantenimiento, en los muestreos y en la toma de mediciones.

A los hermanos de Utopía y a Ricardo Bueno por su disposición y por permitirme hacer uso de las instalaciones y equipos de la sede Utopía para la realización del proyecto.

A Miguel Cruz, responsable del laboratorio de Suelos de la sede Utopía de la Universidad de La Salle, por permitirme trabajar libremente en el laboratorio de suelos.

A Claudia Marín por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi maestría, tanto en la parte emocional y laboral, como en su complicidad en cuanto a requerimientos específicos para hacer posible la realización de algunos ensayos y procedimientos de laboratorio.

VI Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) sobre un sistema suelo-planta en suelos contaminados con cadmio en etapa de vivero

---

A mis compañeros del grupo de Biotecnología de las micorrizas de la Universidad Nacional, por todo el apoyo, por creer en el proyecto y generar grandes aportes al abordaje de los resultados del ensayo.

A mis padres y mis hermanos por creer en mi, apoyarme y ser un soporte emocional en todo este proceso y en cada momento de mi vida.

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

Gracias

## Resumen

La presente investigación estudia la dinámica del cadmio (Cd) en el trópico ácido en presencia de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) cuando se tienen suelos con concentraciones del metal, destinados para cultivo de cacao. Para lograr este objetivo se examina la distribución del Cd en las fracciones del suelo y en los diferentes órganos de la planta. Se concluye que, principalmente, a altas concentraciones del metal en el suelo, cuando la fuente del mismo es antrópica, el hongo puede modificar la dinámica del mismo, su disponibilidad en el tiempo.

Adicionalmente, por medio del análisis de parámetros fisiológicos y de producción de biomasa sobre las plantas se encuentra que dependiendo del nivel de cadmio y para las concentraciones más altas del metal, el hongo tiene un efecto benéfico sobre el funcionamiento del aparato fotosintético, permitiendo a las plantas una ventaja sobre las plantas no inoculadas contra los efectos tóxicos del metal pesado.

Se estudió adicionalmente la capacidad de absorción, translocación y fitoextracción de las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas, de lo que se concluye que para concentraciones altas de cadmio en el suelo la Eficiencia de Absorción ( $E_{abs}$ ) es mayor en plantas inoculadas, al igual que la Eficiencia de translocación ( $E_{transl}$ ) del metal, mientras que la Eficiencia de la fitoextracción ( $E_{fitoext}$ ) tiende a disminuir.

**Palabras clave:** Cacao, cadmio, Eficiencia absorción, Eficiencia translocación, Eficiencia fitoextracción, fracción del suelo, antrópico

## Abstract

This research studies the dynamics of cadmium in a tropical acidic soil when it is contaminated with different metal concentration and in the presence of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF), in cocoa cropping. In order to achieve this goal we've looked for cadmium distribution in different soils fractions and in different plant organs, concluding that, at high soil cadmium concentration, when the origin of cadmium contamination is antropogenic, the AMF can modify the metal dynamics, changing its bioavailability along.

Additionally, the physiological parameters and biomass plants production depended on the cadmium level. For the higher soil cadmium concentrations, the AMF exerted a beneficial effects, on the photosynthetic apparatus performance, giving inoculated plants an advantage over the non-inoculated plants against the toxic heavy metal's effects.

The uptake, translocation and fitoextraction plant's ability was calculated for inoculated plants compared to non-inoculated plants. We concluded that at high soil cadmium concentration, the E uptake is better in inoculated plants, the same was observed for E translocation, while an opposite effect was observed for E fitoextraction.

**Key words:** Cocoa, cadmium, Uptake efficiency, Translocation Efficiency, Fitoextraction efficiency, soils fractionation, antropogenic

# Contenido

Contenido

<b>2. Marco teórico</b> .....	
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>27</b>
3.1. Vivero y diseño experimental .....	27
3.1.1. Acondicionamiento de vivero y manejo de residuos .....	27
3.1.2. Preparación del sustrato .....	28
3.5.2 Determinación de peso seco del material vegetal .....	34
3.5.3 Secado de muestras de sustrato y tamizaje .....	35
3.5.4 Determinación de pH .....	35
3.5.5 Determinación de cadmio en material vegetal .....	35
3.5.6 Determinación de cadmio total en suelo .....	37
3.5.7 Fraccionamiento de cadmio en suelo .....	37
3.6 Análisis estadístico .....	38
<b>4. Resultados</b> .....	<b>40</b>
4.1. Concentración de cadmio en el suelo .....	40
4.2. Concentración del cadmio en la planta y sus órganos .....	45
4.2.1. Eficiencia de la absorción .....	48
4.2.2. Eficiencia de la translocación .....	49
4.2.3. Eficiencia de la fitoextracción .....	50
4.2.4. Parámetros fisiológicos: fluorescencia Indicadores de estrés .....	51
4.3. Colonización micorrícica .....	55
4.4. Otras variables medidas: .....	57
4.4.1. Biomasa en plantas .....	57
4.4.2. Biomasa Relación raíz parte aérea .....	60
<b>5. Discusión</b> .....	<b>61</b>
<b>6. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>75</b>
a. Conclusiones .....	75
b. Recomendaciones .....	77

## Lista de figuras

Figura 1 Proyección de nuevas áreas de cultivo de cacao en el país para los años 2012-2021 .....	20
Figura 2 a y b. Distribución de las camas o bloques dentro del vivero y sus medidas. b. Diseño y dimensiones de cada bloque, vista lateral. ....	28
Figura 3 Distribución de las muestras en el vivero .....	30
Figura 4 Método de intersección de la grilla para determinación de estructuras fúngicas en raíces. Tomado de Giovanetti & Mosse (1980) .....	34
Figura 5 Diagrama general de los procesos seguidos durante el ensayo y la toma de muestras.....	39
Figura 6 Dinámica en el tiempo de la concentración de cadmio total en el suelo. Representación tratamiento T3 y control T0 para las semanas 5 y 17. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). ....	42
Figura 7 a, b, c y d Distribución de cadmio en las fracciones del suelo .....	43
Figura 8 a, b, c y d Acumulación de cadmio en la parte aérea y raíz para las semanas 5 y 17. Las barras verticales indican la desviación estándar de los datos .....	46
Figura 9 a y b Acumulación de cadmio en los órganos de la planta para el tratamiento T3 .....	48
Figura 10 a y b Eficiencia de la absorción de cadmio por la planta. Semanas 5 y 13 para todos los tratamientos de cadmio.....	49
Figura 11 a y b Eficiencia en la translocación del metal para todos los tratamientos de cadmio. Semana 5 y 13 ds. ....	49
Figura 12 Eficiencia en la fito-extracción para el tratamiento T3. Semanas 5 y 17 ds. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) .....	50
Figura 13 Eficiencia del fotosistema II. Relación $F_v/F_m$ para todos los tratamientos de cadmio, semana 5. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). ....	52
Figura 14 Índice de clorofilas para todos los tratamientos semanas 5 y 17 ds.....	54

---

Figura 15 PI (Índice de rendimiento) semanas 5 y 17 ds. Tratamientos T0 y T4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos $P(<0.05)$ . ....	55
Figura 16 a y b Índice de clorofilas para todos los tratamientos de cadmio. Semanas 5 y 17 ds.....	.....
Figura 17 Fotografía de raíces de cacao colonizadas por hongos FMA .....	56
Figura 18 Pesos secos de raíz y parte aérea de plántulas de cacao en vivero bajo diferentes niveles de concentración de cadmio con y sin inoculación de <i>R. irregularis</i> ...	59
Figura 19 Relación raíz/parte aérea para las semanas 5 y 17 ds. Tratamientos T0 y T3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamiento ( $F<0.05$ ).....	60
Figura 20 Relación entre la concentración de Cd en parte aérea y la relación raíz/parte aérea para tratamiento T3 en el tiempo .....	71

## Lista de tablas

Tabla 1 Zonificación y área potencial de cultivo de cacao en Colombia.....	18
Tabla 2 Zonificación y área potencial de cultivo de cacao en Colombia.....	19
Tabla 3 Condiciones de montaje de análisis de Cd por Espectroscopia de absorción atómica de llama.....	36
Tabla 4 Análisis fisicoquímico del sustrato.....	40
Tabla 5 Concentraciones iniciales de cadmio en el sustrato en mg.kg-1. Tratamientos diferentes niveles de cadmio .....	41
Tabla 6 Porcentajes de distribución del cadmio en las fracciones del suelo, dinámica en el tiempo para las semanas 5 y 17 ds, tratamiento T3. ....	44
Tabla 7 Fracciones de cadmio en el suelo y particularidades generales, reactividad .....	44
Tabla 8 Dinámica del cadmio en la planta para todos los tratamiento en las semanas 5 y 17 ds.....	47
Tabla 9 Porcentaje de colonización de raíces de cacao por <i>R. irregularis</i> en sustrato con diferentes niveles de concentración de cadmio. ....	57
Tabla 10 Matriz de correlaciones entre concentración de cadmio en planta y concentración de cadmio en suelo en mg.kg-1.....	69

## **Lista de Símbolos y abreviaturas**

dds	Días después de siembra
ds	después de siembra
Eabs	Eficiencia en la absorción
Efitoextr	Eficiencia en la fitoextracción
Etransl	Eficiencia en la translocación
HFMA	Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares
Inoc	Inoculado
No inoc	No inoculado
PI	Performance Index: Índice de vitalidad
sds	Semanas después de siembra

# 1.Introducción

El suelo es un recurso limitado, no renovable que a menudo se encuentra contaminado con metales pesados, entre los que tiene especial importancia el cadmio (Cd) por su carácter acumulativo en el suelo, su disponibilidad debida a su alta reactividad y sus efectos adversos tanto en planta como al ingresar a la cadena trófica cuando se encuentra en suelos utilizados para cultivos de importancia agronómica (Alloway, 1995; Madejón et al. 2010). Se han encontrado a nivel mundial, extensas zonas de cultivos de relevancia económica como el cacao o el arroz que se encuentran contaminados con Cd (Mite et al., 2010; Ander et al., 2013; Gonzalez, 2010).

Entre las tecnologías utilizadas a nivel mundial para el mejoramiento de suelos agrícolas contaminados y/o para evitar su absorción por las plantas, se ha propuesto la aplicación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), un componente importante de la rizosfera que beneficia la toma de nutrientes por la planta y su tolerancia a estreses abióticos. Estos hongos han demostrado servir a varios propósitos entre los que se encuentran: inmovilización del metal en el suelo disminuyendo su biodisponibilidad, mejoramiento de algunas funciones fisiológicas de la planta para aumentar su tolerancia al estrés causado por la presencia de sustancias contaminantes u otros estreses abióticos, toma diferencial del metal por la planta, entre otros (Joner et al., 2000; Hovsepyan y Greipsson, 2004; Marques et al., 2006 y Zhang et al., 2015).

En cultivos de interés agrícola en zonas del trópico, la inoculación de hongos FMA ha sido utilizada con el fin de evaluar su efecto en diversos frentes, producción de biomasa (Zarate et al, 2009; Ceballos et al, 2013), como enmienda orgánica para recuperar suelos contaminados con metales pesados (Huamani, et al, 2016), como agente para la mejora en la toma de nutrientes, como fósforo (Bolaños et al, 2000), como agente mitigador de efectos de enfermedades (Cárdenas, et al, 2017) entre otras. Sin embargo poca información se ha generado sobre su efecto en el cultivo del cacao en condiciones de suelos ácidos del trópico.

No obstante todas estas investigaciones, en la actualidad, no se conoce la dinámica de metales como el cadmio en el sistema suelo-planta en cultivos de interés agronómico en los que se simulen, además, condiciones de campo en condiciones del trópico. El presente

estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la inoculación con un hongo FMA ampliamente distribuido a nivel global, *R. Irregularis*, en un sistema hongo-suelo-planta, en suelos cacaoteros del trópico, contaminados con Cd en condiciones de vivero. Esto, con el fin de evaluar la dinámica del metal en plantas micorrizadas, expuestas al metal, y el potencial mitigador de esta asociación en suelos contaminados con el metal, sin causar un efecto negativo en el cultivo.

## Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre un sistema suelo-planta en suelos cacaoteros contaminados con cadmio en etapa de vivero.

## Objetivos específicos

Evaluar y determinar la eficiencia de la colonización de *Rizophagus irregularis* en un cultivo de cacao en suelos contaminados con Cd en etapa de vivero.

Evaluar efecto de la inoculación de HFMA sobre plantas de cacao y la formación de la asociación en suelos contaminados con diferentes niveles de Cd

Identificar el efecto de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en la absorción por la planta y/o inmovilización de Cd en suelo contaminado

## Marco teórico

El árbol de cacao o cacaotero (*Theobroma cacao*) de la familia de las Esterculaceas, es una planta de sotobosque, que crece en una franja geográfica fundamentalmente tropical y que se extiende unos 20° de latitud hacia ambos hemisferios. Se clasifica en dos grandes grupos: el criollo y el forastero. Este último es un grupo con gran crecimiento, debido a la mayor facilidad para su cultivo y manejo por lo que es el más utilizado en el país.

El cultivo de cacao se puede desarrollar en zonas ubicadas entre 0 y 1000 m.s.n.m., aunque las condiciones óptimas se encuentran a altitudes entre 400 y 800 m.s.n.m., con temperaturas medias altas, entre los 23 - 28 °C, precipitaciones distribuidas a lo largo del año de 1500 – 2500 mm y una humedad relativa entre 70 - 80%. Para el buen desarrollo del cultivo se deben evitar variaciones excesivas de temperaturas y vientos permanentes que puedan causar el rompimiento de las ramas y la pérdida de follaje. El árbol de cacao en formación requiere de una luminosidad baja, 30% de luz y 70% de sombra. Por esta razón generalmente está asociado con cultivos de plátano, café, frutales y maderables, los cuales al tiempo que le proporcionan sombrío, permiten al agricultor compensar el retraso en el inicio de la producción de cacao, puesto que algunos tienen un ciclo productivo más corto y se emplean como sombrío temporal, mientras se desarrolla el cultivo permanente por ejemplo maderables y algunos frutales. En plantaciones adultas la luminosidad puede ser mayor, 75% de luz y 25% de sombra, además no requiere de sombrío en la medida en que éste es producido por los mismos árboles de cacao (Corpoica, 2005).

Los suelos requeridos para el cultivo de cacao deben tener ciertas propiedades físicas y químicas, entre las que se cuentan: i) la profundidad del suelo para el crecimiento de las raíces debe ser mayor de 1.5 metros, ii) suelo bien drenado durante las épocas de lluvia y con buena retención de humedad en el tiempo seco, condiciones características de suelos franco-arenosos, franco-limosos o franco-arcillosos, iii) la profundidad en que se encuentra el agua del suelo o nivel freático debe estar por debajo de 1.5 metros, iv) se desarrolla mejor en terrenos ondulados y pendientes, aunque también se puede cultivar en terrenos

planos, v) requiere de materia orgánica que le permita retener humedad y le proporcione nutrientes al cultivo, y vi) suelos con un pH de 5.5 a 7.5 (Corpoica, 2005). En el país, además de contar con suelos que tienen estas particularidades el cacao es de gran importancia, ya que es un alimento altamente nutritivo y una materia prima que se posiciona en el tercer lugar después del azúcar y el café en el mercado mundial, por lo que puede ser usado para exportación. Es, además, un cultivo incluido dentro de los planes de erradicación de cultivos para el post-conflicto por sus ventajosas posibilidades económicas y porque poseemos suelos aptos para cultivo en gran extensión (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, 2016).

El cacao producido en Colombia ha sido calificado como fino y de aroma, lo cual es muy importante, dado que en este ranking clasifican solo el cinco por ciento del total del cacao que se produce y comercializa en el planeta. Entre los países suramericanos: Ecuador, Perú, Venezuela y Colombia sumados producen el setenta por ciento del cacao fino y de aroma (ICCO, 2015).

En Colombia el cacao se cultiva en 4 zonas agroecológicas: i) Montaña Santandereana: abarca los departamentos de Santander y Norte de Santander; ii) Valles Interandinos Secos: Departamentos de Huila, sur del Tolima y norte del Magdalena, iii) Bosque Húmedo Tropical: zonas de Urabá, Tumaco, Catatumbo, Arauca, Meta y Magdalena Medio y iv) Zona marginal baja cafetera: Gran Caldas, norte del Tolima, suroeste antioqueño, nororiente caldense, occidente Cundinamarca (Castro Reyes, 2001)

Se cultiva desde los 100 hasta los 1.400 m.s.n.m., en paisajes que van desde montaña a planicies aluviales y en ambientes secos y perhúmedos, es decir, en múltiples condiciones edáficas, fisiográficas y climáticas, que originan una gama amplia de ambientes agroecológicos, que responden de manera diferencial a recomendaciones tecnológicas y a opciones de manejo del cultivo. De acuerdo a García Lozano y colaboradores (2005) en el país existen alrededor de 7.041.000 ha aptas para cultivo sin restricciones o con restricciones moderadas.

De acuerdo al Plan Nacional de Desarrollo cacaotero 2012-2021 las principales áreas potenciales de cultivo del cacao en el país, son las que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Zonificación y área potencial de cultivo de cacao en Colombia

DEPARTAMENTO	Área Potencial (*)	Participación
ANTIOQUIA	55.293	8%
ARAUCA	11.705	2%
BOLIVAR	21.458	3%
BOYACA	31.923	4%
CALDAS	34.769	5%
CASANARE	134.855	19%
CAUCA	5.350	1%
CESAR	27.263	4%
CRODOBA	15.600	2%
CUNDINAMARCA	46.304	6%
HUILA	13.000	2%
MAGADALENA	4.193	1%
META	66.159	9%
N. SANTANDER	108.750	15%
NARIÑO	14.000	2%
RISARALDA	4.932	1%
SANTANDER	106.911	15%
TOLIMA	20.109	3%
VALLE	4.053	1%
<b>TOTAL</b>	<b>726.627</b>	<b>100%</b>

Fuente: Corpoica-Fedecacao, tomado de Plan Nacional de desarrollo cacaotero 2012-2021

De acuerdo a los datos del Plan Nacional de Desarrollo, los departamentos con mayor potencial de cultivo son Casanare, Norte de Santander y Santander con 19, 15 y 15% de área respectivamente. Particularmente, Casanare cuenta con 134.855 ha aptas para el cultivo sin restricciones y 338.880 ha con restricciones moderadas (García Lozano et al, Corpoica 2005), aunque es una zona de la que se tienen pocos datos relacionados con el cultivo de cacao. En la figura 1 se presentan las proyecciones para los próximos años en relación a la ampliación de nuevas áreas de cultivo, en las que Casanare representa el 5% del total proyectado.

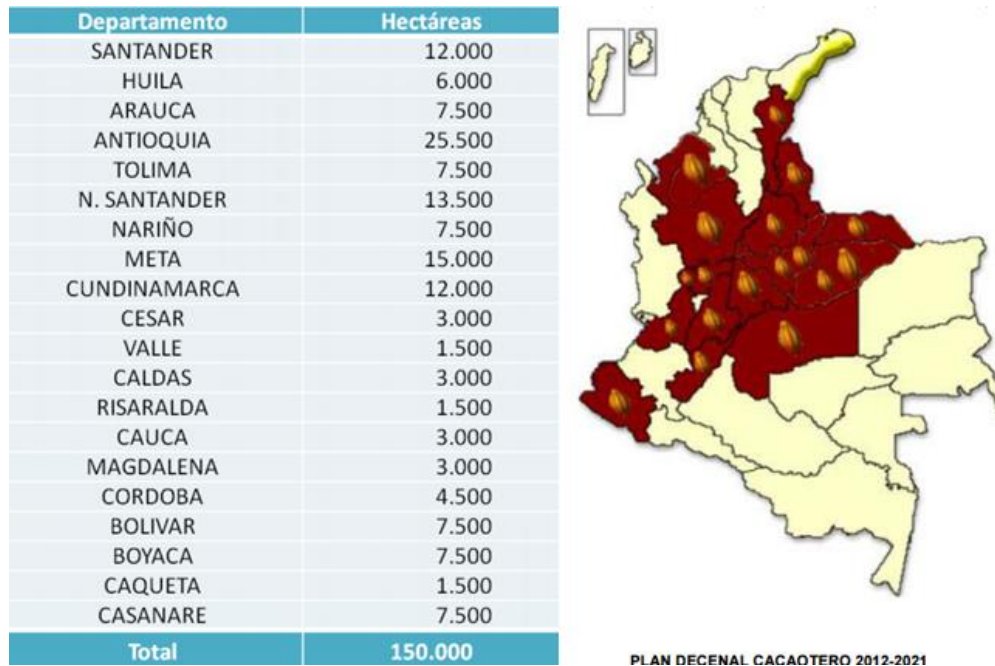


Figura 1 Proyección de nuevas áreas de cultivo de cacao en el país para los años 2012-2021

Fuente: Corpoica-Fedecacao, tomado de Plan Nacional de desarrollo cacaotero 2012-2021

Sin embargo, y a pesar de las grandes posibilidades del cultivo, una de las mayores limitantes para el aumento de la producción de cacao en el mundo y en el país, es la contaminación de suelos con metales pesados, específicamente con cadmio, ya que puede transferirse fácilmente por la cadena trófica y a que se han encontrado altos niveles del metal en fruto y por ende en productos derivados del cacao (Codex alimentarius, 2015; EFSA, 2012).

Los metales pesados son elementos de alta densidad ( $\geq 5 \text{ g.cm}^{-3}$ ), que pueden ser de baja o alta toxicidad para las plantas dependiendo de su naturaleza. Del mismo modo, en correspondencia con las concentraciones en las que se encuentren en el suelo algunos pueden cumplir alguna función biológica o pueden ser altamente tóxicos para las plantas y los animales. Cuando se encuentran en concentraciones que superan umbrales específicos (bastante bajos en su mayoría) pueden causar mal funcionamiento enzimático, estrés oxidativo, reemplazo de nutrientes esenciales, entre otros efectos. Entre los elementos que no cumplen ninguna función biológica y son particularmente tóxicos se encuentran el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) (Miransari, 2011).

En particular el Cd es un elemento no esencial y altamente tóxico en la mayoría de organismos, con una toxicidad entre 2 a 20 veces más alta que cualquier otro metal pesado debido a su movilidad (Vassilev et al., 1998). Está ubicado en el séptimo lugar en la lista de las 10 sustancias prioritariamente peligrosas entregada por la Agencia Americana para sustancias tóxicas y registro de enfermedades (ATSDR) e incluido en la lista de prioridades de la EPA (Kamnev y Lelie, 2000).

Se conoce que el Cd en el cuerpo humano afecta el funcionamiento de varias enzimas. Por ejemplo, se cree que el daño renal que resulta de la proteinuria es resultado del efecto del Cd sobre las enzimas responsables de la reabsorción de proteínas en los túbulos del riñón (Ramirez, A., 2002).

Su absorción es mayor en niños que en adultos causando anemia, dolor abdominal, efectos adversos en el desarrollo neurológico, problemas de aprendizaje, daños en los riñones, hipertensión y cambios en el metabolismo de la vitamina C, además de tener efectos carcinogénicos en bajas concentraciones. Su acumulación se da mayoritariamente en los riñones y los órganos reproductivos de humanos y animales y tiene un tiempo de vida media en el organismo entre 10-30 años (Hernández-Martínez y Navarro-Blasco 2012; Järup y Åkesson, 2009)

Se considera que el camino más probable de entrada del Cd al organismo humano es por medio de la cadena alimenticia, es decir, por consumo de vegetales que lo contengan, ya que la contaminación de suelos puede llevar a la toma de los metales por los cultivos y vegetales cultivados para consumo humano (Järup y Åkesson, 2009).

