UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

"VIGILADA MINEDUCACIÓN"

EFECTO Y BIOACUMULACIÓN DEL CADMIO EN CUATRO ESPECIES FORESTALES (Tabebuia rosea (Bertol.) DC, Terminalia superba Engl. & Diels, Albizia guachapele (Kunth) Dugand, Cariniana pyriformis Miers) Y NUEVE GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*)

DONALD ADRIAN GALVIS NEIRA

Trabajo de grado presentado ante la facultad de ciencias básicas para la obtención del título de Magister en Biotecnología.

MONTERIA, CORDOBA

Septiembre de 2021

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

"VIGILADA MINEDUCACIÓN"

EFECTO Y BIOACUMULACIÓN DEL CADMIO EN CUATRO ESPECIES FORESTALES (*Tabebuia rosea (Bertol.) DC, Terminalia superba Engl. & Diels, Albizia guachapele (Kunth) Dugand, Cariniana pyriformis Miers*) Y NUEVE GENOTIPOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*)

DONALD ADRIAN GALVIS NEIRA

Directora: Dra. Rosalba Ruiz Vega
Codirectora: Dra. Yeirme Yaneth Jaimes Suarez

Trabajo de grado presentado ante la facultad de ciencias básicas para la obtención del título de Magister en Biotecnología.

MONTERIA, CORDOBA
Septiembre de 2021

DEDICATORIA

Dedicado a mi padre, Donaldo Galvis Cárdenas y a mi madre Patricia Neira.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) y a la Universidad de Cordoba por suministrar los recursos necesarios para el desarrollo de los experimentos.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS VI

LISTA DE FIGURAS VII

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

INTRODUCCION GENERAL 5

MARCO TEÓRICO 8

Origen e importancia del cultivo del cacao 8

Metales pesados 10

El cadmio en la interfaz suelo-planta 11

El cadmio en los alimentos y en la salud humana 14

Tecnologías de fitorremediación 15

Especies forestales usadas en la fitorremediación 18

Mecanismo de absorción del cadmio 19

Partición de cadmio dentro de la planta 20

Diferencias genotípicas en la absorción y partición de cadmio 21

Tolerancia de plantas al cadmio 21

REFERENCIAS.....22

Capítulo 1 Dinámica en la acumulación de cadmio en nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao L.*).....36

RESUMEN.....37

ABSTRACT.....39

INTRODUCCIÓN.....40

MATERIALES Y MÉTODOS.....44

Localización del área experimental.....44

Establecimiento de los experimentos.....44

Variables de crecimiento y contenido de cadmio.....45

Diseño experimental y análisis estadístico.....47

RESULTADOS.....47

DISCUSIÓN.....52

CONCLUSIONES.....56

RECOMENDACIONES.....57

REFERENCIAS.....58

Capítulo 2 Dinámica de la acumulación y potencial para fitorremediación de cadmio de las especies *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC, *Terminalia superba* Engl. & Diels, *Albizia guachapele* (Kunth) Dugand, *Cariniana pyriformis* Miers asociadas al cultivo de cacao. 81

RESUMEN 82

ABSTRACT 84

INTRODUCCIÓN 86

MATERIALES Y MÉTODOS 90

Localización del área experimental 90

Desarrollo del experimento hidropónico 90

Variables de crecimiento y contenido de cadmio 91

Diseño experimental y análisis estadístico 92

RESULTADOS 93

DISCUSIÓN 98

CONCLUSIONES 101

REFERENCIAS 103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.Principales países productores de grano de cacao en el mundo. 9

CAPITULO 1

Tabla 1. Propiedades químicas del sustrato.....45

Tabla 2. Biomasa de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días.....48

Tabla 3. Concentración de cadmio en tejidos de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días. 50

Tabla 4. Factores de Concentración (TF, BCFA, BCFR) e índice de tolerancia de nueve genotipos expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días. 51

CAPITULO 2

Tabla 1. Factores de concentración (TF, BCFA, BCFR) de cuatro especies expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. 96

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el Test de Duncan ($p<0.05$).....49

Figura 2. Concentración aérea de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el Test de Duncan ($p<0.05$). 49

Figura 3. Concentración aérea y de raíces nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Los grupos se definieron utilizando la correlación como medida de distancia y la media como algoritmo de agrupación. Datos transformados mediante transformación logarítmica (ln). 51

CAPITULO 2

Figura 1. Biomasa total desarrollada por cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. 94

Figura 2. Número de hojas de cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. 95

Figura 3. Concentración de cadmio en hojas, tallo y raíces de cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$).....97

Figura 4. Tasa relativa de crecimiento de cuatro especies forestales expuestas a a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). * Factor de remediación.....100

RESUMEN

El cadmio (Cd) es un metal pesado biológicamente no esencial que puede causar efectos tóxicos en plantas, animales y humanos. En el cultivo de cacao de Latinoamérica se han reportado altas concentraciones de este elemento, superando los niveles aceptados por la Unión Europea, comprometiendo la inocuidad de los productos finales y las exportaciones del cultivo.

En Colombia, el cultivo de cacao se desarrolla principalmente bajo sistemas agroforestales (SAF), siendo importante identificar y cuantificar el aporte de las especies acompañantes de los SAF y su contribución al ciclo natural del cadmio, por lo que se evaluó el efecto y la acumulación del Cd sobre el crecimiento de cuatro especies de maderables asociadas al SAF del cacao (*Tabebuia rosea, Terminalia superba, Pseudosamanea guachapele, Cariniana pyriformis*) y nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao L*.) usados comúnmente como portainjertos.

