

Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao*)

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as a strategy to reduce the absorption of cadmium in cocoa (*Theobroma cacao*) plants

Urley Adrian Pérez Moncada^{1‡}, Margarita Ramírez Gómez¹, Diana Paola Serralde Ordoñez¹,
Andrea María Peñaranda Rolón¹, Wilmar Alexander Wilches Ortiz¹,
Luciano Ramírez¹ y Gersain Antonio Rengifo Estrada²

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

[‡] Autor para correspondencia (uperez@agrosavia.co)

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación La Suiza. Km 32 vía al mar, vereda Galápagos, Rionegro, Santander, Colombia

RESUMEN

Colombia se ubica entre los países de Latinoamérica que producen cerca del 80% de cacao fino o “prime” del mundo; sin embargo, el cacao en Colombia presenta limitantes relacionados con la presencia de cadmio (Cd) en algunos suelos en donde se cultiva y esto reduce la inocuidad del producto. El objetivo de este estudio fue evaluar la absorción de cadmio en un patrón de cacao (IMC 67) en asociación con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) para determinar su uso potencial como inmovilizadores de Cd a mediano y largo plazo. Se estableció un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y 20 tratamientos en arreglo factorial 4×5 , un testigo, tres tipos de micorrizas (*Glomus macrocarpum*, *Rhizoglyphus intraradices* y HFMA-nativos) y cinco dosis de Cd (0, 6, 12, 18 y 24 mg kg⁻¹). Se midió altura de planta, peso seco de tallo, hojas y raíces, así como la concentración de Cd en tallos, hojas y raíces. Los resultados mostraron que las plantas de cacao translocan el Cd fácilmente a todos los órganos (tallos, hojas y raíces), es decir, pueden vivir en estas condiciones; sin embargo, las plantas inoculadas con HFMA-nativos, disminuyeron significativamente la acumulación de Cd en todos los órganos evaluados. Estos resultados confirman los efectos benéficos que tienen los HFMA para aliviar el estrés que presentan

las plantas frente a la translocación de metales pesados como lo es el cadmio.

Palabras clave: bioacumulación, metales pesados, suelos contaminados, translocación.

SUMMARY

Colombia is among the countries of Latin America that produce about 80% of fine or “prime” cocoa of the world; however, cocoa in Colombia has limitations related to the presence of cadmium (Cd) in some soils where it is grown and this reduces the safety of the product. The objective of this study was to evaluate the absorption of cadmium in a cocoa pattern (IMC 67) in association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to determine their potential use as Cd immobilizers in medium and long-term. A randomized complete block design with three replications and 20 treatments was established, in 4×5 factorial arrangement, one control, three types of mycorrhizae (*Glomus macrocarpum*, *Rhizoglyphus intraradices* and AMF-native) and five Cd doses (0, 6, 12, 18 and 24 mg kg⁻¹). Plant height, dry weight of stem, leaves and roots as well as Cd concentration in stems, leaves and roots were measured. The results showed that cacao plants translocate the Cd easily, that is, they can live under these conditions since it was found in all organs (stems, leaves and roots);

Cita recomendada:

Pérez Moncada, U. A., M. Ramírez Gómez, D. P. Serralde Ordoñez, A. M. Peñaranda Rolón, W. A. Wilches Ortiz, L. Ramírez y G. A. Rengifo Estrada. 2019. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao*). Terra Latinoamericana 37: 121-130.
DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.479>

Recibido: 27 de diciembre de 2018.

Aceptado: 01 de febrero de 2019.

Publicado en Terra Latinoamericana 37: 121-130.

however, the treatment inoculated with AMF-native decreased significantly the accumulation of Cd in all the organs evaluated. These results confirm the beneficial effects that AMF have to alleviate the stress that plants shows when translocating heavy metals such as cadmium.

Index words: *bioaccumulation, contaminated soils, heavy metal, translocation.*

INTRODUCCIÓN

Colombia está dentro de los 10 países de mayor producción de cacao según la FAO con 56 163 toneladas (FAO, 2016). En América Latina, se produce cerca del 80% del cacao fino. Colombia está dentro de esta clasificación junto a países como Bolivia, Costa Rica, Ecuador, Perú y México (Pacheco, 2014¹). Uno de los limitantes asociados con el cultivo, está relacionado con la presencia de cadmio (Cd) en algunas zonas de Colombia, que reduce la inocuidad del producto. Santander es el departamento con mayor área sembrada y producción de cacao a nivel nacional con 45.472 ha y 23.430 Mg (Agronet, 2016). Sin embargo, existen algunos municipios en este departamento, en donde se han encontrado altos valores de Cd en suelos y grano y ésta reduce la inocuidad del producto. La absorción de este metal por plantas de cacao (*Theobroma cacao*) recientemente ha despertado un gran interés, debido a que la Unión Europea definió los valores máximos permitidos para Cd en productos de cacao importados para ser aplicados en el 2019 (OJEU, 2014²). En este sentido, es necesario identificar los factores que rigen la acumulación de Cd en los granos de cacao y encontrar medidas para reducir su concentración (Gramlich *et al.*, 2018). Se han empleados varios métodos para mitigar la translocación de Cd presente en la solución del suelo hacia la parte aérea de las plantas (Wang *et al.*, 2009), sin embargo, estos métodos no son tan fáciles en la práctica por tiempo y altos costos (Wang *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2011). Como una alternativa los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), han sido evaluados en diferentes estudios con el fin de que las plantas micorrizadas sean más tolerantes a altas concentraciones de este metal en el suelo que

las plantas no micorrizadas (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016).