Su efecto en cultivos no es menos importante ya que debido a su similitud química con cationes esenciales, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  puede utilizar sus mismas vías de entrada (Andosch et al., 2012). Esto genera problemas de deficiencias funcionales y metabólicas, debido a que imita a este tipo de metales que son esenciales para el desarrollo de funciones biológicas diversas. El Cd puede incrementar la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua (Kirkham, 2006), suprimir la actividad mitótica y la división celular, inhibir el crecimiento, participar en procesos relacionados con la desintegración de la estructura del cloroplasto y la perturbación de la composición de la pared celular, entre otros efectos. El Cd dificulta la absorción de los nutrientes esenciales en las plantas, deteriora la actividad fotosintética, se une a los grupos SH de las enzimas

y proteínas esenciales e interactúa con transportadores tales como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasas. A través de su similitud con el calcio (Ca) y su capacidad para unirse a la calmodulina, actúa como antagonista del receptor de Ca y por lo tanto influye en los procesos dependientes de Ca, tales como la regulación de la estructura y función del citoesqueleto (Andosch et al. 2012). En resumen, tiene efectos directos sobre la producción y la calidad de los productos agronómicos debido a que el resultado de todos los efectos antes mencionados se refleja en disminución de las tasas de crecimiento, hojas marchitas, clorosis progresiva y sistema radicular con bajo crecimiento y con baja eficiencia en la toma de nutrientes (He J.Y., 2008).

El interés ambiental por los metales pesados en suelos agrícolas está relacionado con su carácter acumulativo, su no bio-degradabilidad, su capacidad de acumulación constante en el perfil del suelo hasta alcanzar concentraciones tóxicas y su interacción con diferentes propiedades del suelo que determinan su acumulación, movilidad y biodisponibilidad hacia otros componentes del ecosistema (Alloway, 1995). Existe un riesgo asociado con su transferencia a áreas no contaminadas, debido a su movimiento hacia aguas subterráneas por lixiviación y su alto potencial de ingreso a la cadena alimenticia por su absorción en las plantas y por ingestión directa. (Madejón et al. 2010).

Los metales pesados, y en el caso particular del Cd, son depositados en suelos y aguas, debido a procesos pedogénicos y a la actividad antropogénica como producto de desechos agroindustriales, de procesos como la galvanoplastia, manufactura de plásticos, minería, pigmentos para pinturas, aleaciones, baterías, diales para fotografía, fungicidas, compost y fertilizantes fosfatados, entre otros (Kirkham 2006). El Cd puede llegar a tener una vida media en el suelo de 15 a 1100 años y sus concentraciones están influenciadas por el tipo de suelo y la movilidad relativa en función de las características fisicoquímicas del mismo, el clima y la topografía (Alloway, 1995; Mapanda et al., 2005).

De acuerdo a datos de la FAO en 2015, del total de suelos cultivables del mundo, el 33% se encuentran degradados por algún tipo de contaminación y de esa cantidad el 15% corresponde a contaminación química entre la que se destaca la contaminación por Cd.

El Codex Alimentarius, en 2015, muestra los frutos de cacao provenientes de Colombia dentro de los más contaminados, alcanzando concentraciones de 3 a 4  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Los estudios exploratorios realizados en Colombia para determinar el nivel de contaminación

por Cd, muestran, por ejemplo, en Santander concentraciones de hasta 25 mg.kg<sup>-1</sup> (Ingeominas, 2010), en la Cuenca del Rio Bogotá hasta 4.75 mg.kg<sup>-1</sup> (Acosta y Peña, 2011), en Yacopí, Cundinamarca, hasta 24 mg.kg<sup>-1</sup> (datos no publicados).

Esta información sugiere que, a nivel global y nacional, en la mayoría de cultivos y en el caso específico del cacao es necesario implementar acciones encaminadas a cumplir con los requerimientos de inocuidad de los mercados nacionales e internacionales, referidos a niveles máximos de concentración de Cd en frutos.

Diversas investigaciones han encontrado que la asociación de plantas con Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) puede alterar la dinámica de absorción de metales pesados (Hildebrandt et al., 2007; Al-Ghamdi et al., 2012; Yang et al., 2016) entre otros beneficios para las plantas y suelos en los que se encuentran y por lo tanto se perfila como una alternativa de mitigación a ser utilizada en suelos contaminados con estos elementos.

Las micorrizas, son asociaciones mutualistas entre hongos del filo Glomeromycota (HFMA) y las raíces de la mayoría de las plantas (cultivadas y silvestres). Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque cerca del 90% de las especies vegetales sobre la Tierra son susceptibles de ser micorrizadas sino también porque pueden estar presentes en la mayoría de los hábitats naturales (Zhang et al., 2010, Gadkar et al. 2001, Remy et al., 1994).

Las hifas del hongo funcionan como un sistema de absorción que se extiende por el suelo y es capaz de proporcionar agua y nutrientes (nitrógeno y fósforo, principalmente) a la planta y proteger las raíces contra algunas enfermedades (Bolan, 1991), mitigar efectos por estreses abióticos (Aloui, et al., 2009; Aroca, R., et al., 2009; Borde et al., 2011) entre otros beneficios. El hongo por su parte recibe de la planta azúcares provenientes de la fotosíntesis (básicamente almidón), y recientemente se ha conocido que el hongo no tiene la capacidad de sintetizar ácidos grasos por lo que depende de los ácidos grasos que la planta le proporciona (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988; Jung et al., 2012). Este tipo de asociaciones confiere un efecto benéfico a la planta, incrementando su longevidad, tamaño y biomasa de la raíz al tiempo que ayuda a enfrentar estreses ambientales (Caravaca et al. 2005; Brachmann & Parniske, 2006), además de desempeñar un papel

importante en la modificación de algunas características físicas del suelo, al incrementar su estabilidad y la agregación de partículas (Rilling, 2006; Khan, 2006).

Los numerosos intentos, en los últimos años, por estudiar la asociación hongo-planta y su papel en suelos contaminados han sido poco fructíferos. Actualmente, se desconoce el papel de esta asociación y su efecto potencial en suelos contaminados con Cd en sistemas agroforestales como el cacao. Estos sistemas son de particular importancia para el desarrollo agrícola de Colombia, debido a su potencial de exportación, a su naturaleza permanente y a la amplia distribución de suelos con potencial destino hacia este tipo de sistemas.

Diversas investigaciones han arrojado resultados sobre el efecto benéfico de la asociación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) con las raíces de plantas en la mejora de la nutrición y la tolerancia de los efectos de estreses abióticos, como el provocado por presencia de sustancias contaminantes como los metales pesados.

Sin embargo, con la información derivada de estudios realizados hasta el momento, es difícil establecer la contribución real de los hongos FMA en suelos agrícolas contaminados con metales pesados ya que los resultados se tornan contradictorios en cuanto a lo que sucede en términos de absorción y/o estabilización del Cd (Janoušková et al. 2005, 2006 Rivera-Becerril et al. 2002, 2005; Malcová et al., 2003; Chen et al, 2003, Leyval et al, 1997) puesto que la mayoría de estos estudios son realizados bajo condiciones controladas de laboratorio, en sistemas hidropónicos o en condiciones de sustratos artificiales.

Adicionalmente, la diversidad de metodologías, sistemas y diseños experimentales utilizados, dificultan la posibilidad de comparación entre resultados y por ende el establecimiento de información clara respecto al papel de los HFMA en sistemas agrícolas contaminados por metales pesados.

Los diseños experimentales utilizados para los estudios reportados hasta la fecha tienen deficiencias metodológicas que dificultan que puedan ser extrapolados a condiciones reales. Así, por ejemplo, cuando se usan tratamientos de inoculación de hongos FMA se suele hacer sobre suelo o sustrato esterilizado (Jiang et al., 2016) es decir, que se elimina la microbiota local, lo que impide estudiar interacciones reales con los tratamientos o se hacen sobre suelo no contaminado (Marschner y Dell, 1994; Finlay y Soderstrom, 1992).

Las investigaciones en el tema, incluyen, generalmente, plantas modelo, que están lejos de ser plantas de interés agrícola (Aram, 2013; Neagoe, 2013) inoculadas con diferentes especies de hongos, lo que hace casi imposible extrapolar los resultados a condiciones locales. Pocos autores han incluido en sus investigaciones plantas de uso agrícola como arroz o maíz (Yang et al, 2016, Lou et al, 2017, Chang et al, 2012 Wang, et al 2008; Lehmann and Rebele, 2004), pero no se han realizado trabajos en cultivos agro-forestales, como el cacao.

Pocos trabajos como el de Yuan, et al (2016) se han orientado a estudiar en todo el sistema suelo-planta, la absorción, distribución y especiación de un metal pesado, en ese caso se usó Antimonio. Otros autores, como Lou Na (2017) han estudiado la absorción de Cd y sus formas químicas en un cultivo de arroz, pero no tienen en cuenta la dinámica del metal en el tiempo.

A nivel regional, algunos estudios involucran plantas de cacao y hongos FMA, aunque en suelos sin contaminación por Cd (Marquez & Leblanc, 2014). Otros trabajos realizados con cultivos de cacao sobre suelos contaminados (Hurtado, 2012; Gonzales, 2010), han estudiado el efecto de la inoculación de hongos FMA sobre la mitigación del estrés sobre las plantas, pero no han estudiado la dinámica del elemento en el sistema (dinámica espacial) ni en el tiempo (dinámica temporal). Por todo lo anterior, evaluar el efecto de *R. irregularis* sobre la dinámica del Cd en todo el sistema hongo-suelo-planta en un cultivo de cacao en condiciones de invernadero en el trópico bajo las concentraciones de cadmio que se han encontrado en la zona, se constituye en uno de los pocos acercamientos de análisis experimental para establecer información base respecto al impacto que puede tener esta tecnología novedosa sobre sistemas agrícolas reales. Al reconocer que la toma, translocación y formas químicas del Cd son un proceso dinámico y complejo, que no puede ser explicado simplemente por la concentración total del elemento detectada en un momento muestral, sino que es interdependiente de varios factores que se presentan de manera simultánea en los sistemas agrícolas, se crea la necesidad de estudios más holísticos que tengan en cuenta todos los compartimentos de un sistema agrícola real.



## **Materiales y Métodos**

### **3.1. Vivero y diseño experimental**

#### **3.1.1. Acondicionamiento de vivero y manejo de residuos**

La investigación se realizó en el campus Utopía, perteneciente a la Universidad de la Salle, localizado en la Hacienda Matepantano vía Punto Nuevo-Manantiales, km 12, Yopal (Casanare), a una altitud de 350 msnm, con una temperatura media anual de 26°C, humedad relativa entre 60-75% y precipitaciones de hasta 500mm, condiciones propicias para el cultivo de cacao.

Para el establecimiento del ensayo se construyó un vivero, de 8 x 20 metros cubierto con polisombra al 65% y plástico transparente como recubrimiento con el fin de controlar el ingreso de aguas lluvias que pudiesen provocar un aumento en la cantidad de residuos contaminados con cadmio (Cd), al igual que un plástico en el suelo como barrera física para mantener el suelo libre del metal.

Dentro del vivero se construyeron 5 camas o bloques de 3x4m, cada una con una inclinación de aproximadamente 4° como se muestra en la figura 2 (a y b), al final de las cuáles fueron dispuestas unas canaletas metálicas para recolección de lixiviados.

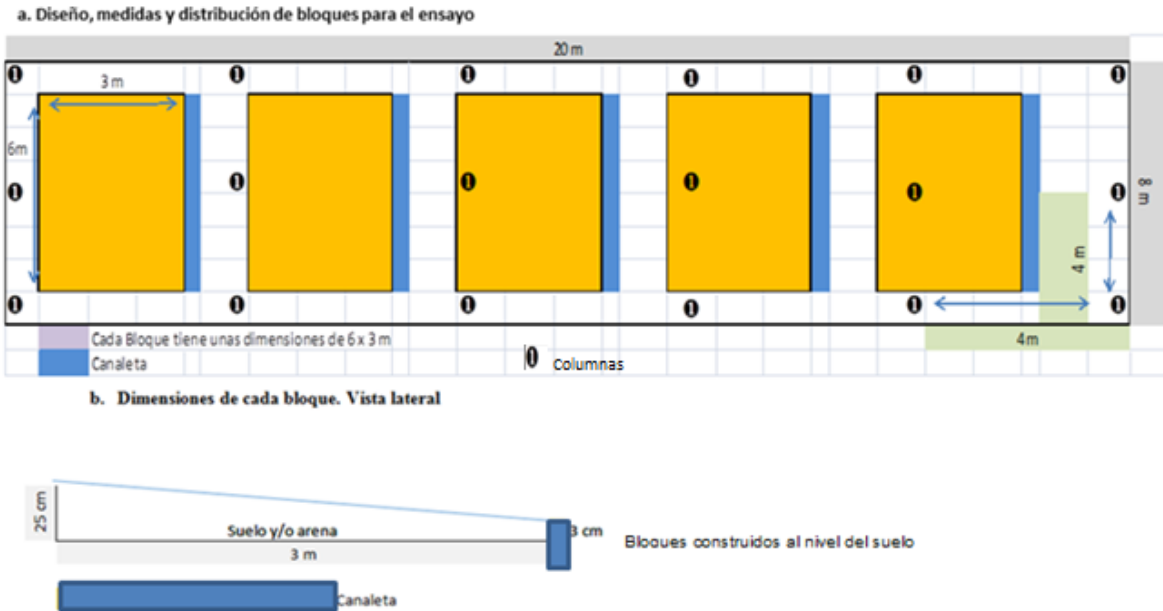


Figura 2 a y b. Distribución de las camas o bloques dentro del vivero y sus medidas. b. Diseño y dimensiones de cada bloque, vista lateral.

El diseño experimental utilizado correspondió a un diseño de bloques completos al azar, con dos factores: concentración de Cd en suelo e inoculación con *Rhizophagus irregularis*. En total se contó con 10 tratamientos obtenidos de la interacción de 5 diferentes concentraciones de cadmio (0, 3, 6, 12, y 24 mg.kg<sup>-1</sup>) de suelo y dos tratamientos con el hongo FMA, con y sin inoculación. Se contó con cinco bloques y en cada bloque las plantas de la misma concentración de Cd fueron ubicadas en una misma fila para evitar contaminación cruzada por lixiviación.

Para el manejo ambiental de los residuos, las muestras de suelo fueron almacenadas en bolsas plásticas dentro de bultos de lona y los residuos líquidos transferidos a recipientes de plástico de 20 L cada uno y almacenadas temporalmente bajo techo hasta la terminación de los muestreos. Una vez finalizado el ensayo, los residuos sólidos y líquidos fueron transportados a Bogotá y entregados a la unidad de gestión ambiental de la Universidad Nacional de Colombia para su correcta disposición.

### 3.1.2. Preparación del material de siembra

El material utilizado para la siembra fue una mezcla de suelo de la zona y arena de río en proporción 1:1. Su composición elemental y sus propiedades fisicoquímicas fueron

establecidas antes de la fortificación con cadmio (Cd). Los análisis físico-químicos de suelo se realizaron en el laboratorio de suelos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia (ver en Anexo I). Este análisis comprende: pH en suspensión suelo:agua p/v (1:1); conductividad eléctrica con extracto de la pasta de saturación; carbono orgánico (CO) por Walkley – Black; Nitrógeno total estimado a partir del CO; capacidad de intercambio catiónico (CIC) por desplazamiento de  $\text{NH}_4^+$  intercambiado con NaCl; CIC efectiva (CICE) estimado por la suma de bases y acidez intercambiables; acidez intercambiable (Al) por extracción con KCl 1M; Fósforo disponible por el método de Bray II; Azufre y Boro por extracción con Fosfato monocálcico, Microelementos (Cu, Fe, Mn, Zn) por extracción con DTPA; Composición textural por el método de Bouyoucos.

Se calculó por aproximación la cantidad de suelo requerida para cada concentración de Cd de acuerdo a la cantidad de bolsas requeridas para cada tratamiento. El procedimiento fue el siguiente: se determinó el peso de una bolsa y se verificó con cuántas bolsas se llenaba una carretilla y se calculó cuantas carretilladas de suelo eran necesarias para el número de bolsas previsto y se ubicó esa cantidad de suelo en una pila sobre doble plástico dentro del vivero para la posterior adición de Cd. En total se hicieron 5 pilas diferentes de sustrato (Anexo VI)

## **3.2. Material vegetal**

### **3.2.1. Siembra, establecimiento y mantenimiento**

Para la siembra se utilizó semilla de cacao del genotipo IMC67 (CNC, 2010). La semilla se sembró de acuerdo a las recomendaciones en la “Guía técnica para el cultivo del cacao” (Fedecacao, 2007). Después de la siembra se realizaron riegos permanentes y se hizo seguimiento a las condiciones ambientales dentro del vivero con ayuda de una estación meteorológica instalada dentro del mismo (ver reporte meteorológico en Anexo VIII).

Quince días después de la emergencia de las plántulas se realizó la aplicación del inóculo del hongo de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante. La especie de hongo FMA utilizada fue *Rhizophagus irregularis*, contenida en producto comercial Glomygel®. Se realizó un control sin adición de hongo, utilizando en su lugar solo agua. Para detalles sobre la aplicación del hongo, ver Anexo VIII

CAMA 1					CAMA 2				
0 ppm	3 ppm	24 ppm	12 ppm	6 ppm	6 ppm	12 ppm	0 ppm	3 ppm	24 ppm
Cd0/Glo	Cd3/Veh	Cd6/C	Cd12/C	Cd6/Glo	Cd6/Veh	Cd12/Glo	Cd0/C	Cd3/Veh	Cd24/Glo
Cd0/Veh	Cd3/Glo	Cd6/Veh	Cd12/Glo	Cd6/C	Cd6/Glo	Cd12/C	Cd0/Veh	Cd3/C	Cd24/Veh
Cd0/C	Cd3/C	Cd6/Glo	Cd12/Veh	Cd6/Veh	Cd6/C	Cd12/Veh	Cd0/Glo	Cd3/Glo	Cd24/C
Canaleta					Canaleta				
CAMA 3					CAMA 4				
24 ppm	3 ppm	6 ppm	0 ppm	12 ppm	0 ppm	12 ppm	24 ppm	6 ppm	3 ppm
Cd24/Glo	Cd3/C	Cd6/Veh	Cd0/Glo	Cd12/C	Cd0/C	Cd12/Glo	Cd24/Veh	Cd6/Glo	Cd3/Veh
Cd24/Veh	Cd3/Glo	Cd6/C	Cd0/Veh	Cd12/Glo	Cd0/Veh	Cd12/Veh	Cd24/Glo	Cd6/C	Cd3/C
Cd24/C	Cd3/Veh	Cd6/Glo	Cd0/C	Cd12/Veh	Cd0/Glo	Cd12/C	Cd24/C	Cd6/Veh	Cd3/Glo
Canaleta					Canaleta				
CAMA 5									
3ppm	6ppm	12ppm	24ppm	0ppm					
Cd3/Glo	Cd6/C	Cd12/Veh	Cd24/C	Cd0/Veh					
Cd3/Veh	Cd6/Veh	Cd12/C	Cd24/Veh	Cd0/C					
Cd3/C	Cd6/Glo	Cd12/Glo	Cd24/Glo	Cd0/Glo					
Canaleta									

Figura 3 Distribución de las muestras en el vivero. Glo indica los tratamientos inoculados con hongo; C indica los tratamientos control; Veh indica los tratamientos realizados con el vehículo del hongo; las concentraciones de cadmio se indican con números para cada tratamiento.

El riego de las plantas se realizó cada dos días o con mayor frecuencia, de acuerdo con las necesidades durante la etapa de vivero. En las semanas 8 y 10 después de siembra se realizó fertilización edáfica utilizando una dosis de Nitrógeno (5 g/plántula),  $P_2O_5$  (1 g/plántula) y  $K_2O$  (0,5 g/plántula) con base en resultados obtenidos en la zona experimental (Fernandez et al., 2017) y de acuerdo al análisis fisicoquímico del sustrato con el fin de cubrir los requerimientos de las plantas y simular lo más cerca posible el proceso en un vivero comercial.

### 3.3. Adición de cadmio (Cd) al suelo

Las concentraciones de cadmio utilizadas para adicionar al suelo fueron escogidas con el fin de cubrir el amplio rango de concentraciones típicas encontradas en campo en el país. Por esto las concentraciones escogidas fueron 0, 3, 6, 12 y 24  $mg.kg^{-1}$ , debido a que se buscaba, además, estudiar la dinámica temporal del metal en el sistema. Los puntos de muestreo en el tiempo se escogieron teniendo en cuenta el tiempo máximo de permanencia de las plantas en vivero que es de 4 meses. Así, los muestreos se realizaron a las 5, 9 13 y 17 semanas después de siembra (sds).

La adición de Cd al suelo se realizó con solución de Cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y la cantidad de Cd a adicionar se calculó de acuerdo a la cantidad aproximada de suelo que se tenía en cada pila en el vivero. La concentración esperada de Cd total por nivel en el suelo era 0, 3, 6, 12, y 24  $\text{mg.kg}^{-1}$ ; dicha concentración fue verificada posteriormente por espectroscopia de absorción atómica -Thermo Sc. iCE 3000 series, previa extracción del metal por digestión con agua regia bajo calentamiento y el resultado fue tomado como línea base para el análisis posterior de la dinámica del Cd en el sistema (Tabla 5).

Una vez adicionado el Cd, se homogenizó diariamente el suelo durante una semana por volcamiento de las pilas con pala. El suelo se mantuvo cubierto con plástico y se dejó reposar durante 3 semanas antes del llenado de bolsas y la siembra de la semilla con el fin de permitir un tiempo de equilibrio al compuesto adicionado, de acuerdo a lo reportado por Blom (1974) quien recomienda que el tiempo requerido para el equilibrio del sistema en el caso de Oxisoles es alrededor de 12 días. Durante éste tiempo las pilas eran homogeneizadas con pala y vueltas a tapar. Transcurridas las tres semanas, se procedió al llenado de bolsas, para lo que se utilizaron bolsas negras de polietileno de 3 kg de capacidad. Las bolsas se llenaron totalmente y las posibles burbujas de aire se eliminaron con presiones leves de los dedos de la mano o golpeando con suavidad la base de la bolsa llena contra el suelo.

Durante todo este proceso se tomaron las medidas necesarias para que el personal involucrado en cada actividad no estuviera en contacto directo con el Cd de acuerdo con instrucciones de uso de la hoja de seguridad del cloruro de cadmio y protocolo de seguridad presentado al personal para tal fin.

#### **3.4. Muestreos**

Se realizaron 4 muestreos a lo largo del periodo de permanencia de las plantas en vivero, es decir 4 meses. Los muestreos se llevaron a cabo cada cuatro semanas, a partir de la inoculación de las raíces de las plántulas con el inóculo comercial. En cada muestreo se tomaron 6 muestras al azar, incluyendo por lo menos una de cada bloque, que fueron destinadas para medición de parámetros morfológicos y de concentración de cadmio tanto en material vegetal como en suelo. Para la medición de parámetros fisiológicos se especifica la cantidad y procedimiento en cada apartado.

### **3.5. Medición *in situ* (no destructiva) de parámetros de la planta**

#### **3.5.1. Variables de crecimiento vegetal**

En cada uno de los muestreos, a cada planta muestreada se le tomaron mediciones de parámetros de crecimiento como altura de la planta, tomada desde la base del tallo hasta el ápice caulinar (yema terminal); longitud de la raíz principal, tomada desde la base del tallo; número de hojas, conteo de la totalidad de hojas en la planta sin importar su tamaño y diámetro de tallo, medido a una altura de 2 cm de la base del tallo para todas las plantas, ésta última medición se realizó con ayuda de un calibrador digital. Los resultados fueron registrados teniendo en cuenta el tratamiento y el bloque del que provenía cada planta para su posterior análisis estadístico.