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación La Suiza – Agrosavia, usando sustrato hidropónico bajo condiciones de invernadero, estableciendo un experimento por especie estudiada, bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones, se aplicaron tres tratamientos con dosis crecientes de cadmio (0, 6 y 12 ppm). Variables de crecimiento fueron registradas y se hicieron muestreos destructivos de tejidos para la cuantificación de la concentración de Cd a los 120, 150 y 180 días después de la siembra. Los forestales *T. superba y A. guachapele* presentaron el mayor rendimiento en biomasa y acumulación de Cd en los tejidos aéreos, demostrando a su vez la mejor tolerancia de las especies forestales evaluadas a 6 ppm de Cd, destacándose con un potencial importante para restaurar suelos contaminados por Cd. Por otro lado, se encontró un grupo de genotipos de cacao con baja acumulación de Cd (IMC-67, PA-46, PA-121), concentrando la mayoría del cadmio en las raíces y una promoviendo una

baja translocación hacia los tejidos aéreos. Estos resultados sugieren que existen evidencias importantes sobre el camino a seguir en la fitotecnia del cultivo del cacao, vinculando arreglos agroforestales con principios de fitorremediación y seleccionando genotipos de cacao con baja translocación y acumulación de Cd que permitan mitigar la bioacumulación del metal en el grano de cacao.

Palabras clave: Fitorremediación, SAF, *Theobroma cacao*, cadmio, portainjertos

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a biologically nonessential heavy metal that can cause toxic effects in plants, animals, and humans. In the cultivation of cocoa in Latin America, high concentrations of this element have been reported, exceeding the levels accepted by the European Union, compromising the safety of the final products and exports of the crop.

In Colombia, cocoa cultivation is developed mainly under agroforestry systems (SAF), being important to identify and quantify the contribution of the companion species of the SAF and its contribution to the natural cycle of cadmium, for which the effect and accumulation were evaluated. of cadmium on the growth of four timber species associated with cocoa SAF (*Tabebuia rosea, Terminalia superba, Pseudosamanea guachapele, Cariniana pyriformis*) and nine cocoa genotypes (*Theobroma cacao L*.) used as rootstocks.

This work was developed at the La Suiza - Agrosavia Research Center, using hydroponic substrate under greenhouse conditions, establishing one experiment per species studied, under a completely randomized design with three repetitions, three treatments were applied with increasing doses of cadmium (0, 6 and 12 ppm). Growth variables were recorded, and destructive tissue samples were made to quantify the Cd concentration at 120, 150 and 180 days after sowing. The foresters *T. superba and A. guachapele* presented the highest yield in biomass and accumulation of Cd in the shoots, demonstrating in turn the best tolerance of the forest species evaluated at 6 ppm of Cd, standing out with an important potential to restore soils contaminated by Cd. On the other hand, a group of cocoa genotypes with low Cd accumulation (IMC-67, PA-46, PA-121) was found, concentrating most of the cadmium in the roots and one promoting a low translocation towards aerial tissues. These results suggest that there is important evidence on the way forward in cocoa crop breeding, linking agroforestry arrangements with phytoremediation

principles and selecting cocoa genotypes with low translocation and accumulation of Cd that mitigates the bioaccumulation of the metal in the bean. cocoa.

Keywords*:* Phytoremediation, SAF, *Theobroma cacao*, cadmium, rootstock

INTRODUCCION GENERAL

Los metales pesados se conocen desde hace tiempo como contaminantes, que una vez que ingresan a los suelos agrícolas y a la cadena alimenticia permanecen por mucho tiempo en el sistema (Clemens, 2006). Los valores tolerables en presencia de metales pesados varían entre pocos miligramos hasta solamente microgramos en el producto final comercial (Arévalo-Gardini et al., 2017) El cadmio (Cd) es tal vez el metal pesado con más atención por su relación con una serie de trastornos incluido el cáncer, y por su extremadamente bajo valor tolerable que está en el rango de 0.2-0.5 ppm para los alimentos terminados (Contam EFSA, 2014).La UNEP, (2010) destaca que el Cd se encuentra en todos los alimentos y que en la mayoría de los países la mayor parte de la exposición de Cd es representada por la ingesta de productos agrícolas.

Uno de estos productos es el chocolate, el cual ha presentado un incremento considerable en su consumo durante los últimos años. La demanda de este producto en cantidad y calidad se ha sostenido en aumento, y en consecuencia el precio del grano de cacao fermentado y seco. Los diversos reconocimientos obtenidos para varios países productores del grano en Suramérica informados por ILAC, (2018) se convierte en un factor motivante hacia el desarrollo del cultivo en el país, ya que con los nuevos clones de siembra de alto rendimiento y la detallada calidad organoléptica presente en el cacao colombiano se puede llegar a tener cosechas con un valor agregado y un rendimiento considerable. No obstante, existe una preocupación en la región, por el futuro de las exportaciones de cacao y sus derivados, ya que se han reportado concentraciones elevadas de trazas de Cd en el grano de cacao y chocolates en ésta región (Pabón et al., 2014; Arévalo-Gardini et al., 2017; Gramlich et al., 2017; Abt et al., 2018; Bravo et al., 2021) superando los niveles máximos establecidos por la Comunidad

Europea (Contam EFSA, 2014) convirtiéndose en una limitante importante para su comercialización.

En Colombia, Ecuador y Perú se han llevado adelante varios esfuerzos para muestrear los suelos, los frutos y el grano en zonas productoras de cacao. Estos estudios sugieren que ciertos factores en el suelo, como los orígenes del material parental, pudieran estar relacionados con contaminaciones que se presentan ocasionalmente, pero a la fecha no existe una evidencia científica determinante para poder anticipar problemas de contaminación con metales pesados relacionados al ambiente. A su vez, trabajos pioneros en estos países buscan identificar materiales con menos propensión a absorber Cd. Como solución a la problemática de contaminantes se propone el uso de plantas cultivadas y silvestres que se han usado como medio en el proceso de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Así, se han encontrado especies con capacidad de hiperacumular dichos contaminantes; también se han probado productos que mejoran el potencial fitoextractor de las plantas en la fitoremediación de suelos contaminados. Sin embargo, son pocos los estudios realizados a especies forestales, puesto que los estudios se han enfocado en la evaluación de la variación en la absorción de Cd entre las variedades de cultivos anuales. Esto traduce en una deficiencia en la investigación en cultivos perennes, especialmente para los árboles injertados, en donde el sistema de raíces desempeña un papel crucial en la absorción de metales del suelo (Savvas et al., 2011; Albacete et al., 2015).