Diferentes estudios han demostrado que la simbiosis HFMA – planta puede disminuir la translocación de metales pesados (MP) en diferentes especies vegetales, lo que significa que el uso de estos hongos podrían ser una herramienta biotecnológica para el manejo de sistemas agrícolas con contaminación por MP (Janousková *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2016; Merlos *et al.*, 2016). Las estructuras más importantes de los HFMA involucradas en la tolerancia a MP, son los arbusculos, las vesículas y las hifas (Hildebrandt *et al.*, 2007). Estos hongos producen una glicoproteína llamada glomalina y ha mostrado su potencial al momento de establecer enlaces con moléculas de alta toxicidad, aunque la cantidad que se produce solo puede inmovilizar < 1% del Cd total presente en la solución del suelo, sin embargo, podría constituir una barrera eficaz para acumular este elemento (González-Chávez *et al.*, 2004; Hildebrandt *et al.*, 2007; Shahabivand *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2016). Debido a que, en los HFMA se produce una gran cantidad de micelio, esto les confiere la posibilidad de poder acumular compuestos xenobióticos y así limitar su disponibilidad para las plantas. (Aguirre *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que tienen los HFMA *Glomus macrocarpum*, *Rhizoglossum intraradices* y un consorcio de HFMA nativos aislados de suelos cacaoteros con altas concentraciones de Cd sobre los porcentajes de colonización, la biomasa, captación de nutrientes y translocación del metal en un patrón de cacao.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Sitio donde se Realizó el Estudio

Este estudio se llevó a cabo en los invernaderos de la corporación colombiana de investigación agropecuaria – AGROSAVIA, en el centro de investigación La Suiza, con un promedio de temperatura de 28 °C y una humedad relativa de 85%, localizada a una altitud de 540 m, ubicada a 7° 22' 11.14" N y 73° 10' 37.92" O en Rionegro – Colombia.

¹ Pacheco-Ruiz, J. A. 2014. Cacao y su aporte al desarrollo colombiano. Trabajo de grado, Especialización de Gerencia en Comercio Internacional. Universidad Militar Nueva Granada. Código: 8600812. Bogotá, Colombia.

² OJEU (Official Journal European Union). 2014. Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs Text with EEA relevance. The European Commission. Luxembourg.

Selección y Multiplicación de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA)

Se evaluaron los HFMA *Rhizoglyphus intraradices* ((N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl comb. nov.) y *Glomus macrocarpum* (Tul & C. Tul) junto con un consorcio de HFMA provenientes de suelos cacaoteros con altos contenidos de Cd del Departamento de Santander del Municipio de San Vicente de Chucuri. Estos microorganismos hacen parte de la colección de trabajo de AGROSAVIA.

La multiplicación de los HFMA se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero utilizando como hospedero plantas de *Brachiria decumbens* y *Allium cepa* L., las semillas de estas dos especies fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y sembradas en bandejas de 72 alvéolos. A cada alvéolo se le aplicó una concentración de 70 esporas de HFMA g⁻¹ de suelo seco. Después de un mes, las plantas fueron trasplantadas a macetas de 500 g de capacidad, después de tres meses las plantas fueron sometidas a estrés hídrico para obtener un mayor número de esporas.

Establecimiento de Ensayos

Para el establecimiento de los ensayos se usó el patrón de cacao IMC67, estos ensayos se llevaron a cabo en el C.I. La Suiza. El diseño experimental fue de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones, una unidad experimental con 15 plantas y un arreglo factorial de 4 × 5 que corresponden a 4 tratamientos de inoculación con HFMA (T1: Testigo; T2: *G. macrocarpum*; T3: *Rhizoglyphus intraradices* y T4: HFMA – nativos y 5 dosis de Cd (0, 6, 12, 18 y 25 mg kg⁻¹). El patrón de cacao fue sembrado bajo condiciones de vivero en bolsas con capacidad de 1 kg, cada planta se inoculó con una concentración de 80 esporas g⁻¹ de suelo seco de cada uno de los HFMA evaluados. Esta inoculación se realizó al momento de la siembra de las semillas de los patrones evaluados (tiempo cero). Cuarenta días después de la siembra, se realizó la aplicación de Cd a razón de 10 ml planta⁻¹ con una única dosis, de acuerdo con las dosis mencionadas anteriormente. Para el mantenimiento de las plantas, estas fueron fertilizadas con 10-30-10 aplicando 5 g para el testigo (T1) que corresponde al 100% de fertilización y 2.5 g para los demás tratamientos inoculados con HFMA (T2, T3 y T4) que corresponde al 50% de fertilización.

Sistema de Muestreo y Variables Analizadas

Se realizaron cuatro muestreos destructivos (30, 60, 90 y 120 días después de la siembra). El muestreo inicial se realizó a los 30 días después de establecido el ensayo y antes de aplicar las diferentes dosis de cadmio.

En cada muestreo destructivo se midieron variables agronómicas como altura, diámetro del tallo de la planta, peso fresco y seco de las hojas, tallos y raíz. A nivel simbiótico, se evaluó el porcentaje de colonización por parte de los HFMA en el primero y último muestreo, empleando la metodología de tinción con Azul de Tripán, propuesta por Phillips y Hayman (1970). Al final se realizó un análisis de la concentración de Cd en los órganos de la planta, así como un análisis de la concentración de elementos en toda la planta. Para la determinación de nutrientes en toda la planta, las muestras fueron secadas en una estufa a 60 °C por tres días, posteriormente fueron molidas y tamizadas. La cuantificación de P, K, Ca, Fe, Cu, Zn y Mn en toda la planta se realizó en digestión cerrada con ácido nítrico, peróxido y agua en relación 5:1:2 respectivamente, la cuantificación se llevó a cabo en un espectrómetro de absorción atómica marca Agilent 280; la concentración de nitrógeno se hizo por el método de Kjeldahl, teniendo en cuenta la metodología EPA 351.3. La extracción y cuantificación de Cd en cada uno de los órganos evaluados (raíz, tallo y hojas) se realizó por digestión abierta con ácido nítrico y perclórico en relación 5:2 a través de un espectrómetro óptico de plasma acoplado inductivamente (ICP) marca Thermo Fisher Scientific 6000.