#### **3.5.2. Parámetros fisiológicos**

Se realizaron mediciones de varios parámetros fisiológicos con el fin de estudiar el efecto de los tratamientos sobre las plantas.

##### **Índice de clorofilas**

Cada medición se efectuó en hojas saludables completamente expandidas en la parte central de la planta (de las hojas más grandes). Se realizaron 2 lecturas por hoja a 2 hojas por planta en seis plantas por tratamiento y la lectura se realizó en el centro de la lámina entre el borde de la hoja y evitando tocar la nervadura central, la lectura se realizó después de las 9:00 am hasta la 1:00 pm para garantizar que la planta estuviera fotosintéticamente activa. El equipo utilizado para estas mediciones fue un medidor de contenido de clorofilas portátil Opti-sciences CCM-200 plus.

##### **Conductividad estomática**

Estas mediciones se realizaron con ayuda de un porómetro. Cada medición se efectuó en hojas saludables, completamente expandidas en la parte central de la planta (de las hojas más grandes). Se realizó 1 lectura (por hoja) a una hoja por planta en cuatro plantas por tratamiento, la lectura se realizó entre las 11:00 am y la 1:00 pm tiempo de mayor radiación durante el día.

### **Fluorescencia de la clorofila**

Para la determinación del rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) se utilizó un fluorómetro no modulado Handy PEA Hansatech a 3000  $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , durante 3 seg. Estas mediciones se tomaron entre las 3:00 am y las 5:00 am con el fin de que no hubiera luz incidiendo sobre las hojas durante el muestreo. Las mediciones se realizaron en una hoja de tres plantas por tratamiento en los cinco bloques para un total de 225 plantas muestreadas por punto de tiempo. Adicionalmente se registraron otros datos que arroja simultáneamente el equipo que sirven como indicadores del desempeño del fotosistema, como el Pi y el número de registro para posterior análisis JIP.

## **3.5 Análisis de laboratorio en planta y suelo**

### **3.5.1 Cuantificación de la colonización de HFMA en raíces de cacao**

En cada uno de los muestreos se tomaron raíces frescas de 6 unidades experimentales por tratamiento, escogidas aleatoriamente y se analizaron según el método de tinción y cuantificación de colonización de raíces descrito por Vierheilig et al. (1998). Las raíces recolectadas para las observaciones fueron raíces jóvenes de aproximadamente 2mm. Las muestras de raíces previamente lavadas, se sumergieron en una solución de KOH al 10% y se calentaron en Baño de María a 90°C durante 90 min, después de lo cual fueron retiradas del baño y la solución eliminada con abundante agua. Posteriormente, las muestras de raíces fueron blanqueadas con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v) durante 90 min. Se preparó una solución de tinta china negra marca Sheaffer® al 5% en una solución de ácido acético al 5%. Cumplido el tiempo de despigmentación, se lavaron las muestras con abundante agua y finalmente se sumergieron en la solución de tinta, en refrigeración durante 20 h, posteriormente se desechó la solución y se lavó con abundante agua hasta eliminar el exceso de tinta.

Luego de la tinción de las raíces se evaluó el porcentaje de colonización al estereoscopio. Las raíces teñidas fueron sumergidas en solución de lacto-glicerol y almacenadas en refrigeración (2-8°C) para evitar su deterioro.

Las observaciones microscópicas se realizaron por el método de intersección de la grilla (Figura 4) disponiendo homogéneamente las raíces teñidas sobre una caja de Petri con cuadrícula de 1cm, contando sobre las intersecciones el número de raíces colonizadas (campos positivos) y las raíces totales, vertical y horizontalmente (Giovanetti y Mosse, 1980). El porcentaje de colonización se calculó a partir del número de campos positivos, sobre el número de campos visuales totales multiplicados por 100 (Azizah-Chulan & Ragu, 1986).

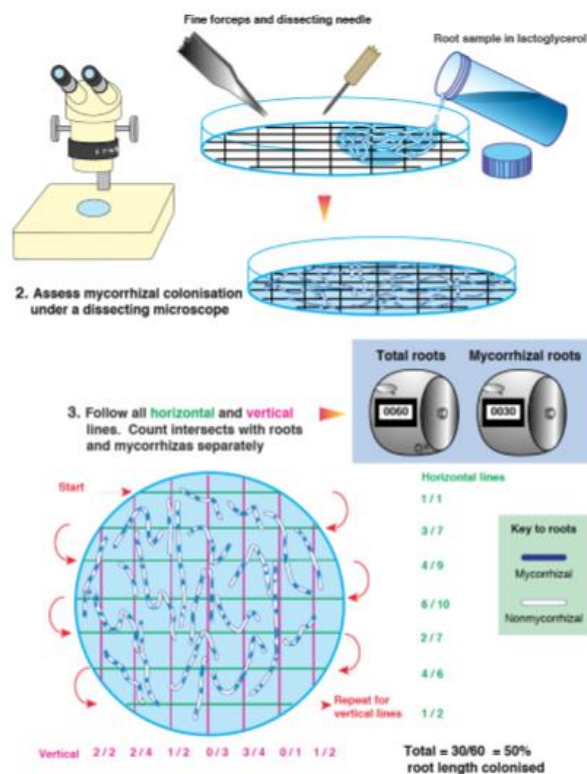


Figura 4 Método de intersección de la grilla para determinación de estructuras fúngicas en raíces. Tomado de Giovanetti & Mosse (1980)

### 3.5.2 Determinación de peso seco del material vegetal

La producción de biomasa se determinó al separar cada órgano de la planta y colocarlo por separado en bolsas de papel con su debida identificación. Las muestras fueron colocadas en una estufa a 80°C hasta peso constante (aprox. 48 h). La biomasa seca fue determinada pesando las muestras secas en balanza analítica.

### **3.5.3 Secado de muestras de suelo y tamizaje**

Las muestras de suelo tomadas en vivero, fueron extendidas sobre papel periódico debidamente rotulado a temperatura ambiente por dos días. Para este proceso, la muestra en la bolsa fue homogeneizada por agitación durante aproximadamente 3 min. Se tomó una porción significativa (de aproximadamente 1 kg) de la bolsa y se extendió sobre el papel periódico revolviendo la pila continuamente para garantizar un secado homogéneo. Una vez seca la muestra, se pasó a través de tamiz N° 10 (2 mm) y se almacenó una porción de aproximadamente 300 g en bolsa con rótulo de identificación de la muestra. Esta corresponde a la porción fina (McKean, 1993; FAO,2015) que fue utilizada en los análisis de Cd, pH y fraccionamiento.

### **3.5.4 Determinación de pH**

Para la determinación del pH se utilizó el método potenciométrico (Willard et al., 1974; Bates, 1983). Se pesó una cantidad definida de suelo seco y molido (10g) y se colocó en un tubo tipo Falcon® de 50 ml. Se agregó agua desionizada en proporción 1:5, se agitó durante 30 minutos y se dejó reposar 30 minutos antes de realizar la lectura con potenciómetro Corning Life Sciences 440® con electrodo de vidrio.

### **3.5.5 Determinación de cadmio en material vegetal**

Después de la determinación de peso seco en material vegetal, cada muestra fue sometida a proceso de disminución del tamaño de partícula en molino Thomas Wiley®, la muestra fue homogeneizada y utilizada para determinación de Cd. Para este análisis, se debe tomar, por representatividad, entre 1 y 2 g de muestra, cuando esto sea posible. En este sentido, en el primer muestreo, debido a que la cantidad de biomasa era muy pequeña, se unieron dos réplicas diferentes del mismo tratamiento y se incineraron como una sola, por lo que la cantidad de repeticiones se redujo de 6 a 3. Para el segundo muestreo se tomó, en la mayoría de los casos, toda la muestra de material vegetal obtenida después de la determinación de peso seco. Para los muestreos 3 y 4 en los casos donde se contaba con baja producción de biomasa se tomó toda la muestra y en los casos donde había una mayor cantidad se tomaron muestras de aprox. 2 g.

La muestra fue procesada según protocolo para análisis de Cd en material vegetal (ISO 11466:1995) así: se pesó en crisol de porcelana y fue sometida a incineración en mufla a

450-500°C durante 3 horas o hasta reducción total a cenizas. La ceniza obtenida fue transferida cuantitativamente y diluida hasta 50 ml con HNO<sub>3</sub> al 2% (The Perkin-Elmer corporation, 1996). La solución resultante fue filtrada por papel Watman 42 y leída directamente por espectroscopia de absorción atómica de llama (Thermo Scientific iCE 3500). Las condiciones del montaje se resumen en la tabla 2.

Se analizaron tres aspectos de la eficiencia en la toma de Cd por el sistema. Eficiencia en la absorción (1) calculado de acuerdo a Wang et al (2007) como la habilidad de las raíces de tomar el Cd del suelo, Eficiencia de la translocación (2) definido como la habilidad de la planta de transportar el Cd a la parte aérea y Eficiencia de la fito-extracción (3) definida como la habilidad de las raíces de transportar el Cd a la parte aérea.

$$\text{Eficiencia de la Absorción (Eabs) (mg.kg-1)} = \frac{\text{Cd en toda la planta}}{\text{Peso seco de raíz}} \quad (1)$$

$$\text{Eficiencia de la Translocación (E transl) (mg.kg-1)} = \frac{\text{Cd en la parte aérea}}{\text{Cd en la raíz}} \quad (2)$$

$$\text{Eficiencia de la Fitoextracción (E fitoext) (mg.kg-1)} = \frac{\text{Cd en parte aérea}}{\text{Peso seco de raíz}} \quad (3)$$

**Tabla 2 Condiciones de montaje de análisis de Cd por Espectroscopia de absorción atómica de llama**

Equipo	Espectrofotómetro de Absorción atómica Thermo Scientific iCE 3500
Corrección de fondo	Lámpara de Deuterio
Longitud de onda	228.8nm
Slit	0.5nm
Tipo de señal	Continuo
Llama	Aire-acetileno
Lámpara	Cátodo hueco descarga sin electrodos para determinación de cadmio
Corriente de la lámpara	50

Altura llama	8.6 mm
Flujo	1.0 L/min
Estándar	SIn Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Angulo*	10°

\*Se modifica el ángulo del quemador para análisis de muestras con concentraciones entre 5-13mg.kg-1

### 3.5.6 Determinación de cadmio total en suelo

La determinación de Cd total en la mezcla suelo:arena se realizó por extracción del metal de la muestra por reacción con Agua regia a alta temperatura (ISO 11466:1995). Se tomó una muestra de 3 g en vaso de precipitados de vidrio de capacidad 100 mL, a cada muestra se le adicionaron 28 mL de agua regia (21 mL de HCL fumante al 37% y 7 mL de HNO<sub>3</sub> al 65%), 15 mL de HNO<sub>3</sub> 0.05 M y 1 mL de H<sub>2</sub>O. Se colocó un vidrio de reloj sobre el frasco de reacción, se dejaron reposar las muestras durante 16 h y después fueron sometidas a digestión controlada durante 2 horas o hasta que hubiera cesado la emisión de vapores amarillos. La muestra obtenida fue filtrada por papel Whatman 42 y recogida en recipientes de 50mL. La solución fue llevada cuidadosamente a 50 mL y leída en el espectrómetro de AA en las condiciones descritas en la Tabla 2.

### 3.5.7 Fraccionamiento de cadmio en suelo

La determinación de las fracciones de Cd en el suelo, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Tokalioglu et al. (2000) y por el procedimiento de extracción secuencial en cuatro pasos modificado del propuesto por la BCR (Comisión de la oficina de referencia de la Comunidad Europea) con el fin de obtener resultados comparables del metal extraído. Para esto se tomó una muestra de suelo de 10 g y fue sometida a extracciones sucesivas en el siguiente orden: (1) ácido acético 0.11M, agitación durante 16 h y posterior separación del sobrenadante con ayuda de una centrífuga, el sedimento fue lavado con agua destilada por agitación durante 15 minutos y posterior centrifugación de la muestra. El sobrenadante fue adicionado al sobrenadante inicial, (2) cloruro de hidroxilamonio 0.5M pH 2.0, agitación por 16 horas. La separación del sobrenadante y posterior lavado del sedimento se realizó de manera similar a la fracción 1. El sobrenadante fue recogido en un recipiente diferente al primero, (3) peróxido de hidrógeno 8.8M, agitación por 2 horas, recolección del sobrenadante y posterior tratamiento del sedimento

con acetato de amonio 1M, pH 2.0 agitación durante 1 hora y posterior lavado con agua como en los pasos anteriores. El sobrenadante se recoge en un recipiente diferente a los anteriores y (4) adición de agua regia, 16 horas de reposo con la solución y posterior digestión con temperatura hasta que cesen los vapores amarillos, el sobrenadante final se recoge en un recipiente diferente. Todas las muestras obtenidas se llevan a volumen de 50mL en balón volumétrico con solución diluida de ácido nítrico, y se leen por EAA de acuerdo a las condiciones de la Tabla 2. Las fracciones así extraídas corresponden a: Fracción 1-fácilmente soluble; Fracción 2-reducible, unida a óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso; Fracción 3-oxidable, unida a materia orgánica; Fracción 4-residual, menos lábil, relacionada con minerales unidos a la estructura cristalina, se encuentran inmovilizados y no representan un riesgo para el ecosistema.

### **3.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de ANOVAs de una y dos vías usando el programa JMP 11 (SW). El criterio de significancia fue  $\alpha=0.05$ , seguido de una prueba de Tukey para la determinación de los efectos entre tratamientos. Se llevaron a cabo análisis de correlación de Pearson para evaluar las asociaciones entre variables individuales ( $\alpha=0.05$ )

Las medias y los errores estándar fueron calculados para los parámetros morfológicos para un mínimo de 6 muestras por tratamiento, en los parámetros fisiológicos para un mínimo de 3 muestras por tratamiento, y para el análisis de Cd tanto en suelo como en material vegetal se analizaron las muestras por duplicado en un mínimo de 3 muestras por tratamiento dependiendo de la disponibilidad de material del muestreo en cuestión.

En la Figura 5 se detalla el proceso global seguido para la toma y procesamiento de muestras, así como el procedimiento de análisis seguido en este trabajo.

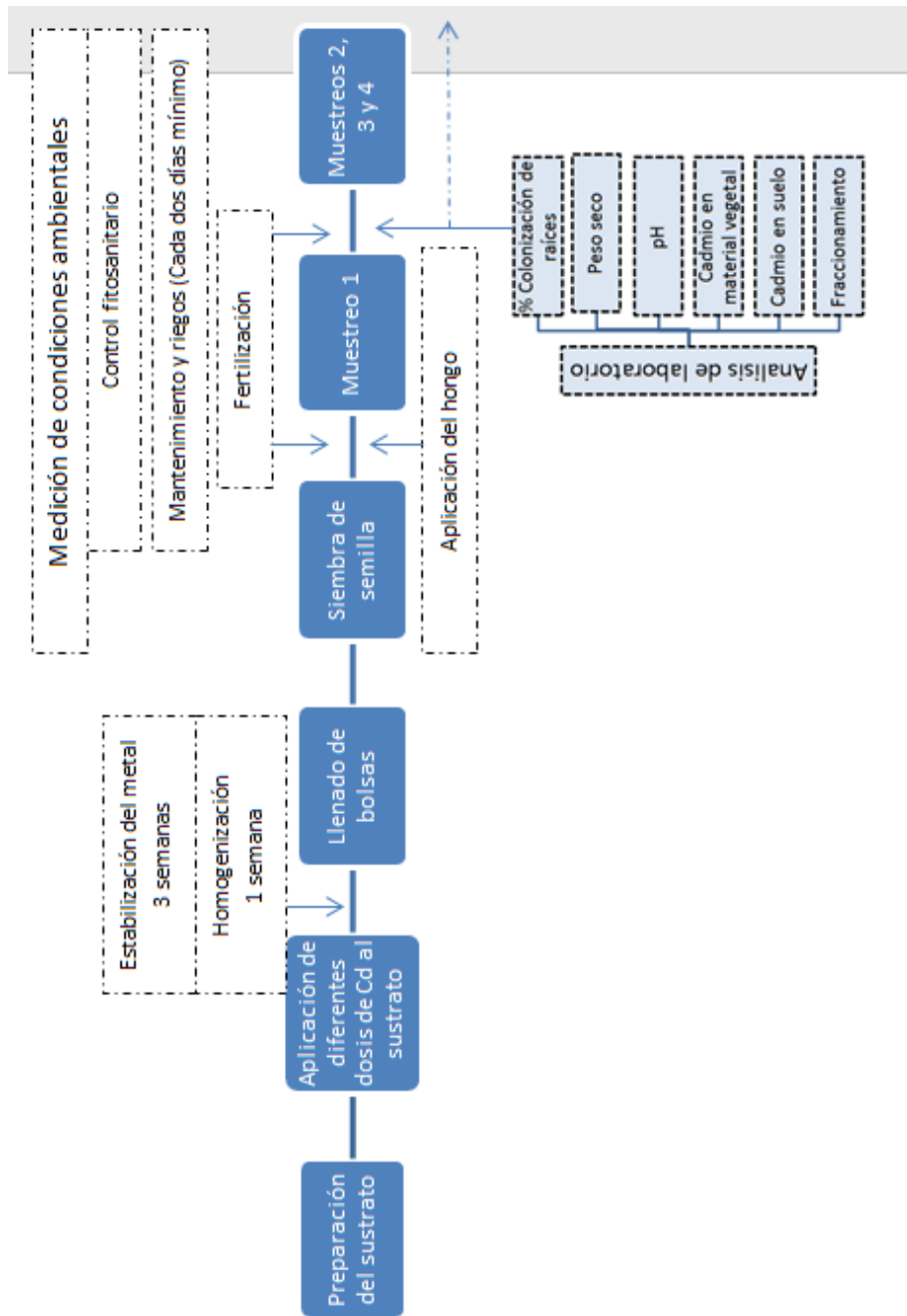


Figura 5 Diagrama general de los procesos seguidos durante el ensayo y la toma de muestras

## 4. Resultados

### 4.1. Concentración de cadmio en el suelo

Las características fisicoquímicas del sustrato utilizado para el ensayo se encuentran resumidas en la tabla 3, mostrando un pH ácido, una textura franco arenosa, un bajo contenido de materia orgánica y una baja CICE.

Tabla 3 Análisis fisicoquímico del sustrato

pH	CO	N	Ca	K	Mg	Na	Al	CICE	
	%		meq/100 g						
4,7	0,89	0,08	1,49	0,1	0,69	0,02	0,49	2,78	
P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg/kg						%			
19,1	0,37	156	9,49	2,38	0,21	9	15	76	FA

Después de la fortificación del sustrato con cloruro de cadmio, y de 3 semanas de estabilización fueron determinadas las concentraciones de Cd total con el fin de tener los valores iniciales para el ensayo. Los valores calculados para las concentraciones iniciales del ensayo y los nombres atribuidos a cada uno de los tratamientos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4 Concentraciones iniciales de cadmio en el sustrato en mg.kg-1. Tratamientos diferentes niveles de cadmio**

NOMBRE DEL TRATAMIENTO	Cadmio adicionado	CONCENTRACIÓN Cd en mg.kg-1
<b>T0</b>	0	<LD
<b>T1</b>	3	4.5
<b>T2</b>	6	5.5
<b>T3</b>	12	13.8
<b>T4</b>	24	24.3

En cuanto a la concentración de Cd total en sustrato, se observa una disminución en el tiempo, para todos los tratamientos. Aunque para la semana 5 las diferencias no son significativas para los tratamientos con y sin inoculación del hongo, éstas se van haciendo más evidentes a medida que pasa el tiempo. Así, para la semana 17 la concentración del metal en el suelo de los tratamientos inoculados se encuentra significativamente un 18% por debajo de la concentración del metal para las plantas no inoculadas. En general se observa para todos los tratamientos (incluso los que no se muestran en la figura 6) que en los suelos correspondientes a los tratamientos de las plantas inoculadas las concentraciones del metal son menores que en los suelos de las plantas no inoculadas. Para los tratamientos con concentraciones más elevadas de Cd se observan tendencias más claras. En la figura 6, se muestra la tendencia de las concentraciones de Cd total en suelo para el tratamiento T3. El comportamiento del tratamiento T4 es similar a T3 (no se muestra debido a que para la semana 17 muchas plantas de este tratamiento habían muerto y no fue posible el análisis estadístico).

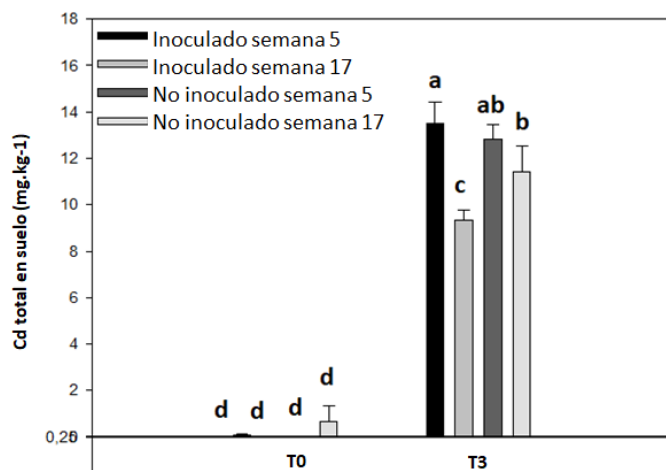


Figura 6 Dinámica en el tiempo de la concentración de cadmio total en el suelo. Representación tratamiento T3 y control T0 para las semanas 5 y 17. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

Diferencias significativas para algunos tratamientos se observan en la última semana de muestreo. Así, se puede observar que la cantidad de Cd total en el suelo para la semana 17 con respecto a la semana 5 para el tratamiento T3 fue significativamente menor en un 18 % en las plantas inoculadas comparado con las no inoculadas. En los demás tratamientos no se observaron diferencias contrastantes por lo que no se muestran acá pero se incluyen en Anexo II.

Con el objetivo de entender de forma adecuada a qué se deben estas diferencias en concentraciones del metal en el suelo dependiendo del tratamiento, se analizó simultáneamente su distribución en cada una de las fracciones evaluadas. Esto se llevó a cabo por medio del Fraccionamiento químico recomendado por la BCR, procedimiento modificado descrito en materiales y métodos y que consiste en una extracción de Tessier et al (1979) modificada en 4 pasos. De este procedimiento se obtienen 4 fracciones de Cd en el suelo, que corresponden a una fracción soluble (F1), una fracción reducible (F2), una fracción oxidable (F3) y finalmente una fracción residual (F4).

De la figura 7 y de los datos de la Tabla 5 que muestra la distribución del metal en cada una de las fracciones y su cambio en el tiempo se puede observar que en los tratamientos inoculados hay una tendencia a una distribución diferencial del metal en las fracciones del suelo.