Dado que existe una amplia variación en la absorción y acumulación de metales pesados, incluido el Cd, no solo entre diferentes especies de plantas sino también a menudo entre diferentes genotipos o variedades de la misma especie (Broadley et al., 2001 ; Grant et al., 2007 ; Zhou et al., 2016), la hipótesis soportada es que también las variedades de cacao y las especies forestales evaluadas tienen variación en la acumulación de Cd. Al comprobar la hipótesis se

permitiría ofrecer una oportunidad para reducir las concentraciones de Cd en la producción de cacao a niveles permisibles mediante el mejoramiento y la selección de cultivares con fines de fitorremediación. El estudio se desarrolló contemplando la técnica de contaminación mediante sustrato en suelo y mediante sustrato hidropónico para la evaluación de metales pesados en plantas, ésta última permite simular las condiciones edáficas mitigando el efecto “sitio” del suelo, controlando variables en la nutrición, como la microbiota natural, humedad de sustrato, niveles heterogéneos de metales y la entrada exógena de nutrientes por motivo del reciclaje natural del sistema agroforestal.

En este contexto, se desarrolló esta investigación con el objetivo de evaluar el efecto de la bioacumulación de cadmio en el crecimiento de cuatro especies forestales (*Tabebuia rosea, Terminalia superba, Pseudosamanea guachapele, Cariniana pyriformis*) y cinco portainjertos de cacao (*Theobroma cacao L*.) en etapa de vivero, para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos en invernadero que tratan de cumplir específicamente los siguientes objetivos: 1. Evaluar el potencial de bioacumulación de cadmio en cuatro especies forestales asociadas al sistema Agroforestal de cacao en etapa de vivero 2. Evaluar el potencial de bioacumulación de cadmio en nueve variedades de portainjerto de cacao (*T.cacao L*.) en etapa de vivero. 3. Determinar el efecto de tres niveles de Cd sobre el crecimiento de cuatro especies forestales (*T. rosea, T. superba, P. guachapele, C. pyriformis)* y nueve variedades de portainjerto de cacao (*T. cacao L*.) en la etapa de vivero.

MARCO TEÓRICO

Origen e importancia del cultivo del cacao

El árbol del cacao (*T. cacao)* de la familia de las Malváceas, es una planta de sotobosque, que crece en una franja geográfica fundamentalmente tropical y que se extiende unos 20º de latitud hacia ambos hemisferios. Se encuentran diversas hipótesis sobre su lugar de origen, entre ellas la provincia del Amazonas y centro América (Van Hall, 1914; Miranda, 1962; Cuatrecasas, 1964) y el reporte más reciente ubicando su origen hace 5300 años en el sureste de Ecuador sobre la provincia del alto amazonas (Zarrillo et al., 2018). Así mismo, *T. cacao* ha tenido una clasificación sujeta a sus características fenotípicas en tres grupos: Criollos, forastero y trinitario (Wood & Lass, 1985), sin embargo un estudio de la estructura y las relaciones genéticas clasifica a *T. cacao* en 10 grupos genéticos : Amelonado, Contamana, Criollo, Curaray, Guiana, Iquitos, Marañón, Nacional, Nanay y Purús (Motamayor et al., 2008).

Sus almendras son utilizadas para la elaboración del chocolate y su alto valor comercial lo ubica dentro de los cultivos perennes más importantes del mundo (Almeida & Valle, 2008). Es un cultivo de gran importancia que tiene un papel importante en la reducción de la pobreza de las regiones deprimidas de los trópicos húmedos. Aunque el cacao no se considera un cultivo de seguridad alimentaria, su producción está en gran parte en manos de pequeños productores en países en desarrollo como África, América Latina, Asia y Oceanía. Los agricultores que poseen entre 1 y 10 hectáreas cultivan más del 90% del cacao total producido en el mundo (Poelmans & Swinnen, 2019). Se estima que, entre 5 y 6 millones de agricultores de África, Asia, América Latina y Oceanía producen cacao, concentrados en países que comprenden el cinturón entre los

10 ° N y 10 ° S desde el Ecuador (ICCO, 2013). Actualmente, los diez principales productores de cacao del mundo son Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún en África Occidental; produciendo el 64 % del cacao del mundo, Indonesia en el sudeste asiático; y Ecuador, Brasil, Perú, Colombia y República Dominicana en América Latina , representando el 15 % de la producción mundial (Tabla1) (FAOStat, 2021).

Tabla 1.Principales países productores de grano de cacao en el mundo.

Country	Production (Ton)	% of global producction	Harvested area (ha)	% of global area
Côte d'Ivoire	2,180,000	38.95	4,776,874	39.0
Ghana	811,700	14.50	1,478,462	12.1
Indonesia	783,978	14.01	1,600,648	13.1
Nigeria	350,146	6.26	1,354,141	11.1
Ecuador	283,680	5.07	525,435	4.3
Cameroon	280,000	5.00	672,745	5.5
Brazil	259,425	4.64	581,884	4.8
Peru	135,928	2.43	130,378	1.1
Colombia	102,154	1.83	117,818	1.0
Dominican Republic	88,961	1.59	150,943	1.2

Fuente: FAOSTAT, 2021

El cultivo de cacao se puede desarrollar en zonas con temperaturas medias altas, entre los 23 - 28 ºC, precipitaciones distribuidas a lo largo del año de 1500 – 2500 mm y una humedad relativa entre 70 - 80%. El árbol de cacao en formación requiere de una luminosidad baja, 30% de luz y 70% de sombra, revirtiéndose esta relación luz/sombra al inicio de la etapa reproductiva y manteniéndose durante su ciclo productivo. Por esta razón generalmente está asociado a sistemas agroforestales (SAF) 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 (Palencia, 2005). En Colombia 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 (MADR, 2005). 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 per húmedos, 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.

Metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que reciben esta designación debido a diversos criterios. De los 118 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales; de estos últimos solamente 40 elementos son metales pesados. Uno de los criterios de clasificación es la densidad, aquellos metales de densidad mayor o igual a 4 g/cm^3 son considerados pesados. Otros criterios empleados son el número y el peso atómicos siendo los parámetros entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg). Las concentraciones en las cuales los metales pueden ser considerados tóxicos cambian de una especie a otra, para una especie, un elemento es esencial en niveles bajos, pero puede ser tóxico para otras. Así, la acción tóxica de los contaminantes está determinada tanto por su accesibilidad al organismo como por la serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas que provocan y que en última instancia se manifiestan como signos y síntomas de intoxicación. (Brady & Weil, 2002).

Los metales pesados han sido ampliamente utilizados en muchas actividades, tales como la minería, la fundición, la galvanoplastia y el refinado del oro. Por lo tanto, se han documentado serios problemas asociados a la contaminación de los suelos en estas actividades. La acumulación de metales pesados en las plantas inhibe o activa algunos procesos enzimáticos que afectan su productividad tanto cualitativa como cuantitativamente (Miteva et al., 2005). El plomo (Pb), el arsénico (As), el cadmio (Cd) y el zinc (Zn) y otros metales pesados pueden ser absorbidos por las plantas (Rodríguez-Ortíz et al., 2006) hasta concentrarse en sus tejidos a niveles tóxicos. Tal situación puede ser una posible vía de entrada de estos metales en la cadena alimentaria humana a través del consumo de plantas, directa o indirectamente.

El cadmio en la interfaz suelo-planta

El Cd es un metal pesado, blando, blanco azulado, relativamente poco abundante, con una densidad de 8.65 g/ml y de peso atómico 112.40 g/mol. Es altamente tóxico y produce efectos tóxicos en la salud humana, en plantas y en suelos (Benavides et al., 2005; Antoine et al., 2017). Su capacidad de transferencia depende del tipo de suelo, planta, pH del suelo, contenido de humus, disponibilidad de la materia orgánica, mineralogía, y la presencia de otros elementos como el zinc (Arunakumara et al., 2013). La concentración de cadmio en el suelo se produce de forma natural o por medio de actividades antropogénicas. La producción natural proviene de la corteza terrestre y del agua del océano (EFSA, 2012), puede originarse en los procesos geoquímicos relacionados con las erupciones volcánicas o la meteorización de la roca madre. En la corteza terrestre la concentración promedio de cadmio es de 0.2 mg/kg (Chavez et al., 2015). En el suelo, las concentraciones de origen geogénico, de acuerdo a Alloway, 2013, generalmente no superan 1 mg/Kg Cd, sin embargo, se han reportado valores de 16.3 mg/Kg Cd asociados a procesos de meteorización y el tipo de material parental. Las actividades antropogénicas se relacionan especialmente con la minería, refinación de minerales metálicos,

desechos industriales de procesos tales como la galvanoplastia, la fabricación de plásticos, pigmentos para pinturas, preparación de la aleación, pilas que contienen cadmio, fertilizantes de fosfato, lodos de depuradora y compost municipal. Otras fuentes de contaminación incluyen algunos productos químicos fitosanitarios (Kirkham, 2006; Cortés-Martínez et al., 2009; Ramírez-Ortiz & Monreal, 2009).

En forma natural, el cadmio se asocia con minerales de fósforo y zinc, a manera de impureza, por esta razón se encuentra en fertilizantes y puede llegar a convertirse en metal bioacumulable a partir de suelos que reciben aplicaciones continuas de fertilizantes fosfatados o abonos orgánicos procedentes de residuos municipales (Bonomelli et al., 2003; Wang et al., 2012). Con relación a los fertilizantes fosfatados, la materia prima principal de éstos es la roca fosfórica, constituida principalmente por apatita, que, además de fósforo, contiene cadmio en cantidades que varían entre 8 y 500 $mg.kg^{-1}$ (Bonomelli et al., 2003). La aplicación reiterada de fertilizantes fosfatados incrementa las cantidades de Cd en el suelo (Bonomelli et al., 2003)

El comportamiento del Cd incorporado está en función del tipo de reacción química y en los diversos procesos físicos y biológicos que ocurren en el suelo. La interacción del metal con los componentes del suelo afecta las principales reacciones asociadas con la adsorción, precipitación y formación de complejos (Bonomelli et al., 2003) y su biodisponibilidad y toxicidad. La fase mineral del suelo, el pH y la composición de la materia orgánica tienen efectos significativos en la adsorción de Cd (Cui et al., 2016). La movilidad y biodisponibilidad es mayor en suelos no calcáreos que en calcáreos. De manera general la toxicidad en el suelo aumenta al aumentar la movilidad de cadmio, es decir, aumenta al disminuir el pH o cuando disminuye la materia orgánica (Argüello et al., 2019). A pH >7.0 se presentan procesos de inmovilización (precipitación), especialmente en suelos calcáreos debido a la formación de carbonatos de cadmio ($CdCO_3$) (Alloway, 2013). Los diferentes grados de descomposición de la materia

orgánica (MO), también afectan las formas de cadmio en el suelo. Esta descomposición acidifica el suelo debido a la formación de ácidos orgánicos, que contribuyen a la formación de complejos metal-ligando con el Cd, incrementando la biodisponibilidad del elemento (Argüello et al., 2019).