Las concentraciones obtenidas de Cd, en cada órgano de la planta, fueron usadas para estimar el factor de translocación (FT). Este factor indica la capacidad que tiene la planta para translocar el metal de las raíces a la parte aérea y está representado por la siguiente Ecuación 1 (Pachura *et al.*, 2016).

$$FT = \frac{\text{Concentración de metal en la parte aérea (tallo y hoja)}}{\text{Concentración del metal en la raíz}} \quad (1)$$

Análisis Estadístico

Se realizó un ANAVA multifactorial. Después se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey para los análisis paramétricos que resultaron significativos. El nivel de significancia empleado para todas las pruebas fue de 0.05. Los análisis fueron

realizados con el programa STATISTIX 9.0 software (Analytical Software; Tallahassee, FL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables Agronómicas

La interacción dosis por tratamiento, no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos, en las variables de altura de la planta, diámetro del tallo (Cuadro 1) y peso seco de raíz, tallo y hojas (Cuadro 2). A pesar de que no se presentaron diferencias estadísticas en las variables mencionadas anteriormente, se observó que todos los tratamientos inoculados con HFMA, en las diferentes dosis evaluadas, presentaron valores iguales o superiores en comparación con el tratamiento que no estaba inoculado con HFMA (testigo), lo que significa que los tratamientos con HFMA, al tener solo el 50% de la fertilización, fueron más eficientes en la toma de nutrientes del suelo, en comparación con el testigo que tenía el 100% de fertilización (Cuadros 1 y 2).

La tendencia fue similar para la variable de biomasa representada en peso seco de las hojas, tallos y raíz en donde no se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) (Cuadro 2). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias entre tratamientos, se observa que los tratamientos inoculados con HFMA, especialmente el inoculado con HFMA–nativas, presentó mayores valores de biomasa con relación

a los testigos sin y con aplicación de Cd. Estos incrementos en la biomasa en las plantas inoculadas con HFMA pueden ser debido a que, cuando las plantas están en asociación con HFMA, son más eficientes en la toma de nutrientes y agua del suelo.

Los metales pesados en el suelo afectan el crecimiento de las plantas y representa una amenaza potencial para los agroecosistemas, así como para la salud humana, a través de las cadenas alimentarias. Chang *et al.* (2018) encontraron que las aplicaciones de lantano (La) y Cd tanto en forma individual y combinada tiene efectos negativos sobre el crecimiento en maíz disminuyendo en un 15.3% la biomasa de las hojas, raíces y total de la planta, sin embargo, cuando las plantas de maíz estaban micorrizadas con *C. etunicatum* la biomasa se incrementaba en un 26.2% más, comparado con los tratamientos con los metales sin micorrizas; lo que indica que la asociación HFMA – planta puede disminuir la fitotoxicidad de metales pesados y esto ha sido documentado en numerosos estudios (Garg y Kaur, 2013; Liu *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2016; Gunathilakae *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2018). Estudios realizados en plantas de *Lonicera japonica* inoculadas con *G. versiforme* y *R. intraradices* bajo diferentes niveles de Cd (0, 10 y 20 mg kg⁻¹) demostraron que la biomasa de las plantas (hojas y raíz) fue más alta en los tratamientos inoculados con los HFMA en comparación al testigo independientemente de la dosis evaluada (Jiang *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Altura y diámetro de plantas de cacao (patrón IMC 67) a los 120 días después de la siembra bajo diferentes dosis de cadmio (Cd).

Table 1. Height and diameter of cocoa plants (IMC 67 pattern) 120 days after sowing under different doses of cadmium (Cd).

Dosis de Cd (mg kg ⁻¹)	Altura (cm)					Diámetro (mm)				
	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24
Fuente de variación										
Testigo	57a [†]	53.07a	63.1a	56.13a	57.2a	10.03a	10.1a	10.47a	9.9a	10.17a
<i>Glomus macrocarpum</i>	60.97a	53.47a	57.2a	52.63a	56.7a	10.3a	10.77a	10.4a	10.23a	10.23a
<i>Rhizogloium intraradices</i>	57.33a	52.25a	54.77a	54.97a	55.6a	10.2a	10.25a	10.57a	10.57a	11.1a
HFMA-Nativos	64.7a	53.67a	61.4a	60.67a	53.9a	10.33a	10.3a	10.6a	11.17a	10.57a
Cd × T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

[†] Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). ns = no significativo, Cd × T = interacción dosis de cadmio por tratamiento.

[†] Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). ns = not significant, Cd × T = interaction cadmium doses per treatment.

Cuadro 2. Biomasa de plantas de cacao (patrón IMC 67) a los 120 días después de la siembra bajo diferentes dosis de cadmio (Cd).
Table 2. Biomass of cocoa plants (IMC 67 pattern) at 120 days after sowing under different doses of cadmium (Cd).

Dosis de Cd (mg kg ⁻¹)	Peso seco (g)														
	Hoja					Tallo					Raíz				
	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24	0	6	12	18	24
Fuente de variación															
Testigo	4a	4,4	4.77a	3.6a	4.97a	7.37a	6.73a	8.9a	6.03a	7.87a	4.53a	4.83a	5.07a	3.7a	4.83a
<i>Glomus macrocarpum</i>	4.2a	4.37a	4.4a	3.73a	4.1a	8.2a	8.13a	7.97a	6.93a	6.93a	5.07a	4.93a	5.17a	3.98a	4.17a
<i>Rhizogloium intraradices</i>	4.87a	4.3a	4.6a	4.57a	5.4a	7.33a	6.9a	7.63a	8.27a	8.7a	3.97a	3.95a	5.03a	4.23a	5.37a
HFMA-Nativos	5.23a	4.4a	5.57a	4.7a	4.67a	7.93a	8.13a	8.67a	8.8a	7.5a	4.53a	4.7a	4.97a	5.07a	4.7a
Cd × T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

† Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). ns = no significativo, Cd × T = interacción dosis de cadmio por tratamiento.

† Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). ns = not significant, Cd × T = interaction cadmium doses per treatment.