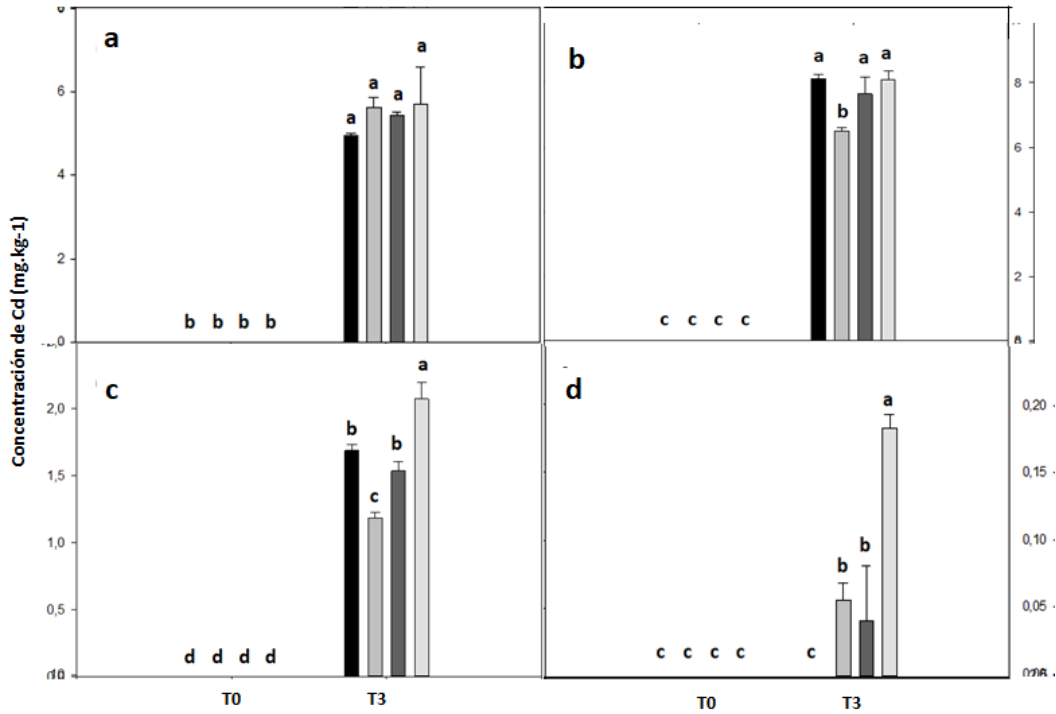


Figura 7 a, b, c y d Distribución de cadmio en las fracciones del suelo Concentración en mg.kg<sup>-1</sup> para semanas 5 y 17ds. a. Fracción 1: Intercambiable y soluble principalmente en carbonatos; b. Fracción 2: Fracción reducible (óxidos de Fe y Mn); c. Fracción 3: Fracción Oxidable (Materia orgánica y sulfuros); d. Fracción 4: Fracción residual. T0: Tratamiento control sin adición de cadmio; T3: tratamiento con adición de cadmio aprox 12 mg.kg<sup>-1</sup>. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

Se encontró que el orden en que se distribuye el elemento en el suelo en los tratamientos con y sin inoculación con *R. irregularis* es F2>F1>F3>F4. Sin embargo, se observan, especialmente en la semana 17, diferencias significativas en las concentraciones del metal en cada fracción, siendo mayor la Fracción 1 en los tratamientos inoculados. Es interesante anotar que por el contrario la fracción 3 y 4 son mayores significativamente en los tratamientos no inoculados.

Tabla 5. Porcentajes de distribución del cadmio en las fracciones del suelo, dinámica en el tiempo para las semanas 5 y 17 ds, tratamiento T3. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) para la misma semana de muestreo en las diferentes fracciones. Las diferencias en la tabla corresponden al análisis estadístico para la misma semana entre plantas inoculadas y no inoculadas.

	<u>Inoculado</u>		<u>No inoculado</u>	
	<u>Semana 5</u>	<u>Semana 17</u>	<u>Semana 5</u>	<u>Semana 17</u>
<b>Fracción 1 (%)</b>	33.5 a	42.0 a	37.0 a	35.5 a
<b>Fracción 2 (%)</b>	55.1 a	48.7 b	52.3 a	50.4 a
<b>Fracción 3 (%)</b>	11.4 a	8.8 b	10.5 b	12.9 a
<b>Fracción 4 (%)</b>	0 a	0.4 a	0.3 a	1.1 a

En la tabla 6 se especifican las características generales y la reactividad de cada una de las fracciones en las que se separó el sustrato. Dichas características permitirán conectar la disponibilidad del metal en el sustrato con su absorción por las plantas de cacao, al menos parcialmente, ya que es conocido que dicho proceso no depende solo de la disponibilidad del metal sino del tipo de cultivo, su variedad y los microorganismos asociados al sistema, entre otros.

Tabla 6 Fracciones de cadmio en el suelo y particularidades generales, reactividad. Modificado Jácome D, 2017 de Ahmadipour et al 2014.

<b>Nombre de la fracción</b>	<b>Características</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Fracción 1: F1</b>	Fracción intercambiable y unida a carbonatos	Sensible a cambios de pH
<b>Fracción 2: F2</b>	Fracción reducible o unida a óxidos de Fe y Mn	Inestable en circunstancias anóxicas, enlaza metales pesados y tiene alto poder secuestrante de MP
<b>Fracción 3: F3</b>	Fracción oxidable o unida a sustancias orgánicas	Alto poder complejante de metales pesados. En condiciones de oxidación puede liberarlos.
<b>Fracción 4: F4</b>	Fracción residual	Minerales primarios y secundarios (silicatos) que ocluyen los metales pesados en

		sus estructuras cristalinas
--	--	-----------------------------

## 4.2. Concentración del cadmio en la planta y sus órganos

Para entender la dinámica del metal es necesario estudiar también la manera en que es absorbido por la planta y como se distribuye en sus diferentes órganos con el fin de determinar si hay una distribución diferencial en las plantas inoculadas y en las plantas control. En este proceso es importante entender que en general los sistemas agrícolas y en particular el nuestro, son sistemas complejos cuya respuesta dependerá no solo de la presencia o ausencia de hongo sino de su identidad y la de la planta hospedera y sus interacciones, el pH del sistema, el tipo de suelo, la reproducibilidad entre muestras debido a la variabilidad genética entre plantas, entre otros.

De la figura 8 se observa que para todos los tratamientos hay una mayor acumulación de Cd en la parte aérea que en la raíz, distribución que se mantiene en el tiempo. Es interesante notar que la concentración de Cd en la parte aérea es mayor para todos los tratamientos en plantas inoculadas con el hongo en comparación con las no inoculadas. Sin embargo, las concentraciones del metal en la semana 17 disminuyeron con relación a la semana 5 en la parte aérea, principalmente en los tratamientos con concentraciones altas de cadmio.

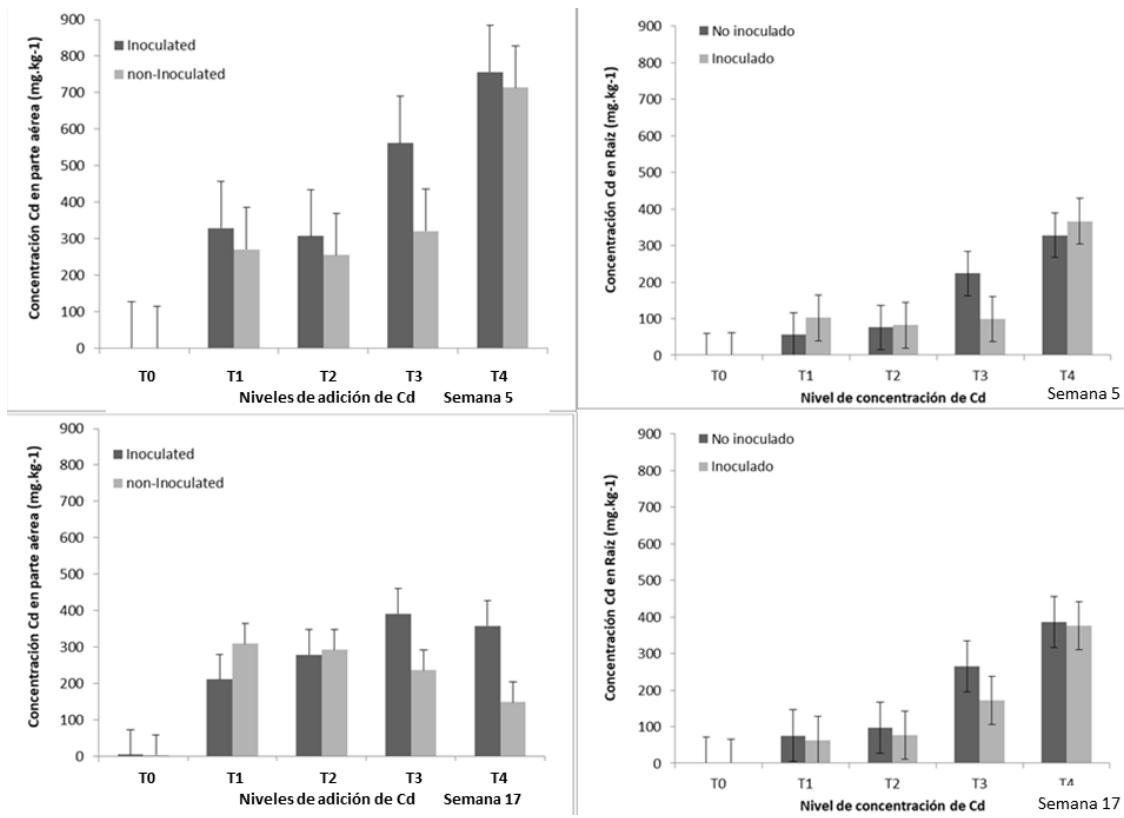


Figura 8 a, b, c y d Acumulación de cadmio ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masa seca) en la parte aérea y raíz para las semanas 5 y 17. Las barras verticales indican la desviación estándar de los datos

De la tabla 7 se puede observar además que la distribución del Cd en la planta cambia con el tiempo y depende de la concentración del metal en el suelo. De esta manera, para el muestreo a las 5 semanas después de siembra (sds), la distribución del metal para las concentraciones bajas (T1 y T2) es Tallo>Hojas>Raíz independientemente de si las plantas fueron o no inoculadas. Sin embargo, se observa un efecto interesante para las concentraciones altas (T3 y T4) en las que esta distribución se conserva para los tratamientos inoculados pero cambia para las plantas no inoculadas a Tallo>Raíz>Hojas con diferencia significativas para cada concentración en las concentraciones altas de Cd.

Tabla 7 Dinámica del cadmio en la planta para todos los tratamiento en las semanas 5 y 17 ds. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en diferentes tiempos de muestreo ( $F < 0.05$ ).

		HOJAS		RAIZ		TALLO	
		5 sds	17 sds	5 sds	17 sds	5 sds	17 sds
T0	Inoc	0	0	0	0	0	0
	No Inoc	0	0	0	0	0	0
T1	Inoc	26.6 a	41.5 a	23.7 a	19.8 a	49.7 a	38.7 a
	No Inoc	29.0 a	41.0 a	17.3 a	19.6 a	53.8 a	39.4 a
T2	Inoc	31.6 a	<b>40.0 a</b>	21.1 a	<b>21.1 a</b>	47.3 a	38.9 a
	No Inoc	30.1 a	<b>35.3 b</b>	23.3 a	<b>25.5 b</b>	46.5 a	39.2 a
T3	Inoc	<b>28.4 a</b>	28.5 a	<b>15.0 a</b>	<b>28.2 a</b>	<b>56.6 a</b>	<b>43.3 a</b>
	No Inoc	<b>19.6 b</b>	27.2 a	<b>41.0 b</b>	<b>35.8 b</b>	<b>39.3 b</b>	<b>36.9 b</b>
T4	Inoc	<b>21.8 a</b>	--	<b>32.6 a</b>	--	<b>45.5 a</b>	--
	No Inoc	<b>22.4 b</b>	--	<b>31.5 b</b>	--	<b>46.1 b</b>	--

De manera gráfica se puede observar en la figura 7 cómo para el tratamiento T3 la concentración de Cd en la parte aérea es mayor que en las raíces y cómo a medida que pasa el tiempo se va redistribuyendo el metal en la planta, siendo al final más baja la concentración.

De la Figura 9, se observa en la concentración de la parte aérea disminuye con el tiempo, más en las plantas inoculadas. En la raíz disminuye más en las plantas inoculadas y en las no inoculadas permanece constante la cantidad de Cd absorbido a lo largo de las 17 semanas de análisis.

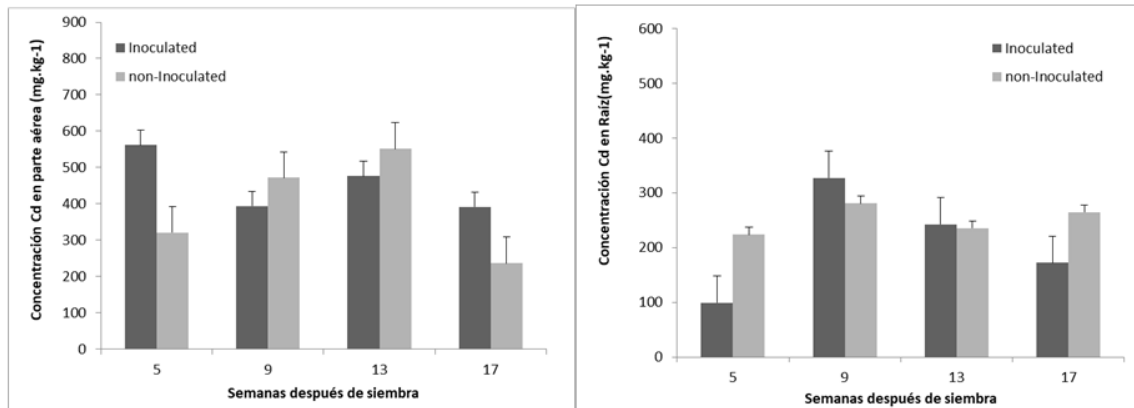


Figura 9 a y b Acumulación de cadmio en los órganos de la planta para el tratamiento T3

#### 4.2.1. Eficiencia de la absorción

En general se observó que la Eficiencia en la absorción de Cd por las plantas aumenta a medida que aumenta la concentración del metal en el suelo. Para el análisis de la eficiencia de absorción del metal por parte de la planta y con el fin de comparar cómo va cambiando la dinámica del elemento en el tiempo, se incluyen los resultados de las semanas 5 y 13 ds. Los resultados para la semana 17 para el tratamiento T4 muestran tendencias similares a la semana 13 para el mismo tratamiento y dado que en la semana 17 había pocas plantas de este tratamiento, estos resultados no se muestran porque, no es posible hacer análisis estadístico, sin embargo se incluyen en Anexo III.

Los resultados, en la Figura 10 muestran que para las primeras semanas del ensayo no hay diferencias significativas en la Eficiencia de absorción entre las plantas inoculadas y las no inoculadas en ninguno de los niveles de cadmio. Sin embargo, para la semana 13 ds, es interesante que la eficiencia de la absorción es menor en las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas que presentan valores de absorción más altos. Se calculó que las plantas inoculadas presentaron valores 46 y 77% inferiores en este parámetro a las plantas no inoculadas para los tratamientos T3 y T4 respectivamente. En las concentraciones bajas no se encontraron diferencias significativas para la inoculación de las plantas con *Rhizophagus irregularis*.

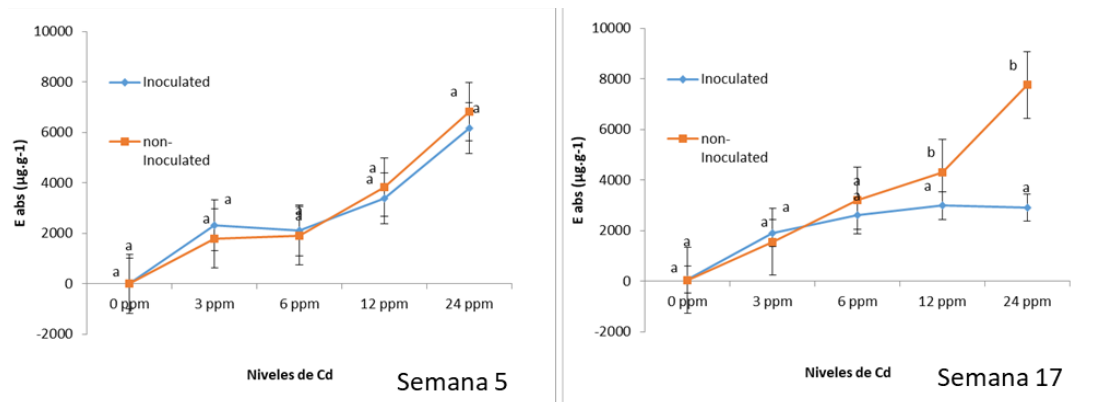


Figura 10 a y b Eficiencia de la absorción de cadmio por la planta. Semanas 5 y 13 para todos los tratamientos de cadmio (GLO: Inoculadas, Control: No inoculadas)

### 4.2.2. Eficiencia de la translocación

La Eficiencia de la translocación, al contrario de la Eficiencia de la absorción muestra tendencia a disminuir a medida que se aumenta la concentración de cadmio en el sustrato y a medida que pasa el tiempo. Comparadas con las plantas no inoculadas, la Eficiencia en la translocación de las plantas micorrizadas para los tratamientos con baja concentración de cadmio (T0, T1 y T2) no muestran diferencias significativas hasta la semana 13 (figura 11 a y b)

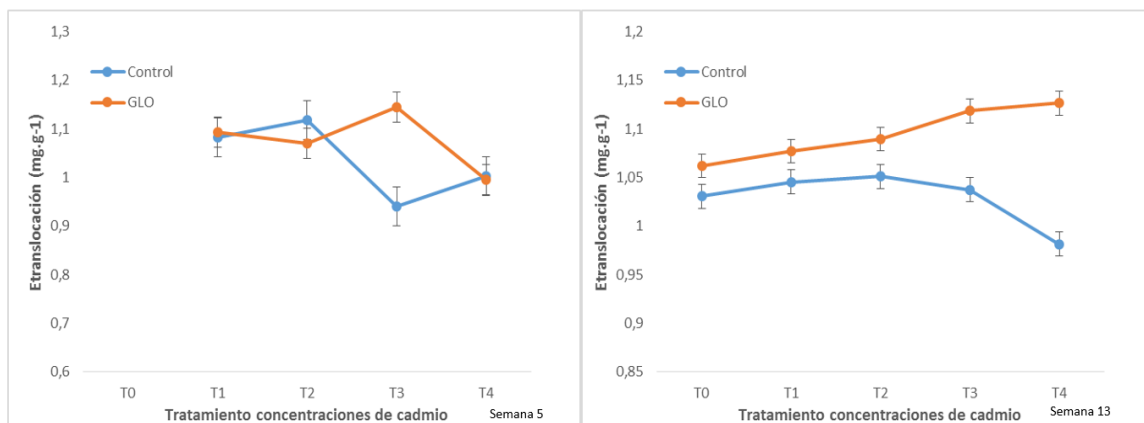


Figura 11 a y b Eficiencia en la translocación del metal para todos los tratamientos de cadmio. Semana 5 y 13 ds.

Sin embargo, para la semana 13 se encuentran diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas, donde la translocación es ligeramente mayor, aprox. 11 y 14% para los tratamientos T3 y T4, respectivamente.

### 4.2.3. Eficiencia de la fitoextracción

La eficiencia de la fitoextracción al igual que la Eficiencia en la absorción aumenta para las plantas inoculadas y no inoculadas a medida que aumenta la concentración de cadmio en el sustrato y a medida que pasa el tiempo. No se observan diferencias significativas entre tratamientos, excepto para T4 a partir de la semana 13 ds (Anexo IV)

De la figura 12 se observa que, no obstante, a medida que pasa el tiempo se marcan diferencias entre las plantas inoculadas y no inoculadas en cuanto a la eficiencia en la fitoextracción, es decir, la capacidad que tienen las raíces de transportar el Cd que se encuentra en ellas en un momento dado a la parte aérea. Para el tratamiento T3 en la semana 17 disminuye aproximadamente un 14% con relación a la Eficiencia en la semana 5 ds.

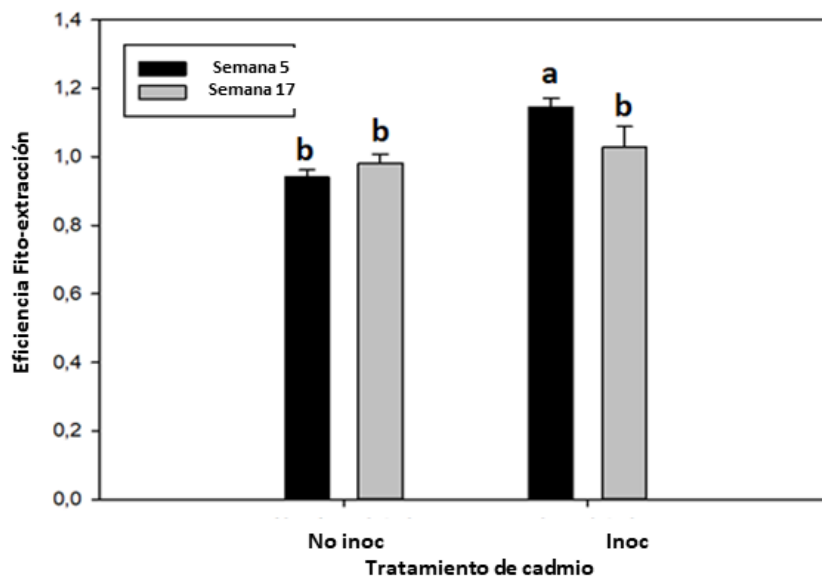


Figura 12 Eficiencia en la fito-extracción para el tratamiento T3. Semanas 5 y 17 ds. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ )

#### **4.2.4. Parámetros fisiológicos: fluorescencia Indicadores de estrés.**

Los cambios en el desempeño del aparato fotosintético en las plantas por acción del Cd han sido revisados por varios autores (Prasad, 1995; Pál et al., 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2009). Por este motivo durante el ensayo se midieron las respuestas de algunos parámetros fisiológicos comúnmente usados como indicadores de estrés, como la relación  $F_v/F_m$ , el contenido de clorofilas y el índice de rendimiento (PI).

El rendimiento relativo del fotosistema II puede cambiar con factores abióticos tales como déficit de agua, temperatura o presencia de metales pesados, y medir el rendimiento del PSII puede proveer información importante sobre las relaciones planta-ambiente (Oyetunji et al, 2007). La medición de la fluorescencia de la clorofila en las hojas da información directa sobre el proceso fotosintético. La intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la concentración de las moléculas de clorofila excitadas, lo que sugiere que un cambio en la fluorescencia puede relacionarse a un cambio en la eficiencia de la fotosíntesis, siendo así una medida de la capacidad fotosintética de las hojas de las plantas. La aparición de daños por estrés siempre van acompañados por una disminución en la fluorescencia de la clorofila.

La relación entre la fluorescencia variable ( $F_v$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) corresponde a la eficiencia fotoquímica del PSII, que está directamente relacionada con su eficiencia cuántica y es usada, por lo tanto, como una prueba diagnóstica para medir estrés. Una hoja saludable generalmente arroja resultados de  $F_v/F_m$  alrededor de 0.80 (Oyetunji et al, 2007). Valores inferiores indican estrés por daños en el PSII.

En la figura 13, se observa el efecto de los diferentes tratamientos sobre el índice de máximo rendimiento fotosintético ( $F_v/F_m$ ) para plantas de cacao en la semana 5. Es importante notar que el tiempo de exposición hizo evidente por medio del análisis de este parámetro un estrés en todas las plantas tanto inoculadas como no inoculadas. Por otra parte, no se observan diferencias en los resultados para los tratamientos con bajas concentraciones de cadmio en ninguno de los muestreos. Sin embargo, para la semana 5, se observó para los tratamientos T3 y T4 un alivio del estrés causado por la alta

concentración del metal en las plantas inoculadas al ser comparadas con las no inoculadas.