Su efecto en cultivos no es menos importante ya que debido a su similitud química con cationes esenciales, tales como $Fe^{2+,}$ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y 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 Ca2+ o Na+ / 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 arroz, el Cd usa los canales transportadores específicos de Fe^{2+} (Uraguchi et al., 2009), Ca^{2+} y de Zn^{2+} (Ramesh et al., 2003; Uraguchi et al., 2009), debido a la similitud en propiedades físicas. Este elemento es tóxico para las células de la planta, por lo que la productividad de cultivos se reduce debido a la acumulación de cadmio en suelos agrícolas (Verbruggen et al., 2009; Argüello et al., 2019).Las plantas cultivadas representan una importante vía para el movimiento de metales pesados potencialmente tóxicos desde el suelo hacia los humanos, acumulándolos en diferentes cantidades y en sus diferentes órganos vegetales y

reproductivos, resultando en contribuciones venenosas en las dietas alimenticias(Mite et al., 2010).

El cadmio en los alimentos y en la salud humana

La exposición al cadmio en la población no fumadora se relaciona principalmente con la ingesta de alimentos. Los grupos de alimentos asociados son el arroz, el trigo, almidón de raíces vegetales, tubérculos, verduras de hoja, otras verduras y mariscos, alimentos para bebés y productos derivados del cacao (EFSA, 2012). Los productos de cacao tienen concentraciones relativamente altas de Cd en comparación con otros productos alimenticios. Esto se ha convertido en un asunto de interés para los pequeños agricultores, para la industria del chocolate, y para la Unión Europea (UE), lo que ha llevado a discutir la implementación de límites de los contenidos de Cd en los productos de cacao importados a la UE (Contam EFSA, 2014).

La exposición ambiental al cadmio, que llega a los alimentos, sólo se convirtió en un problema después de analizar que el síndrome de Itai-Itai en Japón, enfermedad ósea, era causada por el consumo de arroz contaminado con Cd, como resultado de la descarga incontrolada en la cuenca del río Jenzu (Clemens et al., 2013). La absorción del cadmio en humanos es relativamente baja (3-5 %), pero es retenido en el riñón, el hígado; para el riñón, la toxicidad radica en la acumulación, especialmente en las células tubulares proximales con posibles consecuencias de disfunción renal, y posterior desmineralización ósea. Después de la exposición prolongada, del daño tubular puede progresar a una disminución de la filtración glomerular, y, finalmente, a la insuficiencia renal. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha clasificado el cadmio como un cancerígeno humano (Grupo 1) sobre la base de estudios ocupacionales. Los nuevos datos sobre la exposición humana al cadmio en la población general han sido estadísticamente asociados con un mayor riesgo de cáncer, como en el pulmón,

endometrio, vejiga y mama (EFSA, 2012). 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. (Hernández-Martínez & Navarro, 2012 ; Järup & Åkesson, 2009).

En el año 2009, el Panel de contaminantes de European Food Safety Authority (EFSA) estableció una ingesta semanal de 2,5 mg/kg de peso corporal para el cadmio. Luego de hacer una revisión la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Contam EFSA, 2014). Aunque el panel concluyó que es poco probable que para un individuo se produzcan efectos adversos sobre la función renal con este nivel, la exposición al cadmio en la población debería ser reducida. Específicamente para el cacao y sus derivados, la Comisión Europea se apoyó en que el chocolate y el cacao en polvo que se venden al consumidor final puede contener altos niveles de cadmio, son una fuente importante de exposición humana y, frecuentemente, son consumidos por los niños; por esta razón, se establecieron los niveles máximos de cadmio, para los distintos tipos de chocolates y de cacao en polvo de venta al consumidor final (Contam EFSA, 2014).

Tecnologías de fitorremediación

En la fitorremediación se aprovecha el metabolismo de plantas y microorganismos asociados para sustraer del medio ambiente sustancias contaminantes. Esta sustracción de contaminantes en el suelo es posible debido a que algunas plantas presentan adaptaciones que les permiten tolerar niveles relativamente altos de algunos contaminantes. Según Thangavel & Subbhuraam, 2004, dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de

limpieza requerido; las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medida de contención (rizofiltración, fitoestabilización) o eliminación (fitodegradación, fitoextracción).

La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera. Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas o al aire (Barton et al. 2005; Mendez & Maier, 2008). La fitoestabilización es efectiva en suelos de textura fina con alto contenido de materia orgánica (Padmavathiamma & Li, 2007). Se aplica principalmente en terrenos extensos en donde existe contaminación superficial. Esta tecnología tiene como ventajas, sobre otros métodos de remedión de suelos, que es de menor costo, fácil de aplicar y estéticamente agradable.

La rizofiltración utiliza las plantas para eliminar del medio hídrico contaminantes a través de la raíz (Dushenkov et al., 1995). En la rizofiltración estas plantas se cultivan de manera hidropónica. Cuando el sistema radicular está bien desarrollado, las plantas se introducen en el agua contaminada con metales, en donde las raíces los absorben y acumulan. A medida que las raíces se van saturando, las plantas se cosechan y se disponen para su uso final

En la fitodegradación las plantas y los microorganismos asociados a ellas degradan los contaminantes orgánicos en productos inofensivos, o bien, mineralizarlos hasta CO_2 y H_2O. En este proceso los contaminantes son metabolizados dentro de los tejidos vegetales y las plantas producen enzimas como la dehalogenasa y la oxigenasa, que ayudan a catalizar la degradación (Singh et al., 2003). La fitodegradación se ha empleado para la remoción de explosivos como el TNT, hidrocarburos halogenados, Bisfenol A y pesticidas organoclorados y organofosforados (Hannink et al., 2001; Denys et al., 2014; Zhang et al., 2007)

La fitoextracción o fitoacumulación es la técnica más prometedora y ha recibido una creciente atención. Las plantas consideradas como acumuladoras de metales pesados son utilizadas para transportar y concentrar los contaminantes en el interior de los tallos, hojas, y raíces. Las plantas pueden acumular metales pesados esenciales para su crecimiento y desarrollo, tales como el Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo y posiblemente el Ni; asimismo algunas plantas tienen la capacidad de acumular otros metales pesados que no se conoce su función biológica, como el Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se y Hg (Alkorta & Garbisu, 2001).