Porcentaje de Colonización por Parte de los HFMA

Un incremento en la colonización por parte de los HFMA a medida que aumenta la edad de la planta se puede apreciar en la Figura 1. En este caso, el tratamiento inoculado con HFMA nativos (T4) fue

el que obtuvo los mayores valores de colonización [59.3% a los 120 días después del trasplante (ddt)]. Los porcentajes de colonización observados en el T1 (testigo + 100% de fertilización) en las diferentes dosis evaluadas, pueden atribuirse a esporas nativas presentes en ese suelo.

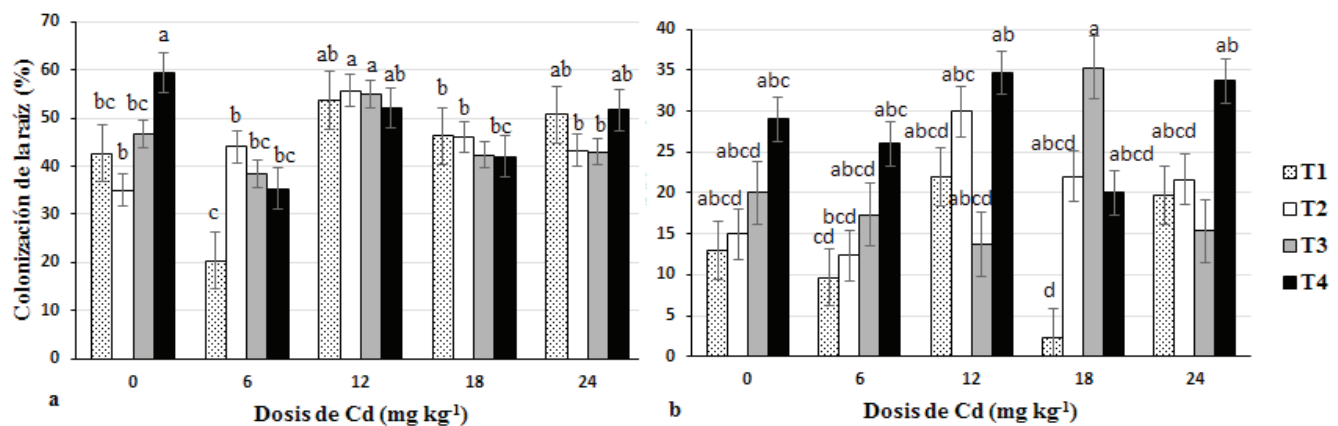


Figura 1. Porcentaje de colonización por parte de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en plantas de cacao bajo diferentes dosis de Cd a los 30 y 120 dds (a y b respectivamente). T1 = testigo + 100% de fertilización; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% de fertilización; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% de fertilización; T4 = HFMA – nativos + 50% de fertilización. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Figure 1. Percentage of colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in cocoa plants under different doses of Cd at 30 and 120 das (a and b respectively). T1 = control + 100% fertilization; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% fertilization; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% fertilization; T4 = HFMA - native + 50% fertilization. Different letters indicate significant differences according to the Tukey test ($P \leq 0.05$).

En este estudio se pudo observar que la adición de diferentes dosis de Cd (0, 6, 12, 18 y 24 mg kg⁻¹) al suelo, no afectó la simbiosis HFMA – planta como se ha visto en muchos trabajos realizados (Ortiz-Cano *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Gunathilakae *et al.*, 2018; Gai *et al.*, 2018). Estos resultados, concuerdan con estudios realizados en plantas de *Amaranthus hybridus* L. en suelos contaminados con 300 mg kg⁻¹ de Pb y 15 mg kg⁻¹ de Cd e inoculado con diferentes dosis del metal (0, 2.5 y 5 g kg⁻¹) y de una mezcla de HFMA (*Entrophospora colombiana*, *Glomus intraradices*, *G. etunicatum* y *G. clarum*) donde se encontró que los porcentajes de colonización aumentaban a medida que pasaba el tiempo (Ortiz-Cano *et al.*, 2009). Muchas especies de HFMA como *Gi. rosea*, *G. mossae*, *G. caledonium* y *G. claroideum* se pueden volver más tolerantes en sustratos contaminados con As, Cu, Cd, Pb y Mn a medida que pasa el tiempo (Sánchez-Viveros *et al.*, 2004), lo que puede indicar que quizá algunas de estas especies de HFMA mencionadas podría estar presente en el tratamiento inoculado con HFMA nativos, ya que este tratamiento fue el que presentó los porcentajes de colonización más altos (Figura 1). Liu *et al.* (2014) inocularon tres cepas diferentes de HFMA (*G. intraradices*, *G. constrictum* y *G. mosseae*) en maíz con diferentes dosis de Cd (0.02 y 0.2 mM) bajo condiciones de invernadero y observó que los porcentajes de colonización de estos hongos aumentaba con la dosis de Cd aplicado durante las primeras 6 semanas. Sin embargo, después de 9 semanas, estos porcentajes de colonización disminuyeron para los tratamientos inoculados con *G. constrictum* y *G. mosseae* siendo *G. intraradices* el que mostró los mayores valores de colonización de la raíz (72.3%).

Absorción de Cadmio en Hojas, Tallos y Raíces

Se presentó una absorción de Cd hacia todos los órganos de la planta evaluados, donde se observó una disminución de este metal en el tratamiento inoculado con HFMA – nativos en la dosis de 24 mg kg⁻¹ a los 120 ddt, en comparación a los demás tratamientos con HFMA (T2 y T3) y el testigo (T1) en esta misma dosis (24 mg kg⁻¹) (Figura 2). En contraste, se pudo observar que en las demás dosis de Cd evaluadas (0, 6, 12 y 18 mg kg⁻¹) las plantas que estaban inoculadas con HFMA (T2, T3 y T4) translocaron más Cd que el testigo (T1), esto pudo ser debido a que las plantas

cuando están colonizadas por HFMA aumentan el área superficial de exploración del suelo a través de su micelio extraradical, permitiendo una mayor translocación de macro y micronutrientes incluyendo metales pesados (Smith *et al.*, 2010).