En el análisis de los resultados de la eficiencia fotosintética del PSII, se observó un efecto positivo del hongo sobre las plantas, evidente sobre todo en las primeras semanas del ensayo. Las diferencias se hacen menos marcadas a medida que pasa el tiempo. En la figura 13 se observa un efecto marcado de alivio en el estrés del hongo sobre los tratamientos de concentraciones altas de cadmio, donde las plantas, para la semana 5, aún no muestran síntomas fisiológicos de estrés, mientras que las plantas no inoculadas si lo hacen. Esto concuerda con los resultados de Mo *et al.* (2016), quienes encontraron un alivio inicial del estrés en plantas de melón inoculadas, reflejado en parámetros fisiológicos como niveles de  $P_n$ ,  $F_v/F_m$ ,  $\Phi PSII$ , ETR, y  $qP$ , que se hacen menos evidentes con el tiempo.

El efecto del alivio del estrés es menos evidente en los últimos muestreos debido a la mayor interacción de las plantas con el cadmio.

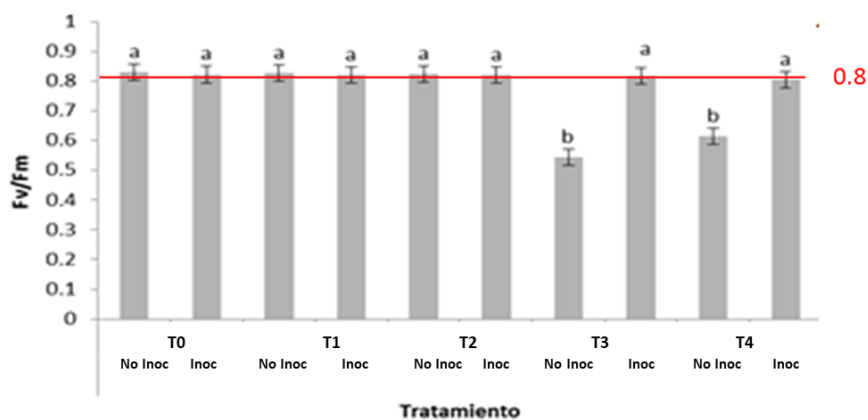


Figura 13 Eficiencia del fotosistema II. Relación  $F_v/F_m$  para todos los tratamientos de cadmio, semana 5. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Es interesante notar el alivio en el estrés, representado por mayores valores de la relación  $F_v/F_m$  en las plantas micorrizadas con altas concentraciones de cadmio, fenómeno que se observa principalmente en las primeras semanas de crecimiento de las plantas. Diversos estudios han mostrado que el cadmio daña el aparato fotosintético, en particular el complejo donde entra la luz y los fotosistemas I y II (Krupa et al, 1993; Siedlecka et al.,

1997), provoca el cierre estomático en plantas superiores (Poschenrieder et al, 1989) y en general una inhibición de la fotosíntesis (Mohamed et al, 2012)

El contenido de clorofila es otro de los indicadores de estrés en plantas más usado debido a que se puede medir fácilmente en campo con equipos portátiles y se considera un buen indicador de estrés ya que una disminución en la síntesis de la clorofila tendrá un efecto perjudicial en el rendimiento del quantum del fotosistema II (PSII) el cual a su vez está directamente relacionado con la fisiología del estrés de plantas.

Los resultados obtenidos, como se evidencia en la figura 14, muestran una disminución en el índice de clorofilas a medida que se aumenta la concentración del cadmio, lo que evidencia los efectos nocivos del metal para las plantas de cacao. No se observan diferencias significativas para ninguno de los tratamientos para las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas.

Es muy interesante notar que para el tratamiento T0 correspondiente al suelo sin adición de cadmio, la cantidad de clorofilas aumenta con el tiempo, lo cual tiene relación con un mayor número de hojas en las plantas más grandes, por lo tanto una mayor cantidad de centros reactivos para la fotosíntesis. De la figura 14 se observa que para T0 el contenido de clorofilas es menor en la semana 5 para las plantas inoculadas y va aumentando hasta que en la semana 17 es igual al de las plantas no inoculadas. En otros estudios se han reportado resultados contrarios a los obtenidos aquí, observándose incremento en el contenido de clorofilas totales para las plantas inoculadas (Wodala et al., 2012), además se ha observado que la clorofila a es más sensible al Cd que la clorofila b (Ekmekci et al, 2008; Wang et al., 2009), llevando a una disminución en la relación de clorofilas a/b.

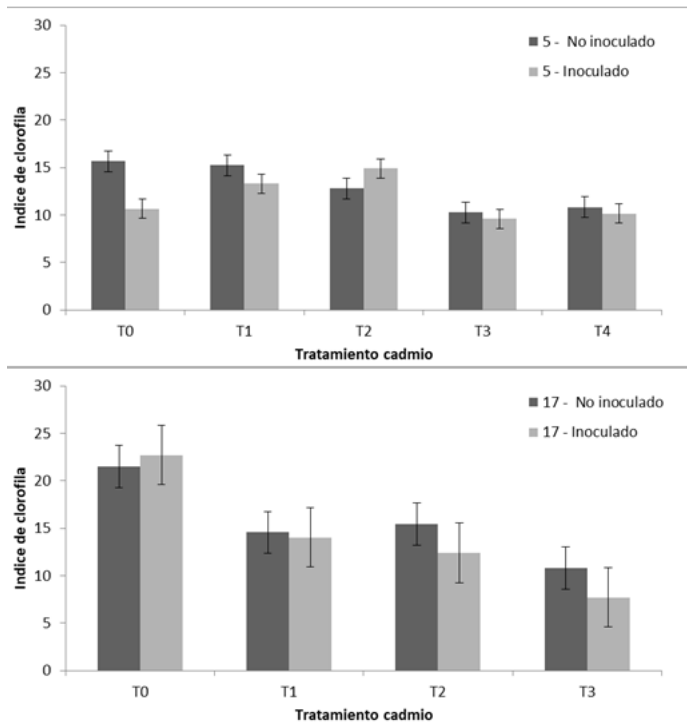


Figura 14 Índice de clorofilas para todos los tratamientos semanas 5 y 17 ds.

Por otra parte, otro parámetro que se ha utilizado con menos frecuencia para describir los efectos nocivos de metales pesados sobre plantas sometidas a estrés, es el PI (Índice de vitalidad) que parece ser un mejor indicador cuando se trata de plantas micorrizadas.

De los resultados obtenidos se observa que al igual que lo que se vio con la relación  $F_v/F_m$ , el índice de vitalidad es mayor para las plantas inoculadas sobre todo en las primeras semanas de ensayo, con el paso del tiempo las diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas se hacen menos notorias. Del mismo modo se observa un efecto de la concentración de cadmio sobre las plantas, a mayor concentración del metal menor el PI para el sistema.

Para los demás parámetros evaluados relacionados con la fisiología de la planta, como la conductividad estomática y otros parámetros relacionados con fluorescencia, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los muestreos para las plantas inoculadas y las no inoculadas, por lo que no se muestran en el presente trabajo.

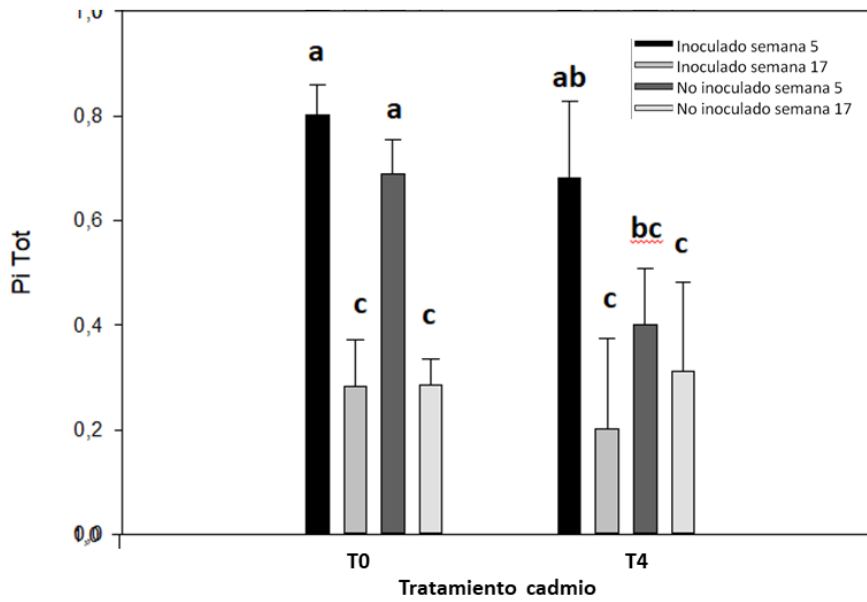


Figura 15 PI (Índice de rendimiento) semanas 5 y 17 ds. Tratamientos T0 y T4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos  $P(<0.05)$ .

### 4.3. Colonización micorrícica

La colonización micorrícica fue detectada en todos los tratamientos con y sin inoculación del hongo y a todos los niveles de concentración de Cd utilizados. Esto demuestra la presencia natural de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en suelos de uso agrícola. Las estructuras observadas y cuantificadas corresponden a las zonas teñidas resultantes de la tinción de las raíces que se muestran en la Figura 17.



**Figura 16 Fotografía de raíces de cacao colonizadas por hongos FMA**

Fuente: Diana Jácome, 2016. Equipo utilizado: Estereoscopio Nikon Z 1000 Magn. 8x

Se observó que el porcentaje de colonización de las raíces fue en aumento a medida que pasaba el tiempo, desde la semana 5 hasta la semana 17, para cada uno de los tratamientos y los valores medios más altos de colonización (32.6%) se encontraron para el tratamiento de 6 mg.kg<sup>-1</sup> en la última semana de estudio. Para valores mayores de concentración, se observa una colonización más baja, registrándose valores máximos de 15%. A pesar de la variabilidad de los datos, se encontró que para todos los tratamientos y sobretodo en las primeras semanas, hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de colonización entre plantas inoculadas y no inoculadas (Tabla 9).

**Tabla 8 Porcentaje de colonización de raíces de cacao por *R. irregularis* en sustrato con diferentes niveles de concentración de cadmio.**

Nivel de adición de Cd (mg.kg-1)	Tratamiento hongo	% de colonización semana 5	% de colonización semana 13	% de colonización semana 17
0	No inoculado	5.6	14.6	23.4
	Inoculado	7.3	23.5	32.6
3	No inoculado	4.8	9.4	29.9
	Inoculado	9.4	21.4	27.5
6	No inoculado	2.0	20.0	17.4
	Inoculado	5.4	27.1	31.5
12	No inoculado	2.5	8.8	15.3
	Inoculado	12.6	11.6	12.3
24	No inoculado	1.2	3.8	nd
	Inoculado	12.4	2.2	nd

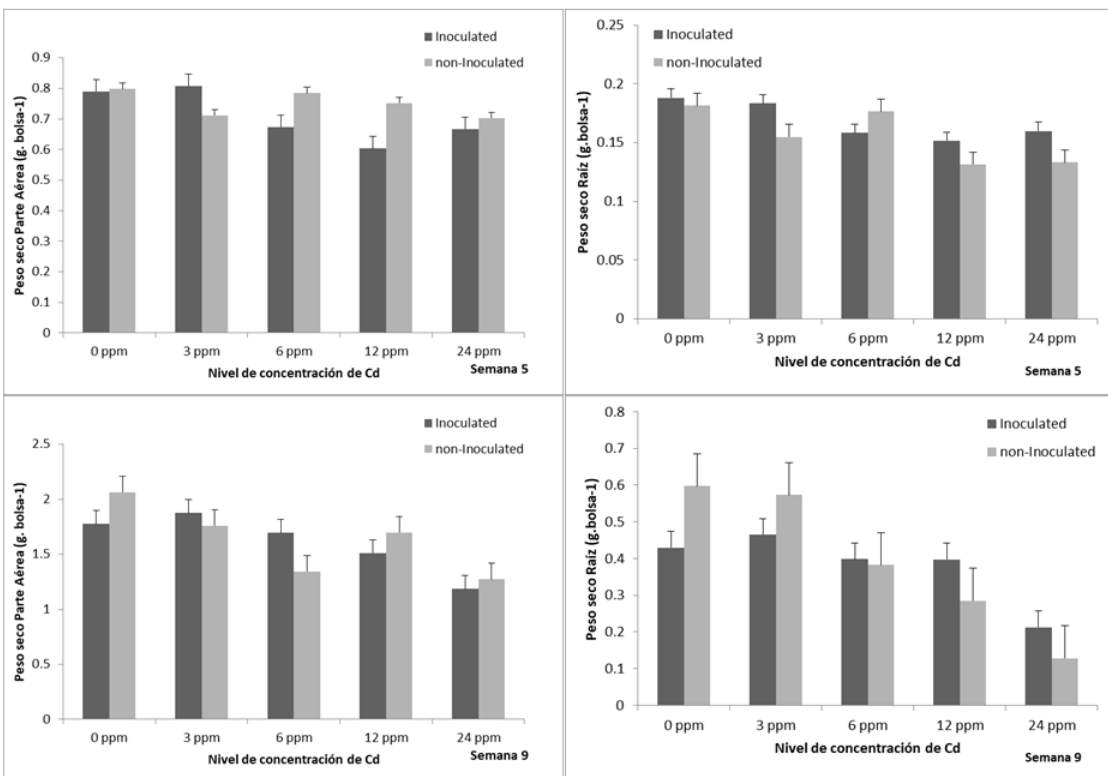
nd –no determinado

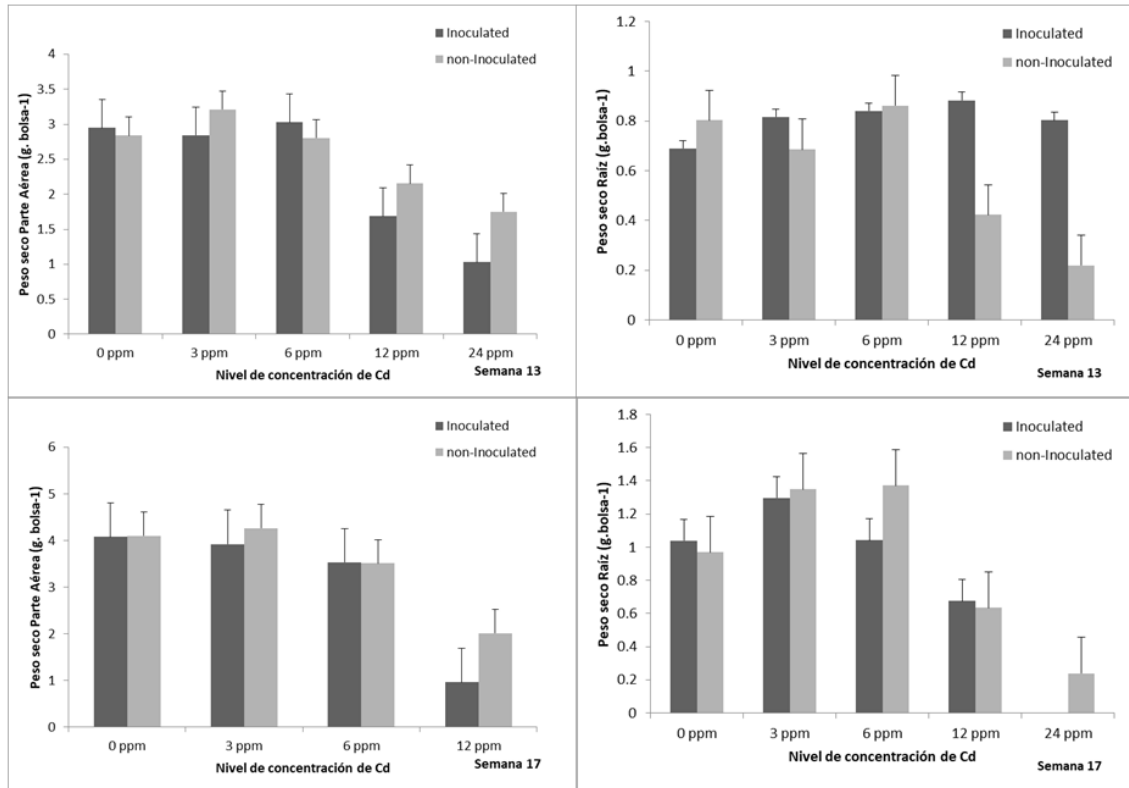
#### 4.4. Otras variables medidas:

##### 4.4.1. Biomasa en plantas

El crecimiento de las plantas se vio disminuido a medida que aumentó la concentración de Cd en el sustrato. Se observa que la producción de biomasa expresada como peso seco en todas las partes de la planta (raíz, tallo, hojas) fue significativamente menor ( $P < 0.001$ ) para las concentraciones altas de Cd (Figura 18). Para los niveles bajos de Cd (0, 3 y 6 mg.kg-1) no se observó efecto del hongo ni diferencias significativas entre los tratamientos con y sin inoculación.

Durante las primeras semanas se observó un comportamiento bastante homogéneo en cuanto a producción de biomasa en la parte aérea de las plantas inoculadas y las no inoculadas, sin embargo, es posible notar diferencias marcadas cuando observamos los resultados de las pruebas realizadas a las muestras durante las semanas 13 y 17 donde la producción de biomasa en la parte aérea para las plantas inoculadas fue aproximadamente 25% y 200% menos que para las plantas no inoculadas en la concentración de 12 mg.kg<sup>-1</sup>. Para la concentración de Cd de 24 mg.kg<sup>-1</sup> para la semana 17 la producción de biomasa de las plantas inoculadas no se pudo observar ya que la mayoría de plantas habían muerto para este momento (Figura 18).





**Figura 17 Pesos secos de raíz y parte aérea de plántulas de cacao en vivero bajo diferentes niveles de concentración de cadmio con y sin inoculación de *R. irregularis***  
 Las barras oscuras representan los resultados de los tratamientos inoculados y las barras claras los tratamientos no inoculados.

En cuanto a la relación raíz/parte aérea, las concentraciones bajas de cadmio (T0, T1 y T2) no mostraron diferencias significativas entre plantas inoculadas y no inoculadas. Como se observa en la figura 19, para las concentraciones altas (no se muestra T4 debido a que para la semana 17 la mayoría de plantas habían muerto, pero su comportamiento fue similar al de T3) se observa un aumento significativo en la relación raíz/parte aérea con el tiempo, y para la semana 17 hay una marcada diferencia entre las plantas inoculadas y las no inoculadas. Las primeras presentan una relación mayor, lo que quiere decir que las raíces de las plantas inoculadas fueron más largas en comparación con las plantas que no tenían *R. irregularis*. Esto como se ha evidenciado en muchos artículos le da una ventaja a las plantas inoculadas ya que pueden explorar una mayor área del suelo, lo que redundará, principalmente, en una mayor toma de nutrientes.

#### 4.4.2. Biomasa Relación raíz parte aérea

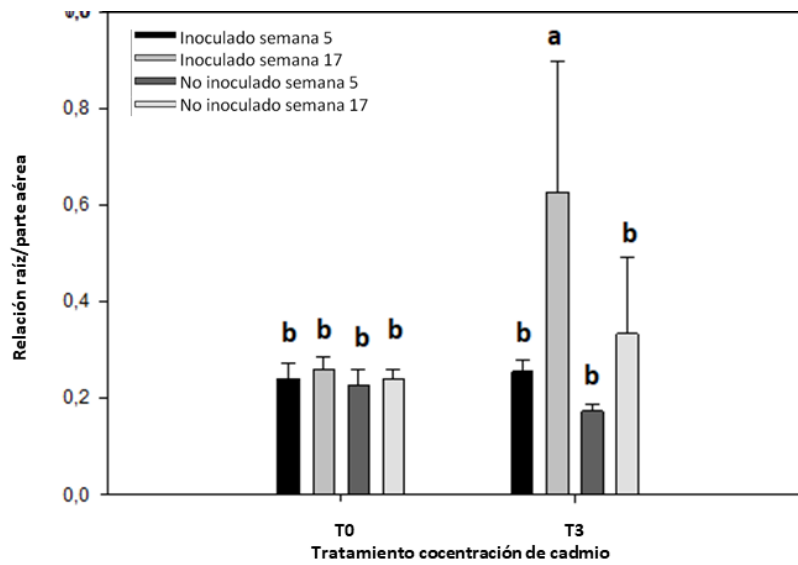


Figura 18 Relación raíz/parte aérea para las semanas 5 y 17 ds. Tratamientos T0 y T3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $F < 0.05$ )

## 5. Discusión

En la presente investigación se realizó el seguimiento de las concentraciones de cadmio total así como su distribución en las diferentes fracciones del suelo con el fin de determinar la dinámica del metal en el sistema cuando se tenían tratamientos con y sin inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA).

La comprensión de la dinámica y las interacciones de los metales pesados en sistemas vivos depende no solo de la concentración del metal, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino, et al, 2002). De modo que para elucidar el comportamiento de los metales pesados en los suelos y prevenir los riesgos potenciales de toxicidad, se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat et al., 2005) tal y como se hizo en el presente estudio.

Aunque la toxicidad de un elemento está definida más por su biodisponibilidad que por su concentración, la determinación del contenido total del elemento es necesaria para identificar el nivel de contaminación de los suelos.

### **5.1 Efecto de la inoculación con *R. irregularis* en el fraccionamiento del Cd en el suelo y su efecto en el tiempo**

El cadmio es un elemento que por sus características químicas posee un alto poder de acumulación en el suelo y debido a esta propiedad y a su alta reactividad es importante conocer su dinámica en el suelo. Por primera vez, y gracias al abordaje de este trabajo, se logró establecer en campo y en condiciones del trópico ácido que las concentraciones de Cd para todas las fracciones son proporcionales a la

concentración total en el suelo. Es decir, a mayor concentración de cadmio en el sustrato, mayor concentración en las diferentes fracciones. Igualmente importante, se logró establecer que el efecto del hongo FMA, solo se observa para la fracción F2, que corresponde a la fracción reducible o unida a óxidos de Fe y Mn y se observa además que su dinámica en el tiempo va cambiando. En la semana 5 es mayor la concentración de cadmio en esta fracción para los tratamientos con inoculación sobre los no inoculados y, en oposición a este resultado, para la semana 13 y 17 la dinámica cambia observándose un aumento en la concentración del cadmio en los tratamientos sin inoculación, pero no en el suelo de las plantas inoculadas con el hongo FMA. Este resultado es fundamental pues indica que sin el efecto de la inoculación con HFMA, la dinámica temporal del Cd en el suelo es volverse más disponible generando potencialmente un mayor riesgo de toxicidad en el sistema.

Por su origen antrópico se espera que la concentración del metal sea inicialmente mayoritaria en las fracciones más solubles ya que los procesos de adsorción son más lentos. Los metales se reparten lentamente entre los componentes de la fase sólida del suelo, su distribución se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones lentas, dependiendo de las especies del metal, propiedades del suelo, nivel de introducción y tiempo (Han et al, 2003). Así, de acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo, se observa que al pasar el tiempo se van encontrando pequeñas cantidades de cadmio en las fracciones menos disponibles (T3 y T4) lo cual concuerda con lo observado por Taylor y Percivar (2001) quienes reportan que el metal libre como  $Cd^{2+}$  se encontró entre el 55-90% de la solución de cadmio en el suelo inicialmente. Del mismo modo Janouskova et al (2009) encontraron menos cadmio disponible en sustrato con inóculo que sin inóculo. Estos reportes corroboran los resultados encontrados en este trabajo.