Las especies vegetales ideales, para la fitoextracción deberían crecer en suelos resistentes a los metales, presentar un sistema radical pronunciado, presentar altos niveles de producción de biomasa a partir de un óptimo crecimiento y desarrollo, acumular y resistir altas concentraciones de metales en brotes, retoños, cortes y tener la posibilidad de acumular varios metales de manera simultánea y mostrar resistencia a plagas y enfermedades (Alkorta & Garbisu, 2001). El primer paso para la aplicación de esta técnica es la selección de las especies de planta más adecuada para los metales presentes y las características del emplazamiento. Una vez completado el desarrollo vegetativo de la planta el siguiente paso es cortarlas y proceder a su incineración y traslado de las cenizas a un vertedero de seguridad. La fitoacumulación se puede repetir ilimitadamente hasta que la concentración remanente de metales en el suelo esté dentro de los límites considerados como aceptables (Kumar et al., 1995). Algunas plantas empleadas para esta técnica fitocorrectiva son: *Thlaspi caerulescens* (Cd); *Sedum alfredii*, *Viola baoshanensis* y *Vertiveria zizanioides* (Zn, Cd, Pb); *Alyssum murale, Trifolium nigriscens*, *Psychotria douarrei, Geissois pruinosa, Homalium guillainii, Hybanthus floribundus, Sebertia acuminata, Stackhousia tryonii, Pimelea leptospermoides, Aeollanthus biformifolius y Haumaniastrum robertii* (Ni); *Brassica juncea, Helianthus annuus, Sesbania drummondii* (Pb);

Brassica napus (Cu, Pb, Zn); y *Pistia stratiotes* (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Delgadillo et al., 2011).

Especies forestales usadas en la fitorremediación

Todas las plantas extraen metales del suelo; sin embargo, algunas plantas tienen una capacidad superior para extraer, acumular y tolerar altos niveles de metales pesados que son tóxicos para los organismos. El éxito de la extracción física requiere plantas con alta capacidad de absorción de metales y alta producción de biomasa (Lasat, 2001). Por lo tanto, los investigadores de todo el mundo están buscando ansiosamente nuevas especies de plantas para la eliminación de metales pesados.

El uso de árboles para la fitorremediación ha atraído interés recientemente. Los candidatos potenciales deben ser productores de alta biomasa, tener sistemas de raíces profundas, excelente transpiración y una capacidad aceptable para eliminar metales pesados de suelos contaminados (Pulford & Watson, 2003). Aunque se han identificado más de 450 especies de plantas como hiperacumuladores de metales pesados, solo unas pocas pueden hiperacumular el Cd (Li et al., 2010). Entre estos, el sauce (Salix sp) ha sido ampliamente estudiado para la fitorremediación de suelos contaminados con Cd (Fischerová et al., 2006a; Greger & Landberg, 1999; Wieshammer et al., 2007). En comparación con otras especies de plantas, los clones de sauce tienen una mayor absorción y selectividad por el Cd que otros metales como el Pb (Pulford & Watson, 2003). Además, los álamos cultivados en regiones templadas se reportan como acumuladores eficientes de BCFA; (De Oliveira & Tibbett, 2018). La caoba (*Swietenia macrophylla*) recientemente ha sido estudiada por Fan et al (2011), demostrando potencial como especie fitoremediadora revelando alta producción de biomasa y una alta capacidad de absorción de Cd en los brotes .

Mecanismo de absorción del cadmio

El cadmio es un elemento no esencial para las plantas y su absorción se debe al transporte mediante procesos específicos y no específicos utilizados para iones como el Fe^{2+}, Ca^{2+},Zn^{2+},Cu^{2+} y Mg^{2+} (Shahid et al., 2016). Después de la absorción por el sistema radicular, Cd^{2+} es transportado al xilema para llegar a las hojas. En las hojas Cd^{2+} es transportado activamente al floema desde donde llega a los frutos, aunque puede llegar también directamente desde el xilema (Shahid et al., 2016; Clemens et al., 2013). La absorción de cadmio por las hojas ha recibido mucha menos atención que a través de las raíces. Mientras que (Shahid et al., 2016) sugieren que para algunas especies la absorción foliar de cadmio podría ser importante, en el cacao esto parece ser insignificante(Barraza et al., 2017). Se ha identificado que varias familias importantes de genes transportadores de membrana (incluyendo NRAMP, ZIP, HMA) probablemente desempeñan un papel en la absorción de cadmio por las raíces, la carga en el xilema y el transporte dentro de la planta (Clemens et al., 2013). En muchas especies estudiadas, el transportador ZIP que apoya que el Zn^{2+} cruza la membrana de la célula epidérmica de la raíz es responsable de la absorción de cadmio. Además, las células de la raíz tienen transportadores HMA3 que bombean Cd^{2+} a las vacuolas de las células de la raíz, lo que limita el transporte de cadmio al xilema. Se han observado plantas con un HMA3 mutante en el arroz, la soja, y el trigo que son mucho menos eficientes en el bombeo de Cd^{2+} a las vacuolas (Wang et al., 2012). La sobreexpresión del mismo transportador HMA3 redujo el transporte de Cd^{2+} a brotes de arroz y grano (Ueno et al., 2010)

Estas familias de genes están altamente conservadas a través de las familias de plantas y parecen tener homólogos identificables en el genoma del cacao. Ullah et al., 2019, identificaron y secuenciaron cinco genes de la familia NRAMP en cacao y encontraron que NRAMP5 codifica una proteína capaz de transportar iones de Cd^{2+} en levadura. Sin embargo, mientras que las

proteínas NRAMP han demostrado ser importantes en la absorción de cadmio en el arroz (Ishikawa et al., 2012; Sasaki et al., 2012), hasta la fecha esta proteína no se ha implicado para ningún otro cultivo. Una mayor comprensión del papel de estos genes de transporte en la absorción y partición de cadmio ayudará a la identificación de genotipos de cacao de baja acumulación para ensayos de campo.