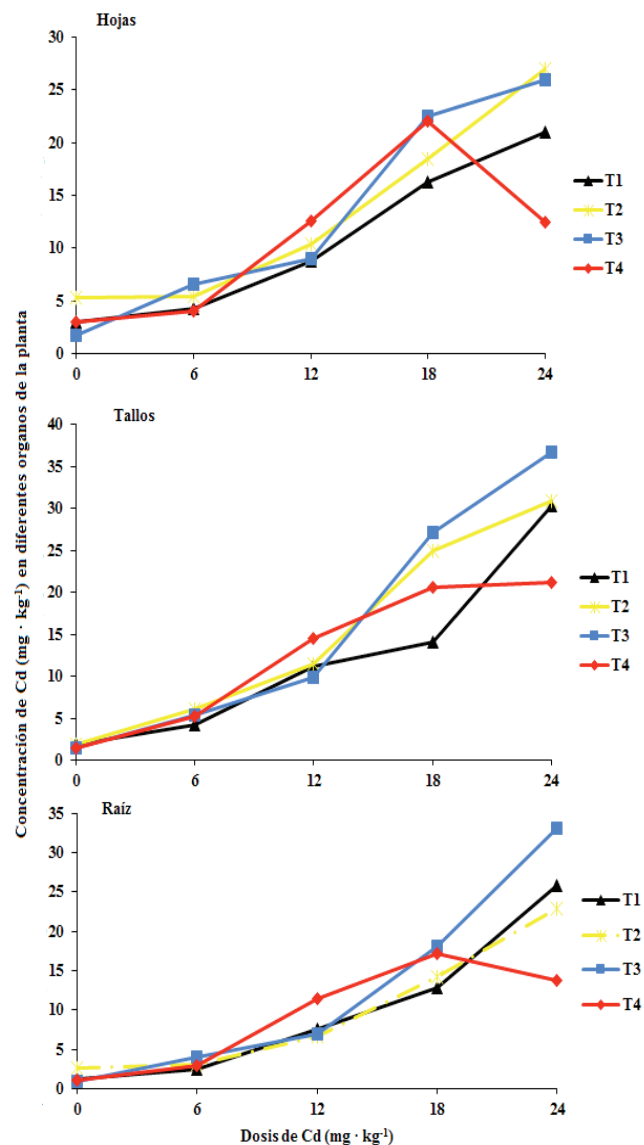


Figura 2. Absorción de cadmio (Cd) en hojas, tallos y raíces en plantas de cacao (IMC67) bajo la aplicación de diferentes dosis de Cd. T1 = testigo + 100% de fertilización; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% de fertilización; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% de fertilización; T4 = HFMA – nativos + 50% de fertilización.

Figure 2. Absorption of cadmium (Cd) in leaves, stems and roots in cocoa plants (IMC67) under the application of cadmium doses. T1 = control + 100% fertilization; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% fertilization; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% fertilization; T4 = HFMA - native + 50% fertilization.

Las concentraciones obtenidas fueron usadas para estimar el FT, en donde los resultados obtenidos en el patrón IMC67 demuestran que el Cd es fácilmente transferible en este patrón ya que se encontraron valores superiores a 1 tanto en el tallo como en las hojas, sin embargo, los tratamientos inoculados con *R. intraradices* y HFMA-nativos presentaron valores menores a 1 a la concentración de 24 mg kg⁻¹ en las hojas (Cuadro 2), lo que indica que la mayor concentración del metal queda en el tallo de la planta, en esta etapa fenológica de la planta.

Se ha demostrado que algunos HFMA pueden soportar mejor el estrés por metales pesados como los son *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* y algunas otras especies importantes de *Glomus* (Bano y Ashfaq, 2013), quizá algunas de estas especies está presente en el tratamiento inoculado con HFMA – nativos evaluado en este proyecto y de ahí la importancia de realizar este tipo de estudios para poder seleccionar HFMA que estén más adaptados a esas condiciones y que estos les pueda brindar cierta protección a las plantas contra el estrés causado por metales como lo es el Cd.

Li *et al.* (2016), evaluaron dos especies de micorrizas (*Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*) bajo diferentes concentraciones de Cd (0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 mM) por tres días en un sistema de cultivo hidropónico con plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), y observaron que los hongos micorrízicos disminuyeron significativamente las concentraciones de Cd en las hojas y raíces de las plantas, siendo el tratamiento inoculado con *F. mosseae* quien realizó una notable disminución del metal a una concentración de 0.025 mM en comparación a *R. intraradices*. Existen diferentes posibles mecanismos responsables de la reducción de Cd en plantas inoculadas con hongos micorrízicos, uno de ellos es un posible efecto de dilución por un aumento de biomasa debido al efecto positivo que tienen los HFMA sobre el crecimiento de las plantas (Liu *et al.*, 2011); por otra parte los HFMA producen una glicoproteína insoluble llamada glomalina lo cual actúa como secuestrante de metales pesados (González-Chávez *et al.*, 2004; Cornejo *et al.*, 2008; Bedini *et al.*, 2010). Adicionalmente, las plantas cuando están micorrizadas disminuyen los niveles de expresión de algunos transportadores del metal en la raíz en comparación con las plantas no micorrizadas

(Burleigh *et al.*, 2003), por lo tanto los HFMA pueden actuar como amortiguadores de metales aumentando el suministro del metal en concentraciones bajas pero disminuyéndolo cuando está en concentraciones tóxicas para la planta (González-Guerrero *et al.*, 2016), como lo observado en este estudio, en donde a concentraciones altas (24 mg kg⁻¹) de Cd los HFMA disminuyeron su translocación hacia la planta.