Adicionalmente, el efecto de la inoculación con HFMA sobre las fracciones F2 y F3 les de gran importancia por su repercusión directa sobre la dinámica del Cd en el suelo. En los horizontes superficiales, al igual que el níquel o el zinc, el cadmio aparece ligado generalmente a formas orgánicas, sin embargo, la fracción más disponible para las plantas parece ser la asociada a óxidos de Fe y Mn. Por este

motivo la dinámica temporal que se observa en la fracción F2, muestra un alto potencial mitigador de los efectos de la contaminación por Cd en las plantas de cacao, ya que al disminuir la concentración en esta fracción, se hace también menos disponible el metal con el tiempo para ser absorbido por la planta. Del mismo modo, se observa que la fracción F3 tiene la misma dinámica, es decir en la semana 5 es mayor en las plantas inoculadas y para la semana 17 disminuye, siendo mayor en las plantas no inoculadas. Se recomienda que en futuros estudios estas dos fracciones se estudien con más detalle y que el periodo de tiempo se extienda con el fin de tener más información a partir de modelos agrícolas reales, como el utilizado en este trabajo.

## 5.2 Variación temporal de los niveles de Cd en el suelo

Los resultados del estudio de la dinámica temporal del cadmio en el suelo muestran que las concentraciones iniciales para cada tratamiento fueron disminuyendo con el tiempo. Estos resultados se pueden explicar parcialmente con los niveles del cadmio absorbido por las plantas, lo que se analizará más adelante. El efecto de la inoculación con *R. irregularis* sobre la concentración de cadmio total no es evidente en los primeros muestreos. Sin embargo a partir de la semana 17, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones del metal que se pueden explicar por la presencia del hongo FMA en el sistema. Este cambio en la concentración del metal, como se observa en la figura 6 es más significativo para los tratamientos con concentraciones altas de cadmio. Al final del ensayo, los suelos de los tratamientos con inoculación presentaron menor concentración de cadmio en el suelo, en el caso del tratamiento T3 correspondiente a una concentración de  $13.8\text{mg.kg}^{-1}$  de Cd, presentó un 18% menos concentración de cadmio con respecto al tratamiento con la misma concentración pero sin inoculación. El tratamiento T4 con una concentración inicial de cadmio de  $24.3\text{mg.kg}^{-1}$ , presentó tendencias similares a T3. Así, es evidente que los HFMA pueden jugar un papel importante en la rehabilitación de suelos contaminados con Cd, y su efecto es más relevante en el caso de contaminaciones altas (tratamientos T3 y T4) y posiblemente en suelos provenientes de actividades mineras, es decir donde las fuentes de contaminación sean antrópicas.

Este fenómeno observado, debe estudiarse con más detalle para definir las causas de la disminución de la concentración del metal en el suelo, ya que como no es un sistema cerrado no es fácil atribuir los efectos a un solo factor, es decir, aunque hay una correlación directa entre la cantidad de cadmio en el sustrato y la cantidad de cadmio tomado por las plantas (0.72), sería arriesgado atribuir todos los cambios en la concentración de cadmio en el suelo sólo a lo absorbido por la planta ya que sabemos que los sistemas agrícolas son mucho más complejos.

Es importante notar que para las concentraciones bajas de cadmio, T0, T1, T2 no se observan efectos diferenciales por la presencia del hongo en el resultado del cadmio total en el suelo en concentraciones bajas de cadmio.

### **5.3 Factores que influyen en la especiación del Cd**

Más importante que el contenido total o pseudo-total de los metales pesados en suelos, es la identificación de la distribución en las diferentes formas físicas o químicas del suelo (especiación) de esos metales, ya que estos tienen una relación directa con su comportamiento geoquímico, su biodisponibilidad, toxicidad química y biológica y por lo tanto su potencial contaminante (Nirel & Morel, 1990). En el marco de la asociación de HFMA y plantas de uso comercial, este trabajo constituye la primera aproximación al problema asociado al contenido de cadmio biodisponible que podría moverse para introducirse a la cadena alimenticia y afectar a plantas y otros organismos en el sistema de cultivo mediante una extracción fraccionada del cadmio en el sustrato. Como resultado del procedimiento utilizado se encontró que el cadmio se distribuye en el sustrato en el siguiente orden:  $F_2 > F_1 > F_3 > F_4$ , resultados que concuerdan con lo encontrado por Ahmadipour et al. (2015) para suelos contaminados con Cd y Pb en Irán.

La importancia de estos resultados radica en que se tiene una primera aproximación de la distribución del metal en suelos ácidos del trópico similares a los utilizados en el cultivo de cacao en el país. Es importante notar que la dinámica del metal se espera que sea diferente si el mismo proviene de fuentes geogénicas o antropogénicas. En el caso de contaminación de origen antrópica es conocido

que en general su movilidad es muy baja, quedando acumulado en los centímetros superiores del suelo, siendo lixiviado a horizontes inferiores en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, esto va a depender de las características del suelo en donde se presente la contaminación, como el pH, la textura, el contenido de materia orgánica entre otros.

En nuestro caso, el contenido de materia orgánica es muy bajo lo que explica que no se haya encontrado una alta concentración de Cd en la fracción F3, correspondiente a la fracción unida a la materia orgánica. Por el contrario, el mayor porcentaje del cadmio adicionado se encontró en las fracciones F1 y F2 que corresponden a las fracciones con mayor disponibilidad en el suelo. Así, la distribución encontrada del metal en las fracciones del suelo para los tratamientos con y sin inoculación fue  $F2 > F1 > F3 > F4$ . Es decir que las fracciones F1 y F2 que son las más biodisponibles son las que contienen mayor concentración de cadmio, esto explica que las plantas puedan tomar con mayor facilidad el metal ya que está más biodisponible.

En suelos ácidos la disponibilidad del cadmio es mayor que en suelos con pH más alto y aumenta a medida que se disminuye el pH del sistema. Este tema es fundamental en ésta región, dado que el 81% los suelos en el trópico en América son ácidos, en Colombia particularmente el 85% de los suelos son ácidos y tiene pH igual o inferior a 5.5 con altas concentraciones además de Al intercambiable (Arcos & Narro 2009).

La concentración de los metales pesados en el suelo depende básicamente de la forma en que estos elementos se muevan dentro del sistema. Los mecanismos de movilidad, transporte y distribución en el sistema están íntimamente ligados con la forma química y con las interacciones fisicoquímicas que estos metales sostengan con las metales y ligandos del medio y con los constituyentes del suelo, como lo minerales de arcilla, óxidos de Fe y Mn, Aluminio y Carbonatos. Estos mecanismos son básicamente procesos de dilución, adsorción, precipitación, oclusión, migración, acomplejamiento, difusión en los minerales, unión con constituyentes orgánicos, absorción por la micro biota y volatilización entre otros (Paradelo et al, 2011).

El sustrato utilizado en este trabajo, por presentar un alto contenido de arena carece de capacidad de fijación, por lo que el Cd no puede unirse fácilmente a la fase sólida mediante procesos de adsorción, debido a su baja superficie específica, en cambio se encuentra una mayor concentración en las fases disueltas o fácilmente extraíbles debido también a la forma química en la que fue aplicado el Cd ( $\text{CdCl}_2$ ). Con el paso del tiempo va aumentando la cantidad de cadmio en las fracciones menos lábiles del suelo (F3 y F4) lo cual concuerda con lo hallado por Oliveira et al (2003) sugiriendo que con el tiempo de incubación, el Cd adsorbido a los compuestos inorgánicos amorfos de Mn y Fe se van convirtiendo a formas ocluidas en la medida que estos compuestos aumentan el grado de cristalización y se vuelven, por lo tanto, menos solubles. Así, este modelo experimental permitió realizar extracciones secuenciales que dan información sobre el modo de ocurrencia, disponibilidad biológica y fisicoquímica, movilización y transporte de los metales pesados. De esta manera, con el método de extracción utilizado se obtienen 4 fracciones con las características que se muestran en la tabla 7.

### **5.3.1 Efecto de la inoculación con *Rhizophagus irregularis* en las fracciones del suelo**

Por sus características, el análisis que se presenta acá, de las fracciones de Cd en el suelo, permite entender los mecanismos de interacción mediante los cuales los hongos FMA pueden ayudar a mitigar el estrés por cadmio. Los resultados obtenidos, en corto tiempo, muestran una dinámica del metal en las fracciones del suelo que cambia con el tiempo, lo cual concuerda con lo descrito por Rodríguez, et al (2009).

El efecto de la concentración de cadmio en todos los tratamientos se manifiesta de manera evidente (Figura 7;  $P < 0.01$ ). También se observa que el efecto del hongo sobre la distribución del metal, no es inmediato, pues ocurre a partir de la semana 17 ds; y es notorio, sobretodo, en las concentraciones altas de cadmio. Así, para la semana 17, la fracción F1 es mayor en los tratamientos inoculados, a la vez que las fracciones F3 y F4 son menores en comparación con los tratamientos no inoculados ( $P < 0.05$ ). Nuevamente, estos resultados son una clara prueba del

efecto de la inoculación con HFMA, sobre el sistema y la dinámica del Cd en el suelo.

Es importante notar que en el trópico las tasas de mineralización son más altas debido a las condiciones climáticas, lo cual explica que en corto tiempo se vea la aparición del cadmio en la fracción residual que es la menos soluble y la químicamente más estable. Los resultados obtenidos del orden de distribución del Cd en las fracciones del suelo (Tabla 7) concuerda con lo hallado por Taylor & Percival (2001) que describe que entre el 55 y el 90% del cadmio en la solución del suelo se encuentra en las fracciones más solubles del suelo, en forma de  $Cd^{2+}$  libre u otros iones y es muy disponible para las plantas. En nuestro caso, se encontró para la semana 17 para el tratamiento T3 que la concentración en las dos primeras fracciones se encuentra entre 86 y 90%, para plantas no inoculadas e inoculadas, respectivamente. De la tabla 7, se puede observar además que con el tiempo se van marcando diferencias definidas por la presencia del hongo FMA en el sistema, de modo que la distribución parece cambiar y mientras que para los tratamientos con hongo las fracciones F3 y F4 disminuyen, para los tratamientos sin inóculo, aumentan. Esto significa, que la dinámica de especiación del metal, en condiciones del trópico, es influenciada por la inoculación con HFMA y ahí la importancia de entender su efecto en suelos del trópico en condiciones reales de campo, ya que esta aplicación puede ser una herramienta útil en sistemas perennes, como el analizado en este trabajo, para reducir efectivamente el Cd disponible en el suelo.

### 5.3.2 Efecto del pH

En el periodo de tiempo durante el que se realizó esta evaluación, la mayor cantidad de cadmio, en los tratamientos con hongo se va a las dos primeras fracciones, haciendo más disponible el metal para ser absorbido por la planta. Y aunque estos procesos son mucho más complejos, quizá una parte de este fenómeno pueda explicarse por una aparente disminución en el pH de los suelos inoculados. Los resultados de pH no muestran diferencias estadísticamente significativas, pero si se observa una tendencia a la disminución del pH en los tratamientos inoculados. Es bien conocido que la solubilidad de los metales pesados aumenta con la disminución del pH. Este tema vale la pena explorarlo más, pues indicaría que hay que estudiar muy bien el sistema, dado que la presencia del hongo puede

influenciar grandemente otros procesos en el suelo, a través del cambio en el pH que tengan efecto sobre la disponibilidad de Cd y otros nutrientes en el suelo. En forma experimental se ha reportado anteriormente que la inoculación con HFMA en pasturas, resultó en un aumento del pH de la rizósfera en 0.2-0.7 unidades al cabo de 11 semanas después de la inoculación (Nazeri et al., 2014). Es evidente que en el caso del trabajo de Nazari et al (2014) se trata de dos sistemas agrícolas diferentes, dos especies vegetales diferentes, así como condiciones climáticas y edáficas diferentes a las que se tuvieron en el presente estudio. Además, a diferencia de lo reportado por Nazeri et al. (2014) en este trabajo no se midió el pH de la rizosfera. Por lo cual se recomienda analizar de forma directa este factor, e incluirlo en modelos experimentales a futuro.

Es conveniente notar también que en el sistema hay varios factores que podrían inducir una disminución en el pH del suelo, como la fertilización, proceso que se observa claramente en los datos obtenidos, donde justo después de las dos fertilizaciones, hay una baja en el pH, esto debido, posiblemente, a la adición de úrea al sistema, cuya reacción de hidrólisis y posterior oxidación libera iones  $H^+$  al sistema provocando cambios en el pH (Bernhard, A., 2010). Este efecto, puede deberse también a la forma química en que fue adicionado el cadmio a los suelos, es decir en forma de cloruro de cadmio, compuesto altamente soluble en agua que tiende a formar iones complejos del tipo  $[CdCl_4]^{2-}$  lo cual le confiere propiedades de ácido suave, pudiendo provocar por su parte disminución del pH en el medio en que se encuentre.

#### **5.4 Absorción de cadmio por la planta y acumulación por órgano**

En cuanto a la toma de cadmio por la planta, en la figura 6, se puede observar que la distribución del metal en la planta es directamente proporcional a la cantidad de cadmio presente en el suelo y estos dos valores se encuentran altamente correlacionados como se muestra en la matriz de correlaciones (Tabla 9). Esto concuerda con resultados de Honrburg & Bummer (1986) y Sillampaa & Jansson (1992).

**Tabla 9 Matriz de correlaciones entre concentración de cadmio en planta y concentración de cadmio en suelo en mg.kg-1.**

	Cd suelo (mg/kg)	Cd Hojas (mg/Kg)	Cd Raíz (mg/Kg)	Cd Tallo (mg/Kg)	Cd Parte aérea (mg/kg)
Cd suelo (mg/kg)	1				
Cd Hojas(mg/kg)	0.81017956	1			
Cd Raíces (mg/kg)	0.87988699	0.76808393	1		
Cd Tallo (mg/kg)	0.88101849	0.83125457	0.85212984	1	
Cd Parte aérea (mg/kg)	0.87166126	0.94131015	0.85115651	0.96217436	1

Como se observa en la figura 8, para todos los tratamientos, indiferentemente de si fueron inoculados o no, la concentración del metal es mayor en la parte aérea que en la raíz. La distribución del metal hallada en nuestro ensayo es Tallo>Hojas>Raíz, lo cual contrasta con diversos resultados encontrados en la literatura. Así, por ejemplo Rambatal, et al (2012) reportó la secuencia de acumulación Hojas>Tallo>Raíz; Chan & Hale (2004) reportaron en arroz: Tallo > hojas> frutos> semillas; en cambio Mite (2013) reportó para plantas de cacao la secuencia Raíz>tallo>hojas,cascara,grano. Todos estos resultados, aparentemente contrastantes corroboran la idea de que los sistemas agrícolas son más complejos de lo que se ha pensado hasta el momento, y que diferentes cultivos se comportan de manera diferente en su acumulación y sensibilidad a metales pesados, que la dinámica del metal en el sistema es compleja y condiciones diferentes también condicionan una acumulación diferencial en las plantas.

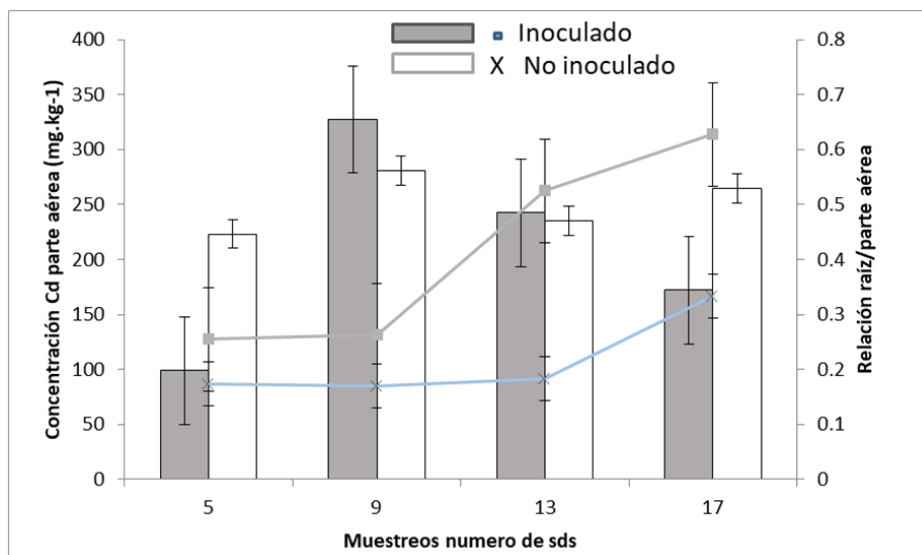
En la tabla 8 se puede ver un cambio en la distribución del metal en la planta, para los tratamientos con concentraciones más altas del metal (T3 y T4) que se ve influenciado por la presencia del *R. irregularis*, en las que la distribución antes mencionada se conserva para los tratamientos inoculados pero cambia para las plantas no inoculadas a Tallo>Raíz>Hojas. Esta redistribución del metal con el

tiempo para las concentraciones altas de cadmio es de gran importancia ya que indica que dependiendo de la concentración del metal en el suelo la posibilidad de encontrar el metal en unos órganos o en otros varía y por lo tanto el manejo debe ser diferenciado. En suelos del trópico, que son principalmente ácidos, el cadmio se hace más disponible que en suelos alcalinos, lo cual explica su movilidad y su alta absorción por las plantas. Evidenciar que el comportamiento del metal en el sistema varía dependiendo de la concentración y que los hongos juegan un papel en la distribución del metal, es de gran importancia, ya que en el mundo se calcula que cerca del 40% de los suelos cultivables son ácidos, y en Colombia, particularmente, cerca de un 80% de los suelos de uso agrícola son ácidos, y los niveles de cadmio encontrados en diferentes regiones se acercan a los utilizados en este ensayo. Este conocimiento puede llevar a proponer uso de tecnologías novedosas de manera más eficiente teniendo en cuenta los procesos que realmente ocurren en los sistemas agrícolas como un todo y conociendo el papel que cumplen los diferentes elementos presentes en el sistema.

Los resultados de la tabla 8 en la que se muestran los porcentajes de acumulación en cada órgano de la planta comparando los tratamientos con adición y sin adición de hongo, para los tratamientos T3 y T4 se observa que la distribución del cadmio en las plantas cambia con el tiempo y existe un efecto de la presencia del hongo. Es interesante notar que para los tratamientos inoculados la concentración de cadmio en la parte aérea disminuye con el tiempo mientras que la concentración de cadmio en raíces aumenta, a diferencia de las no inoculadas. Estos resultados muestran un efecto del hongo en la acumulación del metal en raíces, que puede ocurrir por dos razones principalmente, una mayor compartimentalización del cadmio en vacuolas inducido o no por el hongo o por compartimentalización del metal en las estructuras fúngicas disminuyendo el paso a la parte aérea. Este resultado es fundamental en el marco de aplicaciones de esta tecnología con otras, por ejemplo hablando de modalidades de Fito remediación, en las que el hongo está involucrado en la captación de Cd del suelo y su compartimentalización en la parte radical.

Se recomienda hacer estudios que incluyan otros patrones de cacao y otros tipos de suelo, con el fin de evaluar si los efectos observados para IMC67 en el presente estudio se pueden extrapolar a otras variedades. La información aquí obtenida es importante porque es innovadora para el sistema agrícola del cacao en condiciones de vivero. Sin embargo, debido a que la variabilidad genética puede generar respuestas diferentes, fenómeno que se evidenció en este ensayo, encontrándose alta dispersión en algunos parámetros entre plantas de una misma variedad, sería importante evaluar si los efectos declarados aquí se mantienen en otros sistemas de cacao.

Con el fin de observar si hay alguna relación entre el cadmio absorbido por la parte aérea y la longitud de raíces, en la gráfica 20 podemos observar que la acumulación de cadmio en la parte aérea disminuye con aumento de la relación raíz/parte aérea y para la semana 17 se ve una significativa reducción en la parte aérea para las plantas inoculadas para el tratamientos T3 (un comportamiento similar se observó para T4, datos no se muestran aquí).



**Figura 19** Relación entre la concentración de Cd en parte aérea y la relación raíz/parte aérea para tratamiento T3 en el tiempo

La relación raíz/parte aérea es un buen indicador del efecto del hongo sobre la morfología de las plantas inoculadas, indica la proporción en que las raíces crecen con respecto a la producción de biomasa, en términos de crecimiento también de

la parte aérea. Lo cual en nuestro caso implica un mayor crecimiento de las raíces, debido al efecto de *R. irregularis* comparado con el crecimiento de la parte aérea, esto permite una mayor toma de nutrientes del suelo, lo cual mejora el estatus nutricional de las plantas micorrizadas comparadas con las no inoculadas, lo cual coincide con lo reportado por Cuenca (2007; Vierhelig (2004) y Sierverding (1986). Sin embargo, una mayor toma de nutrientes, puede implicar también una mayor toma de cadmio, debido a que por su similitud química con algunos elementos esenciales para la planta, puede ser absorbido a la par con ellos y con esto se puede observar una mayor absorción del metal pesado por las plantas.

Es importante también notar que las plantas inoculadas absorbieron más cadmio del suelo que las no inoculadas. Esto explica también la disminución de la concentración de cadmio total en el suelo.

### **5.5 Eficiencia de absorción, translocación y fitoextracción**

Una manera de entender los fenómenos de redistribución del metal absorbido por la planta es utilizando conceptos como la eficiencia en la absorción, eficiencia en la translocación y eficiencia en la fitoextracción, descritos por Wang, et al (2007).

Al calcular dichos indicadores no se encontraron diferencias significativas para las concentraciones bajas de cadmio (T0, T1, T2). Sin embargo, para los tratamientos T3 y T4 correspondientes a las concentraciones más altas, la Eficiencia en la absorción de Cd (Figura 10) es menor en plantas inoculadas que no inoculadas, esto quiere decir que la capacidad de la raíz de tomar el metal de suelo es menor cuando se inocula la planta con *Rhizophagus irregularis*.

### **5.6 Producción de biomasa vegetal y otros parámetros medidos**

Otros parámetros que se determinaron durante el ensayo para estudiar el efecto de la inoculación con *R. irregularis* sobre el sistema suelo-planta de cacao bajo diferentes concentraciones de cadmio fueron la producción de biomasa seca para los diferentes órganos de la planta y parámetros morfológicos como longitud de raíces, diámetro de tallo y número de hojas, ya que diversos estudios han reportado

que la aplicación de hongos FMA pueden producir cambios positivos en estos parámetros. Para la biomasa de la planta, los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Azcon-Aguilar, (1997) donde se muestra un efecto positivo en la producción de biomasa en diferentes cultivos hortícolas. Es necesario notar que evaluar la producción de biomasa durante el periodo de vivero, es una medida importante para evaluar únicamente lo ocurrido durante el proceso de plantulación, pero no puede utilizarse para evaluar y proyectar resultados en el sistema de producción de cacao en campo. Por tal motivo se sugiere que a partir de este trabajo, se emprendan estudios en otras etapas del proceso productivo del cacao, notablemente, etapas tempranas de producción en campo (ej. inicio de producción), madurez de la planta en términos productivos (ej. cuando la planta alcanza su máximo productivo) y etapas finales del sistema productivo (ej. declive del nivel productivo).

Para los parámetros de crecimiento no se evidenciaron diferencias significativas en ninguna de las mediciones para los tratamientos con inoculación y sin inoculación. Sin embargo, es evidente el efecto de la concentración de cadmio sobre el crecimiento de las plantas. A mayor concentración de cadmio menor crecimiento.

La ausencia de diferencias significativas, se debe a una alta variabilidad en los resultados, lo que se puede explicar debido a la forma de propagación de las plantas, por semilla, en la que se espera más variabilidad que cuando se hace por esquejes, ya que plantas producidas sexualmente del mismo padre pueden tener una variabilidad genética bastante alta lo que define algunas características de crecimiento y formación de las plantas. Además, según otros autores, los efectos del cadmio en el crecimiento de las plantas puede variar según la especie de planta (Wei et al., 2012), ecotipos (Li et al., 2009) o cultivares (Kubo et al., 2011). Así por ejemplo, Mensing (1990) y Lima et al., (2006) encontraron que la elongación de las raíces se veía más afectada que la biomasa por presencia de cadmio en pastos y leguminosas. Gratao et al (2009) mostraron que la toxicidad por cadmio normalmente reduce la longitud de raíces y la masa seca, al igual que el diámetro de las raíces.