Partición de cadmio dentro de la planta

En general, la concentración de cadmio en tejido de la planta disminuye a partir de las raíces > tallos > hojas > cáscaras de las mazorcas > semillas (Benavides et al., 2005). Esto parece cumplirse para el cacao donde se ha reportado una disminución en la concentración de cadmio desde la hoja a la cáscara de la mazorca hasta el grano descascarado. El transporte de cadmio a través del xilema puede explicar por qué otras partes de la planta contienen menos cadmio que las hojas, ya que se necesita transporte activo hacia el floema (Sekara et al., 2005). En contraste, Chavez et al., (2015) informaron niveles de cadmio en hojas que estaban por debajo del límite de detección, mientras que la concentración en granos excedió 1 mg/kg.

El tratamiento postcosecha (fermentación y secado) también puede desempeñar un papel en la partición de cadmio en el grano. Recientemente, Thyssen et al., (2018) mapearon la distribución de varios contaminantes, incluido el cadmio, en la sección transversal de un grano de cacao fermentado usando un nuevo método. Su análisis sugiere que el cadmio está ubicado en el lado interno de la cáscara de la semilla, así como en la parte meristemática y tiene una distribución similar a zinc y, en cierta medida, a Mg, K y P. No se sabe si el mismo patrón está presente en los granos antes de la fermentación.

Diferencias genotípicas en la absorción y partición de cadmio

El uso de genotipos de baja acumulación de origen natural, solos, como patrón, injerto, o en combinación, se considera parte integral para reducir la acumulación de cadmio en tejidos de plantas comestibles de muchos cultivos (Nawaz et al., 2016; Savvas et al., 2010). La variabilidad genotípica en la acumulación de cadmio entre las variedades de cacao se ha informado en varios estudios (Arévalo-Gardini et al., 2017; Gramlich et al., 2017; Barraza et al., 2017; Argüello et al., 2019; Lewis et al., 2018), éste último realizado en el Banco Internacional de Germoplasma de Cacao en Trinidad y Tobago observó diferencias en la concentración de cadmio en los granos de cacao entre 100 de sus accesiones que crecen en condiciones de suelo muy similares. En el norte de Honduras, un estudio que comparó 11 cultivares de cacao injertados encontró variaciones significativas en el contenido de cadmio de granos entre los cultivares y ninguna relación entre el contenido de cadmio de granos y del suelo (Engbersen et al., 2019).

Tolerancia de plantas al cadmio

Los hiperacumuladores son especies o genotipos que pueden acumular metales pesados en sus órganos supra superficiales en concentraciones de 100 a 1000 veces más altas que las encontradas en especies no hiperacumuladoras, sin sufrir ningún efecto fitotóxico discernible, también sugieren que un hiperacumulador de cadmio debería ser capaz de tolerar niveles de 100 mg/kg en hojas sin efectos secundarios (Baker et al., 2020).. Los experimentos de laboratorio con plántulas de cacao que usaron suelos enriquecidos en 50 y 100 mg/kg de cadmio encontraron cambios ultraestructurales y daños a la maquinaria fotosintética y al metabolismo antioxidante (Castro et al., 2015; Pereira et al., 2017), lo que sugiere que el cacao no puede ser considerado como un hiperacumulador. Sin embargo, Pereira et al., (2017) interpretaron el hecho

de que las plantas translocaron cadmio a tejidos como un signo de tolerancia al cadmio, ya que las plantas intolerantes tienden a tener una mayor acumulación en las raíces (Verbruggen et al., 2009). Estos estudios también informaron evidencia de diferencias genotípicas en la tolerancia al cadmio (Castro et al., 2015).

REFERENCIAS

Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., & Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, *11*(2), 92–102. https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700

Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Martínez-Pérez, A., Thompson, A. J., Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2015). *Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security*. https://doi.org/10.1093/jxb/erv027

Alkorta, I., & Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of Organic Contaminants in Soils. *Bioresource Technology*, *79*, 273–276. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00016-5

Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability,Environmental Pollution 22. In *Archives of Dermatology* (Vol. 114, Issue 11). https://doi.org/10.1001/archderm.1978.01640230053014

Almeida, A.-A., & Valle, R. R. (2008). Ecophysiology of the cacao tree . Braz J Plant Physiol Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*(December), 425–448.

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

Antoine, J. M. R., Fung, L. A. H., & Grant, C. N. (2017). Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica. *Toxicology Reports*, *4*(March), 181–187. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.03.006

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, *605–606*(2017), 792–800. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122

Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, *649*, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292

Arunakumara, K., Walpola, B. C., & Yoon, M.-H. (2013). Agricultural Methods for Toxicity Alleviation in Metal Contaminated Soils: A Review. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, *46*(2), 73–80. https://doi.org/10.7745/kjssf.2013.46.2.073

Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., & Smith, J. A. C. (2020). Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, *January*, 85–107. https://doi.org/10.1201/9780367803148-5

Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, *229*, 950–963. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080

Barton, C. D., Marx, D. H., Adriano, D. C., Koo, B. J., Newman, L., Czapka, S. J., & Blake, J. (2005). Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences*, *12*(4), 251–265. https://doi.org/10.1306/eg.06210404021

Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 21–34. https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003

Bonomelli, C., Bonilla, C., & Valenzuela, A. (2003). Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *38*(10), 1179–1186. https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001000007

Brady, N. C., & Weil, R. R. (2002). The Nature and Properties of Soils, 13th Edition.By N. C. Brady and R. R. Weil. In *Agroforestry Systems* (Vol. 54, Issue 3). Pearson. https://doi.org/10.1023/A:1016012810895

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*, *11*(4), 761. https://doi.org/10.3390/agronomy11040761