Absorción de Nutrientes

Se presentó una mayor absorción de nutrientes como el N, P, K y Ca en los tratamientos inoculados con HFMA en comparación al testigo, en donde el tratamiento inoculado con HFMA – nativos fue el que obtuvo las mayores concentraciones de estos elementos tanto en la dosis cero como hasta la dosis de 12 mg kg⁻¹, la concentración de estos elementos disminuye a una alta concentración de Cd (24 mg kg⁻¹) tal y como se puede observar en la Figura 3.

Dentro de los metales pesados se pueden distinguir dos grupos. El primero de estos grupos está formado por aquellos elementos considerados como esenciales para las plantas. Es decir, aquellos elementos que las plantas necesitan en muy pequeñas cantidades para completar su ciclo de vida como lo son el Fe, Cu, Zn y Mn. El segundo grupo lo forman aquellos elementos que, en muy baja concentración no los requiere la planta como lo es el Cd. El mantenimiento de la homeostasis del grupo de los metales esenciales es clave para la existencia de un ser vivo, ya que tanto su exceso como su defecto pueden resultar perjudiciales (González-Guerrero, 2005³). Los resultados obtenidos en la absorción de micronutrientes como el Fe, Cu, Zn y Mn se pudieron observar que los tratamientos inoculados con HFMA presentaron la mayor absorción de esos micronutrientes, siendo el tratamiento inoculado con los HFMA – nativos (T4) seguido de *R. intraradices* los que obtuvieron los mayores valores en las diferentes dosis de Cd aplicadas en comparación con los testigos y los demás tratamientos inoculados con HFMA (Figura 4).

La distribución de micro y macroelementos en los tratamientos inoculados y no inoculados con HFMA, bajo diferentes concentraciones de Cd, indican que los HFMA nativos fueron los que obtuvieron mayores

³ González-Guerrero, M. 2005. Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*. Tesis de doctorado. Universidad de Granada, Granada, España.

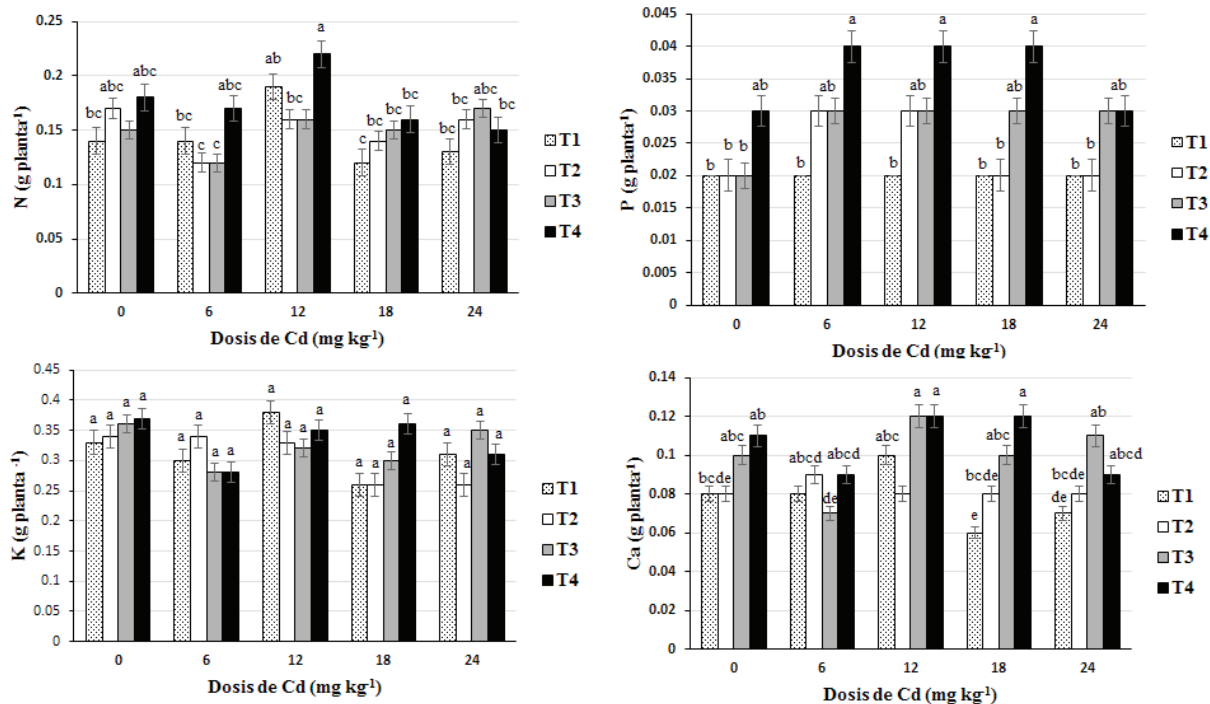


Figura 3. Absorción de N, P, K y Ca en plantas de cacao (IMC67) bajo diferentes dosis de cadmio. T1 = testigo + 100% de fertilización; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% de fertilización; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% de fertilización; T4 = HFMA – nativos + 50% de fertilización. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Absorption of N, P, K and Ca in cocoa plants (IMC67) under different doses of cadmium. T1 = control + 100% fertilization; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% fertilization; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50 % fertilization; T4 = HFMA - native + 50% fertilization. Different letters indicate significant differences according to the Tukey test ($P \leq 0.05$).

concentraciones de estos elementos en las plantas de cacao (patrón IMC67) (Figuras 3 y 4). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son bien conocidos porque mediante su red de micelio externo pueden explorar un mayor volumen de suelo y así tomar los nutrientes esenciales para las plantas, especialmente el P. En ese sentido, las plantas al tener una mejor nutrición por P aumentarían su biomasa y podría existir un posible efecto de dilución por el crecimiento de las plantas como se ha observado en diferentes estudios (Shen *et al.*, 2006; Shahabivand *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017). Un estudio realizado en *Phragmites australis* inoculado con *R. irregularis* bajo diferentes concentraciones de Cd, se observó que hubo una fuerte correlación entre el Cd y el P al mejorar la absorción de P en las hojas y proporcionando una mayor protección a las plantas (Huang *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

En este estudio se observó que hubo translocación de cadmio (Cd), lo que sugiere que el cacao puede vivir bajo estas condiciones. Sin embargo, el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) podría reducir la translocación de este metal hacia la parte aérea de la planta, pero esto dependería del HFMA a evaluar, que para efectos de este estudio y hasta en la etapa que se evaluó (vivero 4 meses) los HFMA nativos podrían integrarse como estrategia para reducir la translocación del metal hacia la planta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Jeyson Alexander Rondano por su apoyo en la toma de datos de la presente investigación en el centro de investigación La Suiza.