Es necesario resaltar que en el presente trabajo se caracterizó el sustrato (suelo) con el que se realizó el ensayo en cuanto a sus características fisicoquímicas. Las características del sustrato observadas en la Tabla 3 corresponden a un suelo FA, con bajo contenido de materia orgánica y baja capacidad de intercambio catiónico efectiva, esto debido a que el sustrato utilizado para el ensayo fue una mezcla suelo:arena (1:1). Esta mezcla se utiliza con buenos resultados en la zona, en condiciones de vivero, razón por la que fue escogida. Las características mencionadas definieron en gran medida algunos de los resultados obtenidos y que se discutieron atrás. Los nutrientes que se encontraron en baja concentración en éste análisis inicial y que se consideraron necesarios para el óptimo crecimiento de las plantas en el vivero fueron adicionados posteriormente por medio de fertilización edáfica de acuerdo a estudios previos en la zona. El sustrato, no obstante, continuó siendo pobre en contenido de materia orgánica, Fe y Mn. Esto garantizó que los resultados obtenidos en este trabajo se acerquen a lo que se puede encontrar en condiciones comerciales de producción de cacao, en donde el agricultor realizara aplicaciones de nutrientes y enmiendas para garantizar la mejor respuesta en sus plantas.

En cuanto a los parámetros de eficiencia fotosintética medidos se encontró para plantas inoculadas un alivio inicial del estrés, sobre todo en las concentraciones más altas de cadmio, sometidas a un mayor estrés inicial.

Las diferencias en la eficiencia del aparato fotosintético puede deberse a limitaciones no estomáticas, que normalmente incluyen pérdida de pigmentación, desactivación de las enzimas relacionadas con la fotosíntesis (Zhang et al, 2013), inhibición de la actividad funcional del fotosistema II (Posch & Bennett, 2009) o daño del aparato fotosintético (Porcel et al, 2015).

Las mediciones de la relación  $F_v/F_m$  reflejan la capacidad potencial inicial o primaria del PSII y usualmente se usa para estudiar el grado de foto inhibición bajo condiciones de estrés. A pesar que esta variable fue disminuyendo al pasar el tiempo para todos los tratamientos, esta variable fue significativamente mayor en los tratamientos inoculados con *R. irregularis* en las primeras semanas del ensayo para las concentraciones altas (T3 y T4) de cadmio. Esto, junto con otros

parámetros de la eficiencia fotosintética medidos (no se muestran en los resultados) implica que la simbiosis con hongos FMA puede mantener la eficiencia del sistema fotosintético en niveles relativamente más altos que cuando no se cuenta con esta simbiosis, lo cual se ve reflejado en una mayor producción de biomasa inicial y una mayor protección inicial de las plantas al estrés inducido por la presencia de cadmio en el sistema. Estos resultados concuerdan con los reportado por Porcel et al (2015) ya que cuando las plantas se encuentran bajo algún tipo de estrés, la energía debe ser disipada por medio de procesos no fotoquímicos tales como calor o fluorescencia de la clorofila con el fin de proteger el aparato fotosintético en hojas de daño por efecto de la luz.

## **6. Conclusiones y recomendaciones**

### **a. Conclusiones**

La presencia de hongos FMA en sistema suelo-planta de cacao en etapa de vivero muestra efectos determinantes en parámetros de producción de biomasa y distribución del metal en órganos y suelo y manejo de suelos con problemas de acumulación de origen antrópico de Cd.

El estudio del fraccionamiento del metal en el suelo es fundamental para el desarrollo de modelos de equilibrio predictivos que tomen en cuenta los efectos de las condiciones ambientales sobre la absorción de metales y/o su liberación por los suelos y luego para la optimización de tecnologías de remediación. Esto se logra, como se realizó en este estudio, comparando las concentraciones del metal en cada fase del suelo.

El efecto de las concentraciones de cadmio es evidente sobre el desarrollo de las plantas, hay una relación directa entre las concentraciones de cadmio y los efectos nocivos para las plantas. Esto se observó en todos los parámetros morfológicos y fisiológicos. Además, la inoculación con HFMA demostró ser un atenuante de estos efectos, dependiendo de los niveles de Cd presentes en el suelo y se evidenció que este efecto es sostenido en el tiempo. De esta forma, el presente trabajo sienta las bases experimentales, en condiciones de campo, para el diseño de estrategias de manejo que deberán ser estudiadas en modelos holísticos como el desarrollado en este estudio.

En la actualidad existen pocos estudios sobre los efectos de los hongos FMA sobre sistemas con altas concentraciones de cadmio en condiciones de reales o de campo. Los resultados obtenidos para los porcentajes de colonización del hongo en las raíces de las plantas de cacao muestran que el hongo también se ve afectado por las altas concentraciones de cadmio en el suelo, lo que disminuye su capacidad de infección. Aunque, sin embargo, es en estas condiciones extremas donde se observaron algunos de los efectos positivos más marcados de la simbiosis, lo que apunta a que se deben hacer más estudios orientados a conocer los efectos de la aplicación de tecnologías que incluyan a estos hongos para conocer sus efectos en otros sistemas que se puedan ver afectados por estos mismos problemas.

Los resultados obtenidos de la dinámica temporal del cadmio en el suelo, , muestran un alto potencial mitigador de la inoculación de hongos FMA a sistemas contaminados o donde se liberan por acción antrópica nuevos metales pesados, ya que al disminuir la concentración en la fracción F2, se hace también menos disponible el metal con el tiempo para ser absorbido por la planta. Se recomienda que en futuros estudios esta fracción se estudie con más detalle y que el periodo de tiempo se extienda con el fin de tener más información a partir de modelos agrícolas reales, como el utilizado en este trabajo.

De los resultados obtenidos en todo el ensayo es evidente que el papel de los HFMA en la rehabilitación de suelos contaminados con Cd, es más relevante en el caso de contaminaciones altas (tratamientos T3 y T4) y suelos provenientes de

actividades mineras o contaminación de origen antrópico ya que el modo de ingreso del metal al sistema suelo definirá su movilidad y disponibilidad para las plantas.

Los resultados de esta investigación, en cuanto a la distribución del metal en las fracciones del suelo y sus cambios con el tiempo apuntan a que la dinámica de especiación del metal, en condiciones del trópico, es influenciada por la inoculación con HFMA y que esta aplicación puede ser una herramienta útil en sistemas perennes, como el analizado en este trabajo, para reducir efectivamente el Cd disponible en el suelo

## **b. Recomendaciones**

Es necesario notar que evaluar la producción de biomasa durante el periodo de vivero, es una medida importante para evaluar únicamente lo ocurrido durante el proceso de plantulación, pero no puede utilizarse para evaluar y proyectar resultados en el sistema de producción de cacao en campo. Por tal motivo se sugiere que a partir de este trabajo, se emprendan estudios en otras etapas del proceso productivo del cacao, por ejemplo, etapas tempranas de producción en campo (ej. inicio de producción), madurez de la planta en términos productivos (ej. cuando la planta alcanza su máximo productivo) y etapas finales del sistema productivo (ej. decline del nivel productivo).

Deben estudiarse con más detalle las dinámicas de los metales pesados en suelos contaminados teniendo en cuenta que los sistemas agrícolas son sistemas complejos. Debido a que no son sistemas cerrados no es fácil atribuir los efectos solo a uno de los actores, es decir, aunque hay una correlación directa entre la cantidad de cadmio en el sustrato y la cantidad de cadmio tomado por las plantas, sería arriesgado atribuir todos los cambios en la concentración de cadmio en el suelo sólo a lo absorbido por la planta, o a la presencia única del hongo FMA, o al pH del suelo o a las propiedades fisicoquímicas del mismo, o a la variedad de planta, este tipo de investigaciones deben abordarse de manera holística.

Los hongos, debido a su proceso de desarrollo, se adaptan más rápidamente, en términos de tiempo, a condiciones adversas y diversos estudios han demostrado que desarrollan mecanismos específicos para sobrevivir a condiciones, por ejemplo de altas concentraciones de metales pesados. Se recomienda realizar ensayos similares al nuestro, utilizando hongos provenientes de zonas contaminadas con el fin de determinar si su efecto es diferencial para cultivos que deben desarrollarse en suelos altamente contaminados.

# I. Anexo: Análisis inicial de sustrato utilizado durante el ensayo

## REPORTE DE ANÁLISIS DE SUELO No. 1044-2015

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

FCA-L-FT-10.002.007

<b>Remitente:</b> Alia Rodríguez Villate	<b>Finca:</b> *	<b>Lote:</b> Ensayo -I
<b>E-mail:</b> dimjacomemo@unal.edu.co	<b>Propietario:</b> Alia Rodríguez Villate	<b>Recibido:</b> 08.09.15
<b>Dirección:</b> UNAL	<b>Municipio:</b> Yopal	<b>Reportado:</b> 28.09.17
<b>Teléfono:</b> 3152164788	<b>Dpto:</b> Casanare	<b>Recibo No.:</b> ATI-45
<b>Ciudad:</b> Bogotá	<b>Cultivo:</b> Cacao	

### RESULTADOS

pH	CE dS/m	CO	N	Ca	K	Mg	Na	AI	CICE	CIC
		%		meq / 100g						
4,7	ns	0,89	0,08	1,49	0,10	0,69	0,02	0,49	2,78	ns

ns: no solicitado

P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg / kg							%			
19,1	ns	0,37	156	9,49	2,38	0,21	9	15	76	FA

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

PARÁMETRO	MÉTODOS DE ANÁLISIS	VALORACIÓN
<b>pH</b>	Suspensión suelo:agua (relación peso:volúmen 1:1)	Potenciométrica
<b>CE:</b> Conductividad eléctrica	Extracto de la pasta de saturación	Conductimétrica
<b>CO:</b> Carbono orgánico oxidable	Walkley-Black	Colorimétrica
<b>N:</b> Nitrógeno total	Estimado a partir del CO (factor empleado 0,0862)	
<b>Ca, K, Mg, Na:</b> Bases Intercambiables	Extracción con NH <sub>4</sub> -Acetato 1M pH 7	Absorción Atómica
<b>CIC:</b> Capacidad de intercambio catiónico	Desplazamiento del NH <sub>4</sub> , intercambiado con NaCl	Volumétrica
<b>CICE:</b> CIC Efectiva	Estimado por suma de bases y acidez intercambiables	
<b>AI:</b> Acidez intercambiable	Extracción con KCl 1M	Volumétrica
<b>P:</b> Fósforo disponible	Bray II	Colorimétrica
<b>S:</b> Azufre disponible	Extracción con fosfato monocálcico	Turbidimétrica
<b>Cu, Fe, Mn, Zn:</b> Microelementos	Extracción con DTPA	Absorción Atómica
<b>B:</b> Boro	Extracción con fosfato monocálcico	Colorimétrica
<b>Arcilla (Ar), limo (L), arena (A)</b>	Bouyoucos, dispersión con Na-Hexametafosfato	Densimétrica
<b>Textura</b>	Triángulo de clasificación textural USDA	

### NIVELES GENERALES DE REFERENCIA

Elemento	Clima	Alto	Medio	Bajo	Elemento	Alto	Medio	Bajo
N	Frío	>0.50	0.25-0.50	<0.25	P	>40	20-40	<20
	Medio	>0.25	0.15-0.25	<0.15	K	>0.35	0.15-0.35	<0.15
	Cálido	>0.20	0.10-0.20	<0.10	Ca	>6	3,0-6,0	<3
				Mg	>2.5	1.5-2.5	<1.5	

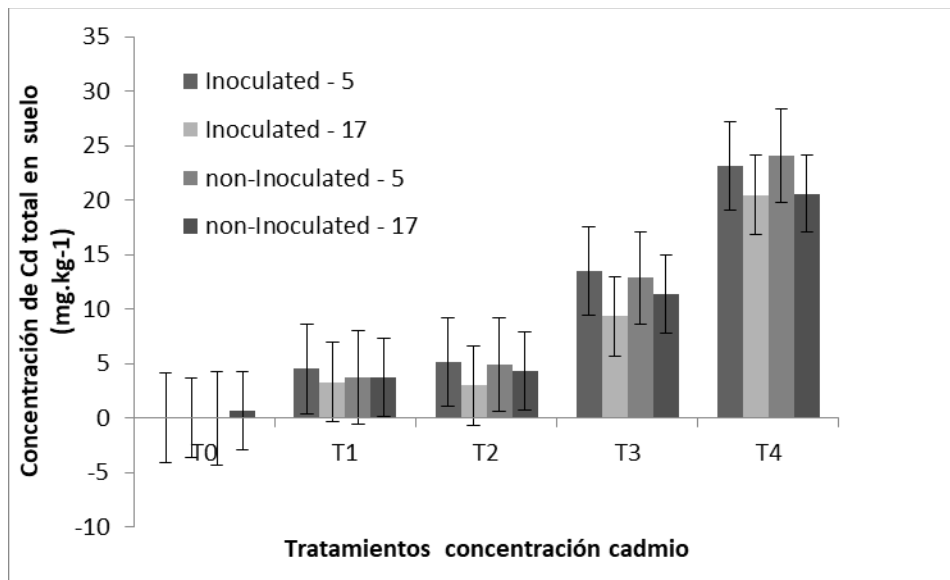
Químico:

Coordinadora:

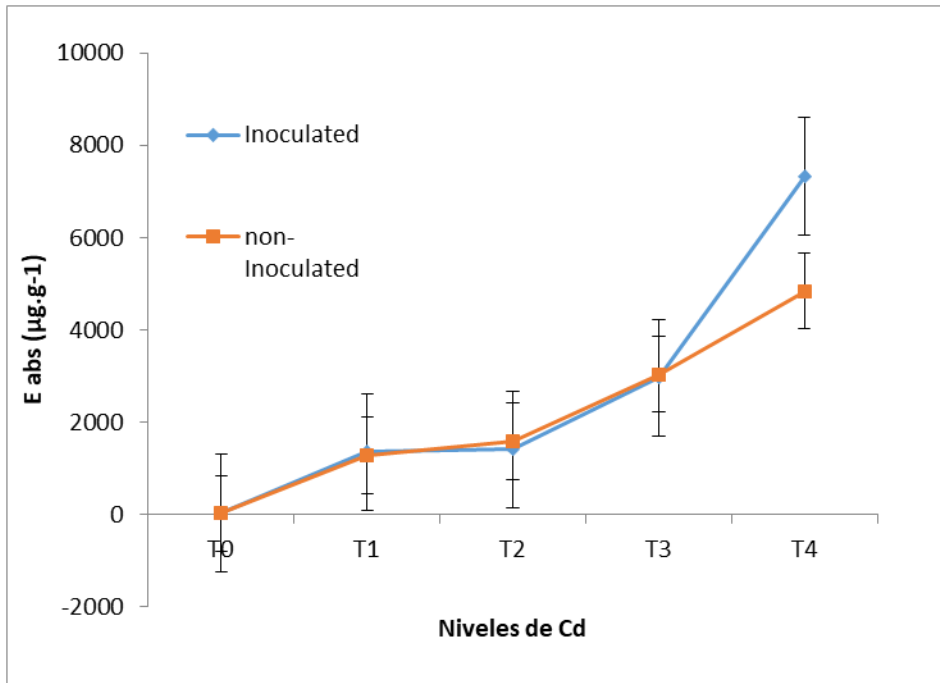
RECUERDE: El plan de fertilización es más eficiente si Ud consulta con el profesional de Asistencia Técnica de su localidad

Laboratorio de Aguas y Suelos. Facultad de Agronomía. Edificio 500 Cuarto Piso  
 Conmutador 316 5000 Extensiones 19088 ó 19049; Telefax 316 5498  
 Correo electrónico: [mchenapto@unal.edu.co](mailto:mchenapto@unal.edu.co)  
 Bogotá, Colombia

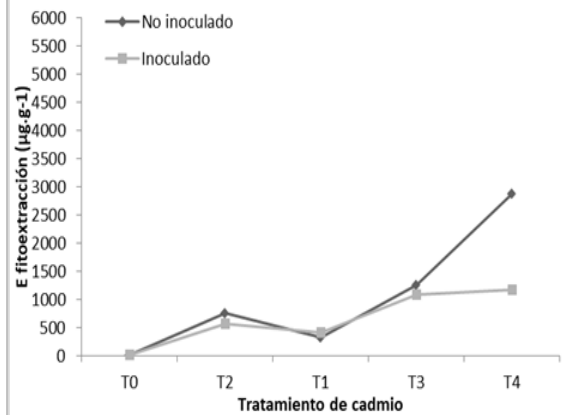
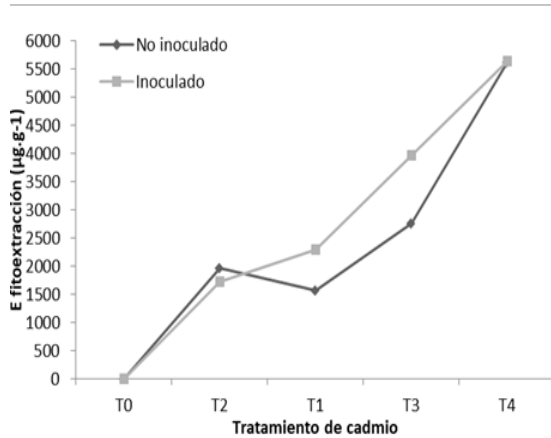
## II. Anexo: Concentración de cadmio total en el suelo para los diferentes tratamientos para las semanas 5 y 17 ds.



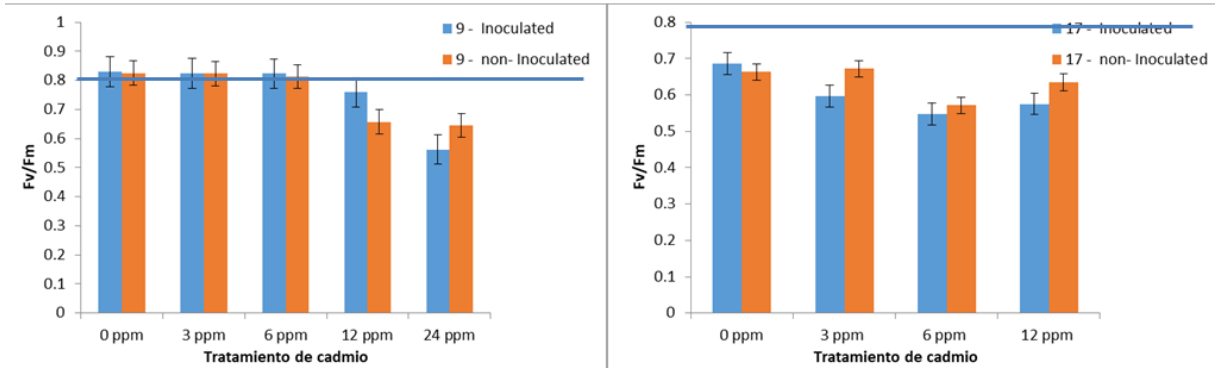
### III. Anexo: Eficiencia en la absorción de cadmio por las plantas para todos los tratamientos semana 17 ds.



## IV. Anexo: Eficiencia en la fitoextracción de cadmio para todos los tratamientos. Semana 5 y 17 ds



## V. Anexo: Relación Fv/Fm para todos los tratamientos, semanas 9 y 17 ds



## VI. Anexo. Construcción del vivero y montaje diseño experimental

### 1. Construcción del vivero. 2015





2. Construcción y distribución de las camas o bloques



### 3. Aplicación de cadmio al sustrato



### 4. Siembra de semilla y plántulas obtenidas



5. Distribución de las plantas en el vivero



6. Muestreos





7. Análisis en laboratorio:  
Secado de muestras de sustrato



Determinación porcentajes de colonización



Digestión, filtración y preparación curva de calibración para análisis de cadmio en muestras de sustrato



## VII. Anexo. Protocolo de adición cadmio

### ADICION DE CADMIO AL SUSTRATO

#### MATERIALES

- 1 Balanza Analítica
- 1 Cloruro de Cadmio
- 1 Espátula de laboratorio
- 2 Beaker de laboratorio o recipiente vidrio o plástico capacidad 5 L
- 4 Botellas de plástico con tapa perforada capacidad 3 L
- 1 Probeta graduada de vidrio capacidad 1 o 2 L
- 3 Palas para revolver suelo
- 5 Caretas para protección respiratoria
- 5 Guantes de nitrilo
- 5 Botines de plástico
- 5 Overoles o batas para proteger la ropa de contaminación
- 1 Carretilla
- Plástico negro calibre 7 (122m<sup>2</sup>)
- 1 Cinta de seguridad para delimitar los tratamientos
- Identificaciones de cada tratamiento
- 2 Marcador Sharpie negro
- 1 Bisturí
- 1 Decámetro

#### ACTIVIDADES Y RESPONSABLES

1. **BARRERA FISICA:** Se deben cortar 5 piezas de plástico negro con unas dimensiones de 3.33m x 6.4 m.

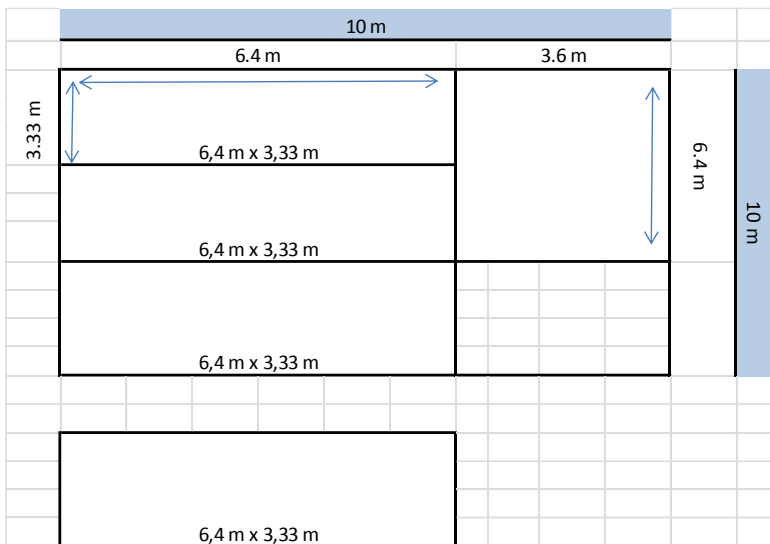
Con el fin de aprovechar al máximo el plástico con el que se cuenta se deben sacar 4 unidades del plástico de 10 x 10 como se indica en la figura 1 y la última porción de plástico aparte.

Una vez se tengan las 5 porciones cortadas, ubicar el plástico en el vivero como se indica en la figura 2, en la misma dirección que quedaron distribuidos los bloques en el vivero.