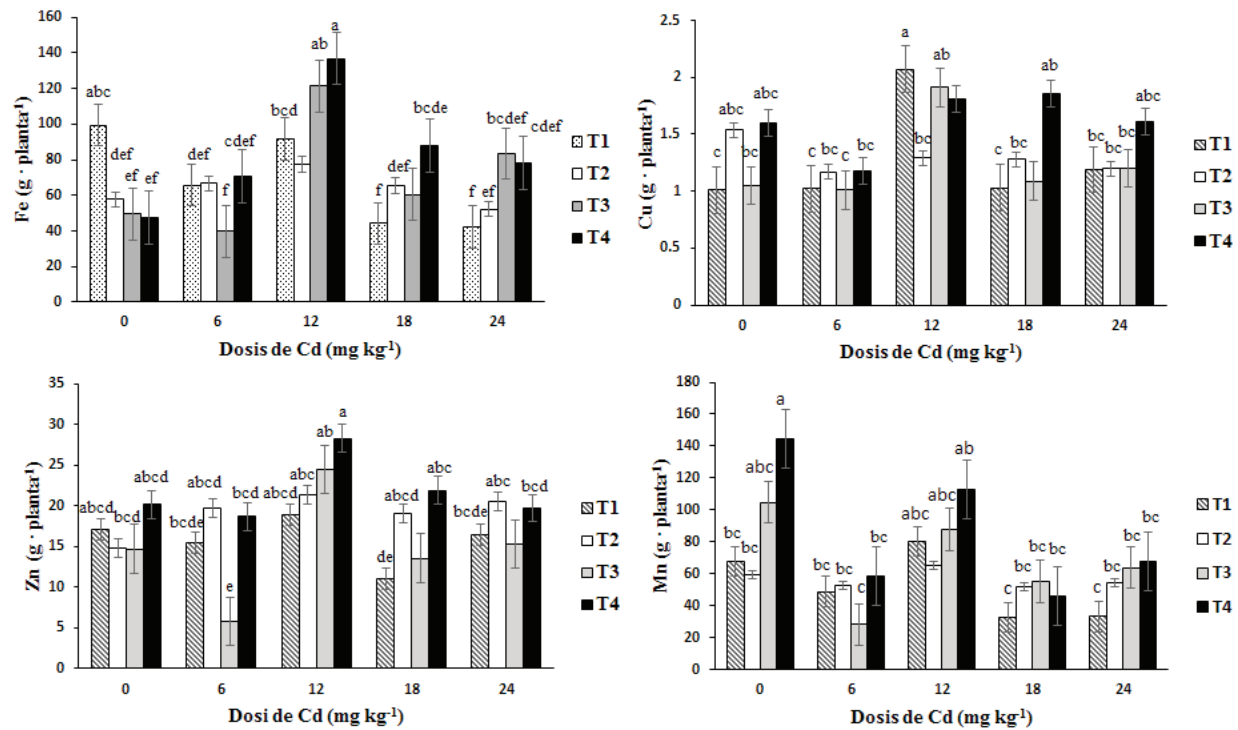


Figura 4. Absorción de Fe, Cu, Zn y Mn en plantas de cacao (IMC67) bajo diferentes dosis de cadmio. T1 = testigo + 100% de fertilización; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% de fertilización; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% de fertilización; T4 = HFMA – nativos + 50% de fertilización. Letras distintas indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).
Figure 4. Absorption of Fe, Cu, Zn and Mn in cocoa plants (IMC67) under different doses of cadmium. T1 = control + 100% fertilization; T2 = *Glomus macrocarpum* + 50% fertilization; T3 = *Rhizogloium intraradices* + 50% fertilization; T4 = HFMA - native + 50% fertilization. Different letters indicate significant differences according to the Tukey test ($P \leq 0.05$).

LITERATURA CITADA

- Aguirre R., W., G. Fischer y T. Miranda. 2011. Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 5: 141-153. doi: 10.17584/rcch.2011v5i1.1260.
- Bano, S. A. and D. Ashfaq. 2013. Role of mycorrhiza to reduce heavy metal stress. *Nat. Sci.* 5: 16-20. doi: 10.4236/ns.2013.512A003.
- Bedini, S., A. Turrini, Ch. Rigo, E. Argese, and M. Giovannetti. 2010. Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biol. Biochem.* 42: 758-765. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.01.010.
- Burleigh, S. H., B. K. Kristensen, and I. E. Benchman. 2003. A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. *Plant Mol. Biol.* 52: 1077-1088. doi: 10.1023/A: 1025479701246.
- Chang, Q., F. Diao, Q. Wang, L. Pan Z. Dang, and W. Guo. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on growth, nutrient and metal uptake by maize seedlings (*Zea mays* L.) grown in soils spiked with Lanthanum and Cadmium. *Environ. Pollut.* 241: 607-615. doi: 10.1016/j.envpol.2018.06.003.
- Cornejo, P., S. Meier, G. Borie, M. C. Rillig, and F. Borie. 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci. Total Environ.* 406: 154-160.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. Food and agriculture data. [http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries by commodity](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries%20by%20commodity). (Consulta: septiembre 20, 2018).
- Gai, J. P., J. Q. Fan, S. B. Zhang, N. N. Mi, P. Christie, X. L. Li, and G. Feng. 2018. Direct effects of soil cadmium on the growth and activity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 7: 43-48. doi: 10.1016/j.rhisph.2018.07.002.
- Garg, N. and H. Kaur, 2013. Impact of cadmium-zinc interactions on metal uptake, translocation and yield in pigeonpea genotypes colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Nutr.* 36: 67-90.
- González-Chávez, M. C., R. Carrillo-González, S. F. Wright, and K. A. Nichols. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 130: 317-323. doi: 10.1016/j.envpol.2004.01.004.
- González-Guerrero, M., V. Escudero, Á. Saéz, and M. Tejada-Jiménez. 2016. Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: Arbuscular mycorrhizal fungi

- and rhizobia. *Front. Plant Sci.* 7:1088. doi: 10.3389/fpls.2016.01088.
- Gramlich, A., S. Tandy, C. Gauggel, M. López, D. Perla, V. Gonzalez, and R. Schulin. 2018. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Sci. Total Environ.* 612: 370378. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.145.
- Gunathilakae, N., Y. Neelamanie, and H. Rasika. 2018. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the cadmium phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Groundwater Sust. Develop.* 7: 477-482. doi:10.1016/j.gsd.2018.03.008.
- Guo, W., R. Zhao, W. Zhao, R. Fu, J. Guo, N. Bi, and J. Zhang. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grown in rare earth elements of mine tailings. *Appl. Soil Ecol.* 72: 85-92.
- He, B., Z. Yun, J. Shi, and G. Jiang. 2013. Research progress of heavy metal pollution in China: sources, analytical methods, status, and toxicity. *Chinese Sci. Bull.* 58: 134-140.
- Hildebrandt, U., M. Regvar, and H. Bothe. 2007. Arbuscular mycorrhizal and heavy metal tolerance. *Photochemistry* 68: 139-146.
- Huang, X., H. Shih-Hsin, Z. Shishu, M. Fang, W. Jieting, and Y. Jixian. 2017. Adaptive response of arbuscular mycorrhizal symbiosis to accumulation of elements and translocation in *Phragmites australis* affected by cadmium stress. *J. Environ. Managem.* 197: 448-455. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.04.014.
- Janousková, M., D. Pavlíková, and M. Vosátka. 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* 65: 1959-1965. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.007.
- Jiang, Q.Y., F. Zhuo, S. H. Long, H. D. Zhao, D. J. Yang, Z. H. Ye, S. S. Li, and Y. X. Jing. 2016. Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Sci. Rep.* 19: 6: 21805. doi: 10.1038/srep21805.
- Li, H., N. Luo, L. J. Zhang, H. M. Zhao, Y. W. Li, Q. Y. Cai, M. H. Wong, and C. H. Mo. 2016. Do arbuscular mycorrhizal fungi affect cadmium uptake kinetics, subcellular distribution and chemical forms in rice? *Sci. Total Environ.* 571: 1183-1190. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.124.
- Liu, L. Z., Z. Q. Gong, Y. L. Zhang, and P. J. Li. 2011. Growth, cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* 21: 319-327. doi: 10.1016/S1002-0160(11)60132-X.
- Liu, L. Z., Z. Q. Gong, Y. L. Zhang, and P. J. Li. 2014. Growth, cadmium uptake and accumulation of maize (*Zea mays* L.) under the effects of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology* 23: 1979-1986. doi: 10.1007/s10646-014-1331-6.
- Lopes-Leal, P., M. Varón-López, I. Gonçalves de Oliveira Prado, J. Valentim dos Santos, C. R. Fonsêca Sousa Soares, J. O. Siqueira, and F. M. de Souza Moreira. 2016. Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. *Braz. J. Microbiol.* 47: 853-862. doi: 10.1016/j.bjm.2016.06.001.
- Merlos, M. A., O. Zitka, A. Vojtech, C. Azcón-Aguilar, and N. Ferrol. 2016. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. *Plant Sci.* 253: 68-76. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.09.010.
- Ortiz-Cano, H. G., R. Trejo-Calzada, R. D. Valdez-Cepeda, J. G. Arreola-Ávila, A. Flores-Hernández y B. López-Ariza. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 15: 161-168.
- Pachura, P., A. O. Kubicka, and B. S. Grabowska. 2016. Assessment of the availability of heavy metals to plants based on the translocation index and the bioaccumulation factor. *Desalin. Water Treat.* 57: 1469-1477.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3.
- Qiu, Q., Y. Wang, Z. Yang, and J. Yuan. 2011. Effects of phosphorus supplied in soil on subcellular distribution and chemical forms of cadmium in two Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars differing in cadmium accumulation. *Food Chem. Toxicol.* 49: 2260-2267.
- Sánchez-Viveros, G., R. Carrillo-González, Á. Martínez-Garza y M. C. González-Chávez. 2004. Tolerancia adaptativa de hongos micorrizicos arbusculares al crecer en sustratos contaminados con As y Cu. *Rev. Int. Contam. Amb.* 20: 147-158.
- Shahabivand, S., H. Z. Maivan, E. M. Goltapeh, M. Sharifi, and A. A. Aliloo. 2012. The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 53-58. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.018.
- Shen, H., P. Christie, and X. Li. 2006. Uptake of zinc, cadmium and phosphorus by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) from a low available phosphorus calcareous soil spiked with zinc and cadmium. *Environ. Geochem. Health* 28: 111-119. doi: 10.1007/s10653-005-9020-2.
- Smith, S. E., E. Facelli, S. Pope, and F. A. Smith. 2010. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326: 3-20.
- Wang, J., J. Yuan, Z. Yang, B. Huang, Y. Zhou, J. Xin, Y. Gong, and H. Yu. 2009. Variation in cadmium accumulation among 30 cultivars and cadmium subcellular distribution in 2 selected cultivars of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.). *J. Agric. Food Chem.* 57: 8942-8949. doi: 10.1021/jf900812s.
- Wang, Y., J. Huang, and Y. Gao. 2012. Arbuscular mycorrhizal colonization alters subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Medicago sativa* L. and resists cadmium toxicity. *PLoS One* 7: e48669. doi: 10.1371/journal.pone.0048669.