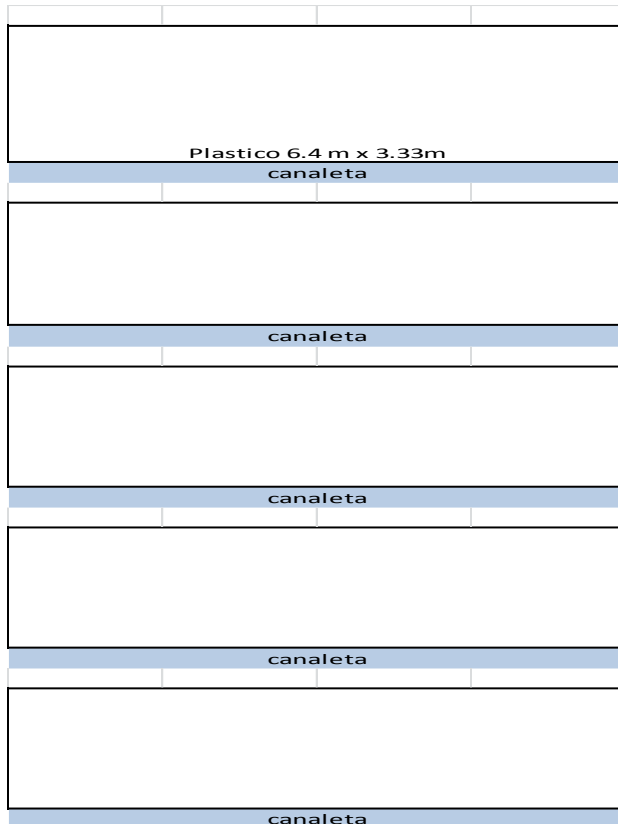
Responsables: Wilson Bohorquez o Cristhian Fernandez/ Dos Estudiantes

Tiempo Estimado: 1 hora

**Figura 1. Diagrama para cortar el plástico que será utilizado como barrera física**



**Figura 2. Distribución del plástico en el vivero.**



## 2. TRASLADAR EL SUSTRATO AL VIVERO:

Se debe trasladar una cantidad suficiente de sustrato al vivero para llenar 750 bolsas en carretilla y se deben ubicar 5 pilas sobre cada una de las piezas de plástico ya extendidas en el vivero, de tal forma que el sustrato no entre en contacto físico con el suelo del vivero. En cada pila se debe estimar una cantidad de sustrato suficiente para llenar 150 bolsas (Este cálculo se debe hacer lo más aproximado posible con el fin de que no sobre sustrato ni haga falta debido a que el proceso de adición de cadmio y la concentración final que obtengamos están sujetos a la cantidad de sustrato que se use)

**Nota:** Si cada bolsa tiene una capacidad de 3 Kg de sustrato entonces para cada una de las concentraciones de Cadmio se necesitarán aprox. 450Kg (30plantas\*5 tratamientos\*3Kg/bolsa).

**Responsables:** Wilson Bohorquez, 4 estudiantes

**Tiempo estimado:**

3. **IDENTIFICACION DE LOS TRATAMIENTOS:** Se debe delimitar cada uno de los tratamientos con cinta amarilla con el fin de separarlos e identificarlos físicamente.

Se debe colocar una identificación a un lado de cada uno de los tratamientos con el fin de evitar confusiones.

Responsables: Wilson Bohorquez/ Estudiantes

Tiempo Estimado: 30 min

#### **4. PREPARACION SOLUCIONES DE CADMIO**

Para la concentración 3ppm se debe preparar 2.25 L de una solución de 600ppm de Cd a partir de Cloruro de Cadmio y adicinarla a una botella de gaseosa de capacidad de 3 L. Perforar la tapa

Para la concentración 6 ppm se debe preparar 4.5 L de una solución de 600ppm de Cd a partir de Cloruro de Cadmio y adicinarla a una botella de gaseosa de capacidad de 3 L. Perforar la tapa. La solución restante se mantendrá en el balde donde se preparó mientras se desocupa la botella.

Para la concentración 12 ppm se debe preparar 2.25 L de una solución de 2400 ppm de Cd a partir de Cloruro de Cadmio y adicinarla a una botella de gaseosa de capacidad de 3 L. Perforar la tapa.

Para la concentración 24 ppm se debe preparar 4.5 L de una solución de 2400 ppm de Cd a partir de Cloruro de Cadmio y adicinarla a una botella de gaseosa de capacidad de 3 L. Perforar la tapa. La solución restante se mantendrá en el balde donde se preparó mientras se desocupa la botella.

Responsables: Diana Jácome/Cristhian Fernandez

Tiempo estimado: 30 min

#### **5. ADICION DE CADMIO AL SUSTRATO**

Una vez se tenga la solución de Cadmio en las botellas de gaseosa y se hayan perforado las tapas, dos personas se harán cargo de la adición de las soluciones a las pilas previamente identificadas, mientras que otras dos personas se hacen cargo de ir revolviendo con pala la zona donde se ha aplicado la solución con el fin de distribuir homogéneamente la solución en todo el sustrato. Tener especial cuidado durante este proceso de no romper el plástico.

**Nota:** La adición de las soluciones de Cadmio se debe hacer de manera que se garantice homogeneidad y se debe revolver con pala para garantizar que la solución de Cadmio entre en contacto con todo el sustrato (En caso de disponibilidad, se puede realizar con atomizadores)

Una vez realizada la homogeneización se deben dejar reposar las pilas hasta la próxima mezcla

Recordar durante este proceso utilizar todas las medidas de seguridad necesarias y que se encuentran detalladas en el anexo: “Medidas de seguridad manipulación Cadmio”

Responsables: Diana Jácome/ Cristhian Fernandez/ 3 estudiantes

Tiempo estimado: 3 horas

## **6. HOMOGENEIZACION DEL SUSTRATO**

Cada día, durante una semana (7 días) se debe repetir el proceso de revolver con pala, o cada una de las pilas de sustrato con el fin de garantizar una distribución uniforme del cadmio adicionado sobre el sustrato. Antes de realizar el volcado del sustrato, humedecer levemente el sustrato.

**Nota:** Recordar utilizar todas las medidas de seguridad indicadas para la realización de este proceso.

**Responsables:** Wilson Bohorquez/ 4 o 5 estudiantes

Tiempo estimado: 1 hora diaria

## **7. LLENADO DE BOLSAS**

Una vez realizado el proceso de homogeneización, después de los siete días indicados en el punto anterior, se puede continuar con el llenado de bolsas. Las bolsas que se van a utilizar son bolsas negras de polietileno de 30\*15 cm. El llenado de bolsas se debe hacer en el vivero y las bolsas se deben colocar siempre sobre el plástico negro que se encuentra sobre el suelo. Las bolsas se deben dejar reposar mínimo dos semanas más para garantizar estabilización del cadmio en el sustrato.

**Nota:** Recordar utilizar todas las medidas de seguridad indicadas para la realización de este proceso.

Responsable: Wilson Bohorquez/ 4 o 5 estudiantes

Tiempo estimado:

## **8. TOMA DE MUESTRAS PARA ANALISIS:**

Durante el proceso de llenado de bolsas tomar una muestra de 2 Kg de cada una de las pilas y almacenar en bolsas bien selladas y adecuadamente identificadas con las concentraciones de cadmio correspondientes con el fin de llevar al laboratorio y determinar la concentración de Cadmio inicial de cada uno de los tratamientos.

**Nota:** Recordar utilizar todas las medidas de seguridad indicadas para la realización de este proceso.

Responsables: Wilson Bohorquez/ Diana Jácome

**Precauciones:** Seguir las medidas de seguridad necesarias para la manipulación del material que contiene Cadmio. Es decir, cada estudiante o persona que vaya a trabajar en el vivero durante esta etapa del ensayo, debe contar con careta para protección respiratoria, guantes de nitrilo, zapatones de plástico para protección del calzado y overol o bata para proteger la ropa de la contaminación. Los overoles o batas utilizadas durante esta etapa del ensayo deben ser lavados por separado del resto de ropa del estudiante o personal a cargo del ensayo. Para mayor claridad sobre el uso de materiales de protección personal ver documento anexo “Medidas de seguridad manipulación Cadmio”



## Bibliografía

- Abollino, O., Aceto, M., Malarino, M., Mentaste, E., Sarzini, C. y Barreris, R. (2002) Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 177.
- Al-Ghamdi, A.A.M., Jais, H.M. (2012). Interaction between arbuscular mycorrhiza and heavy metals in the roots of *Juniperus procera*. *Int. journal of agric. and biol.* Vol. 14 (1) 69-74
- Alkan, N., Gadkar, V., Yarden, O., & Kapulnik, Y. (2006). Analysis of Quantitative Interactions between Two Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4192–4199. <https://doi.org/10.1128/AEM.02889-05>
- Aloui A, Recorbet G, Gollotte A et al (2009) On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics* 9:420–433
- Alloway B.J. (1995) Heavy metals in Soils. Springer, 368 pp.
- Ander, E.L, Johnson C.C, Cave, M.R, Palumbo-Roe, B, Nathanail, P and Lark, R.M. (2013) Methodology for the determination of normal background concentrations of contaminants in English soil. *Science of The Total Environment*, Volumes 454–455, 1 June 2013, Pages 604-618.
- Aroca R, Bago A, Sutka M et al (2009) Expression analysis of the first arbuscular mycorrhizal fungi aquaporins described reveals concerted gene expression between salt stressed and non stressed mycelium. *MPMI* 22:1169–1178
- Andosch, A., Affenzeller, M. J., Lütz, C., & Lütz-Meindl, U. (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the

unicellular model *Micrasterias*. *Journal of Plant Physiology*, 169(15), 1489–1500.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.002>

Aram, H., Golchin, A. (2013) The effects of Arbuscular Mycorrhizal fungi on nitrogen concentration of Berseem clover in contaminated soil with Cadmium. *J of chem Health risk* 3(2): 35-38

Azcón-Aguilar, Barea, C., Barea, J. (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*, 68:1-24.

Banat, K.M., Howari, F. y Al-Hamad, A. A. (2005) Heavy Metals in Urban Soils of Central Jordan: Should we worry about Their Environmental Risks?. *Environ. Res.* 97: 258-273.

Borde M, Dudhane M, Jite P (2011) Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glauca*) crop under salinity stress condition. *Crop Prot* 30:265–271

Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*, 134(2), 189–207. <https://doi.org/10.1007/BF00012037>

Bolaños, B.M.M., Rivillas, C.A. & Vásquez, S.S. (2000), "Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera Colombiana", *Cenicafé*, Vol. 51, pp. 245-262

Brachmann, A., Parniske, M. (2006) The most widespread symbiosis on Earth. *PloS biol* 4(7): e239

Caravaca, F. Del Mar, A.M., Torres, P., Roldan, A. (2005). Microbial activities and arbuscular mycorrhizal fungi colonization in the rhizosphere of the salt marsh plant *Inula crithmoides* L. Along a spatial salinity gradient. *Wetlands* 25: 350–355.

Cardenas, P., Darghan C.A.E., Sosa R.M.D., Rodriguez, A. (2017) Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. *Acta biol. Colomb.*, Volumen 22, Número 2, p. 209-220.

Castro Reyes, U.A., (2001). Modelo de Desarrollo Empresarial para el mediano y grande productor de cacao (*Theobroma Cacao* L) en las zonas cacaoteras del departamento de Santander. Universidad Santo Tomás de Aquino. Facultad de Administración de Empresas Agropecuarias.

- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A., Sanders, I.R. (2013) The *in vitro* mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS One*. 2013;8:e70633
- Chan D.Y., Hale B. A. (2004) Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany*. 55(408): 2571-2579
- Chen, Z., Silva, H., & Klessig, D. F. (1993). Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance by Salicylic Acid. *Science*, 262(5141), 1883–1886. <https://doi.org/10.2307/2882832>
- Chen, B.D., Li, X.L., Tao, H.Q., Christie, P., and Wong, M.H. (2003) The role of arbuscular mycorrhizal in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, 50, 839–846
- Codex Alimentarius commission. (2015). Proposed draft maximum levels for cadmium in chocolate and cocoa-derived products. 9<sup>th</sup> session. New Dheli, India, 16-20 march,2015.
- Corpoica (2005). Evaluación edafoclimática de las tierras del trópico bajo colombiano para el cultivo del cacao. García Lozano, J., Romero Carrascal, M. y Ortiz, L.A..
- Chulan (Hashim), A., & Ragu, P. (1986). Growth response of *Theobroma cacao* L. seedlings to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 96(2), 279–285. <https://doi.org/10.1007/BF02374771>
- Cuenca, G. (2007) Las micorrizas arbusculares como una alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, vol.32, no.1, p.23-29.
- EFSA. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D., Ayhana, B. (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J Plant Physiol*. 165:600–611. doi: 10.1016/j.jplph.2007.01.017.

- FAO (2015). Status of world's soil resources. Main report. <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>
- Fedecacao (2007) Guía técnica para el cultivo del cacao, 2ª ed. (n.d.). Retrieved August 30, 2017, from <https://es.scribd.com/doc/210143086/Fedecacao-2007-Guia-tecnica-para-el-cultivo-del-cacao-2%C2%AA-ed>
- Finlay R.D., Söderström B. (1992) Mycorrhiza and carbon flow to the soil. Mycorrhiza functioning. 134-160
- Gadkar, V., David-schwartz, R., Kunik, T., & Kapulnik, Y. (2001) Update on Mycorrhizal Symbiosis Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization . Factors Involved in Host Recognition, 127(December), 1493–1499. doi:10.1104/pp.010783.vitro
- Garcia Lozano, J., C., M. R., & Ortiz, L.A. (2005). Evaluación edafoclimática de las tierras del trópico bajo colombiano para el cultivo del cacao. *Corpoica- Ministerio Agricultura*.
- Giovannetti (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist - Wiley Online Library*. (n.d.). Retrieved August 30, 2017, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x/full>
- Giovanetti, M. y Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, vol 84, p. 489-500
- Gonzalez A.I. (2010) Determinación y validación de Cadmio total e intercambiable en algunos suelos cacaoteros del Departamento de Santander. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander.
- He, J.Y., Zhu, Ch., Ren, Y.F, Yan, Y.P., Cheng, Ch., Jiang, D.A., Sun, Z.X. (2008). Uptake, subcellular distribution and chemical forms of cadmium in Wild-type and mutant rice. *Pedosphere*, Vol. 18. Issue 3, pp 371-377
- Heavy Metals in Soils - Springer. (n.d.). Retrieved August 30, 2017, from <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-4470-7>
- Herawati, N., Susuki, K., Hayashi, I., Rivai, H., Koyama, H.. (2000) Cadmium, Copper, and Zinc Levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. *Environmental contamination and Toxicology*. 64: 33-39

- Hernández-Martínez, R., & Navarro-Blasco, I. (2012). Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, 26(1), 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.024>
- Hildebrandt, U., Regvar, M., Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68(1), 139-146
- Hovsepyan, A., Greipsson, S. (2004) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on phytoextraction by corn (*Zea mays*) of lead-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation*. 6(4): 305-21.
- Huamani Yupanqui, H. A. (2016). Enmiendas orgánicas en el contenido de cadmio en almendras de cacao. Ponencia presentada en congreso de Ciencia del suelo en Quito, Ecuador, 2016
- 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.
- International Cocoa Council, ICCO panel (2015) <https://www.icco.org/about-us/icco-news/319-icco-panel-recognizes-23-countries-as-fine-and-flavour-cocoa-exporters.html>
- Janousková, M., Pavlíková, D., Macek, T., Vosátka, M. (2005) Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. *Plant soil* 272:29-40
- Janousková, M., Pavlíková, D., Vosátka, M. (2006) Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* 65:1959-1965
- Janoušková, M., Krak, K., Wagg, C., Štorchová, H., Caklová, P., & Vosátka, M. (2013). Effects of Inoculum Additions in the Presence of a Preestablished Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(20), 6507–6515. <https://doi.org/10.1128/AEM.02135-13>
- Järup, L., & Åkesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>

- 
- Jiang, Q.Y., Zhuo, F., Long, S.H., Zhao, H.D., Yang, D.J., Ye, Z.H., Li, S.S., Jing, Y.X. (2016) Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils?. *Sc Reports* 6:21805 doi:10.1038/srep21805.
- Joner E. J., Briones R., Leyval C. (2000) Metal binding capacity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plants Soil*. 226:227-234
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo M.J. (2012) Review: Mycorrhiza induce resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol*. 38(6):651-64.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1984) *Trace elements in soils and plants*. 315 p
- Kamnev, A. A., & Lelie, D. van der. (2000). Chemical and Biological Parameters as Tools to Evaluate and Improve Heavy Metal Phytoremediation. *Bioscience Reports*, 20(4), 239–258. <https://doi.org/10.1023/A:1026436806319>
- Khan, A.G. (2006) Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. *J of Zhejiang Univ Science B*. Vol7(7): 503-514
- Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137(1), 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- Krupa, Z., G. Oquist, N. Huner, (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiol. Plantarum*, 88, 626–630.
- Leyval, C., Turnau, K., and Haselwandter, K. (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspect. *Mycorrhiza*, 7:139–153
- Luo, N., Li, X., Chen, A. Y., Zhang, L. J., Zhao, H. M., Xiang, L., ... Li, H. (2017a). Does arbuscular mycorrhizal fungus affect cadmium uptake and chemical forms in rice at different growth stages? *The Science of the Total Environment*, 599-600, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.047>
- Luo, N., Li, X., Chen, A. Y., Zhang, L. J., Zhao, H. M., Xiang, L., ... Li, H. (2017b). Does arbuscular mycorrhizal fungus affect cadmium uptake and chemical forms in rice at different

- growth stages? *The Science of the Total Environment*, 599-600, 1564–1572.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.047>
- Madejón, P., Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N. W., & Madejón, E. (2010). Do amended, polluted soils require re-treatment for sustainable risk reduction? — Evidence from field experiments. *Geoderma*, 159(1), 174–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.07.009>
- Malcová, R., Vosátka, M., & Gryndler, M. (2003). Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. *Applied Soil Ecology*, 23(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00160-9)
- Mapanda, F., E.N. Mangwayana, J. Nyamangara, and K.E. Giller. (2005) The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agric. Eco-syst. Environ.* 107:151–165
- Marques, A.P., Oliveira, R.S., Rangel, A.O., Castro, P.M. (2006) Zinc accumulation in *Solanum nigrum* is enhanced by different arbuscular mycorrhizal fungi. *Chemosphere* 65(7): 1256-1263
- Marschner H., Dell B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis, *Plant Soil* 159, 89–102
- Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR), (2016). Estrategia Colombia Siembra. Documento estratégico.
- Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR), Consejo nacional cacaoero (2011). Plan nacional de desarrollo cacaoero 2012-2021
- Miransari M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metal. *Biotechnol. Adv.* 29, 645–653. [10.1016/j.biotechadv.2011.04.00](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.00)
- Mite, F., M. Carillo and W. Durango (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almadrás de cacao, suelos y aguas en Ecuador. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Santa Domingo, Sociedad Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.
- Mo, Y., Wang, Y., Zheng, J., Li, H., Ma, J., Zhang, Y., Wei, C., Zhang, X. (2016) Regulation of plant growth, photosynthesis, antioxidation and osmosis by an Arbuscular mycorrhizal

fungus in watermelon seedling under well-watered and drought conditions. *Front plant sci.* 7:644, doi: 10.3389/fpls.2016.00644

Mohamed A.A., Castagna A., Ranieri A., Sanita di Toppi L. (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 57:15–22.

Neagoe, A., Iordache, V., Bergmann, H., Kothe, E. (2013) Patterns of effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants grown in contaminated soil. *J of plant nut & soil sc vol* 176(2):273-286.

Oyetunji O. J., Ekanayake I. J., Osonubi O. (2007). Chlorophyll fluorescence analysis for assessing water deficit and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) inoculation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Adv. Biol. Res.* 1, 108–117.

Oliveira, C., Nelson, M.B., Amaral-Sobrinho, Nelson, M., Soares-dos Santos, F. (2013) Solubilidad de cadmio y zinc en suelos agrícolas tratados con lodo residual enriquecido. *Terra latinoamericana*, Vol 21 (3) 351-363

Pal M, Horvath E, Janda T, Paldi E, Szalai G (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J Plant Nutr Soil Sci* 169:239–246

Prasad, M.N.V. (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. And Experimental Botany*, Vol 35, Issue 4, p. 525-545

Pacheco, R., & Agustin, J. (2015). Cacao y su aporte al desarrollo colombiano. Retrieved from <http://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/13292>

Poschenrieder, C., Gonsé, B., Barceló, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding vean leaves. *Plant Physiol.* 90:1365-1371.

Ramirez, A., (2002). Toxicología del cadmio, conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* Vol. 63 N°1

- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. (1994) Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91,11841–11843.
- Rillig, M.C., Mummey, D.L. (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phyt.* Vol 171(1): 41-53
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J.P., Belimov, A.A., Gianinazzi, S., Strasser, R.J., Gianinazzi-Pearson, V. (2002) Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L., genotypes. *J. Exp Bot* 53: 1177-1185
- Rivera-Becerril, F., Van Tuinen, D., Martin-Laurent, F., Metwally, A., Dietz, K.J., Gianinazzi, S. (2005). Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16: 51–60. 10.1007/s00572-005-0016-7.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pazmiño, D.M., Testillano, P.S., Risueño, M.C., del Rio, L.A., Sandario, L.M. (2009) Cellular response of Pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide and calcium. *Plant Physiol* 150(1): 229-243
- Siedlecka, A., Krupa, Z., Samuelsson, G., Oquist, G., Gardestrom, P. (1997) Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiol. Biochem.*, 35(12), 951–957
- Sieverding, E. (1986) El papel de las micorrizas en la agricultura. *Suelos Ecuatoriales*, 16(1) 52-59.
- Smith S., Gianinazzi-Pearson V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 221–244. 10.1146/annurev.pp.39.060188.001253
- Taylor M.D., Percivar, H.J. (2001). Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertilizer bin. *Environ Pollut.* 113(1): 35-40
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Blsson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate tracer metals. *Analytical chemistry*, vol. 51 (7): 844-851

- Tokatlioglu, S., Kartal, S., Elci, L. (2000). Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. *Analyt. Chim. Acta*, 413, 33-40
- Vassilev A., Berowa M., Zlatev Z. (1998): Influence of Cd<sup>2+</sup> on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol. Plantarum*, 41: 601–606
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004–5007. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/64/12/5004>
- Vierheilig, H. (2004) Regulatory mechanisms during the plant - arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1166- 1176.
- Wang, F. Y., Lin X.G., Yin R. (2007) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* 51;99-109pp
- Wodala, B., Eitel, G., Gyula, T.N., Ordog, A., Horváth, F. (2012) Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P absorbance in leaves. *Photosynthetica* 50:380-386
- Yang, Y., Liang. Y., Han, X., Chiu, T., Ghosh, A., Chen, H., Tang, M. (2016). The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb intereaction in Pb contaminated soil. *Sci Rep.* 2016; 6: 20469. Published online 2016 Feb 4. doi: 10.1038/srep20469
- Yang, L., Ji, J., Harrishshultz, K.R., Wang, H., Wang, H., Abdallah, E.F., Luo, Y., Hu, X., (2016a) The dynamic changes of the plasma membrane proteins and the protective roles of nitric oxide in rice subjected to heavy metal cadmium stress. *Front. Plant. Sc.* 7, 1-18.
- Yuan, W., Quin, S., ZaiJin, S., YaQuin, S., JiNing, L., XiaoLong, Z., Hong Hou, Zhippeng, C., Feng, C.W. (2016) The role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant uptake, fractions, and speciation of antimony. *Applied soil ecology*, 107: 244-250

- Zarate, L.M. Sanchez de Prager, M., Barrios, E., (2009) Respuesta de *Melinis minutiflora* a la inoculación con hongos micorrízica arbusculares en un Inceptisol de Colombia. Acta agron., Volumen 58, Número 4,p. 225-233.
- Zhang, H.H., Tang, M., Chen, H., Zheng, C., Niu, Z. (2010). Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. Eur J soil Biol 46:306-311
- Zhang Y., Yao Q., Li J., Wang Y., Liu X., Hu Y., et al. (2015). Contributions of an arbuscular mycorrhizal fungus to growth and physiology of loquat (*Eriobotrya Japonica*) plants subjected to drought stress. *Mycol. Prog.* 14 1–11. 10.1007/s11557-015-1108-1