Broadley, M. R., Willey, N. J., Wilkins, J. C., Baker, A. J. M., Mead, A., & White, P. J. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytologist*,

152(1), 9–27. https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00238.x

Castro, A. V., de Almeida, A. A. F., Pirovani, C. P., Reis, G. S. M., Almeida, N. M., & Mangabeira, P. A. O. (2015). Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of Theobroma cacao L. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 115, pp. 174–186). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003

Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, *533*, 205–214. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, *88*(11), 1707–1719. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003

Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., & Verbruggen, N. (2013). Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, *18*(2), 92–99. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.003

Contam EFSA. (2014). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, *9*(2), 10–14. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975

Cortés-Martínez, R., Solache-Ríos, M., Martínez-Miranda, V., & Alfaro-Cuevas, R. (2009). Removal of cadmium by natural and surfactant-modified mexican zeolitic rocks in fixed bed columns. *Water, Air, and Soil Pollution*, *196*(1–4), 199–210. https://doi.org/10.1007/s11270-008-9769-x

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus Theobroma. *National Herbarium*, *35*(6), 379–607. https://repository.si.edu/handle/10088/27110?show=full

Cui, L., Pan, G., Li, L., Bian, R., Liu, X., Yan, J., Quan, G., Ding, C., Chen, T., Liu, Y., Liu, Y., Yin, C., Wei, C., Yang, Y., & Hussain, Q. (2016). Continuous immobilization of cadmium and lead in biochar amended contaminated paddy soil: A five-year field experiment. *Ecological Engineering*, *93*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.007

De Oliveira, V. H., & Tibbett, M. (2018). Tolerance, toxicity and transport of Cd and Zn in Populus trichocarpa. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 155, pp. 281–292). https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.011

Delgadillo, A., Gonzalez, C., Prieto, F., Villagómez, J., & Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *14*(2), 597–612.

Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., Denys, S., & Halatte, V. (2014). *Assessing metals bioaccessibility to man in human health risk assessment of contaminated site To cite this version : HAL Id : ineris-00973245 Assessing metals bioaccessibility to Man in human health risk assessment of contaminated sites*.

Dushenkov, V., Kumar, P., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environmental Science & Technology*, *29*, 1239–1245. https://doi.org/10.1021/es00005a015

EFSA. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, *10*(1), 1–

37. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551

Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*, *678*, 660–670. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001

Fan, K. C., Hsi, H. C., Chen, C. W., Lee, H. L., & Hseu, Z. Y. (2011). Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (Swietenia macrophylla) seedlings for phytoextraction applications. *Journal of Environmental Management*, *92*(10), 2818–2822. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.032

FAOStat. (2021). *FAOSTAT*. Food and Agriculture Organization. http://www.fao.org/faostat/en/#data%0D

Fischerová, Z., Tlustoš, P., Jiřina Száková, & Kornelie Šichorová. (2006). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. In *Environmental Pollution* (Vol. 144, Issue 1, pp. 93–100). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.005

Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, *580*, 677–686. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014

Grant, C. A., Clarke, J. M., Duguid, S., & Chaney, R. L. (2007). *Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation*. *0*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.038

Greger, M., & Landberg, T. (1999). Use of willow in phytoexfraction. *International Journal of Phytoremediation*, *1*(2), 115–123. https://doi.org/10.1080/15226519908500010

Hannink, N., Rosser, S. J., French, C. E., Basran, A., Murray, J. A. H., Nicklin, S., & Bruce, N. C. (2001). *Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase*. *19*(December).

Hernández-Martínez, R., & Navarro, I. (2012). Estimation of dietary intake and content of lead and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, *26*, 6–14. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.024

ICCO. (2013). *Growing Cocoa, International Cocoa Organization -ICCO.* Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World; International Cocoa Organization. https://www.icco.org/growing-cocoa/

ILAC. (2018, July). Iniciativa Latinoamericana del Cacao.Observatorio del cacao fino y de aroma para america latina. *Boletin N°3*.

Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N. K., & Nakanishi, H. (2012). Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(47), 19166–19171. https://doi.org/10.1073/pnas.1211132109

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

Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, *137*(1–2), 19–32. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024

Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology*, *29*, 1232–1238. https://doi.org/10.1021/es00005a014

Lasat, M. (2001). Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, *31*, 109–120. https://doi.org/10.2134/jeq2002.1090

Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in Theobroma cacao L. *Science of the Total Environment*, *640–641*, 696–703. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365

Li, Q. S., Cai, S. S., Mo, C. H., Chu, B., Peng, L. H., & Yang, F. B. (2010). Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *73*(1), 84–88. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.002

MADR. (2005). La cadena del cacao en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005 Documento de Trabajo No. 58. *Min. Agricultura y Desarrollo Rural, Obs. Agrocadenas Colombia*, *1*(61), 51. http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/5890/1/2005112145659_caracterizacion_cacao.pdf

Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytoestabilization of mine Tailings in Arid and Semiarid Environments-An Emergin Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, *116*.

Miranda, F. (1962). Wild Cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, Mexico. *CATIE: Costa Rica.*, 7.

Mite, F. (2015). *Metales Pesados en Cacao , Perspectivas y Posible Manejo*. http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/049b3f076c63e02705257e0e005767b1

Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de ecuador. *Xii Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 17–19.

Miteva, E., Hristova, D., Nenova, V., & Maneva, S. (2005). Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: Changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Scientia Horticulturae*, *105*(3), 343–358. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.026

Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (Theobroma cacao L). *PLoS ONE*, *3*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311

Nawaz, M. A., Imtiaz, M., Kong, Q., Cheng, F., Ahmed, W., Huang, Y., & Bie, Z. (2016). Grafting: A technique to modify ion accumulation in horticultural crops. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue OCTOBER2016). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01457

Pabón, M. G., Sepúlveda, W., & Herrera Roa, L. (2014). *Caracterización de la producción de cacao en Santander y análisis de la presencia de cadmio en suelos y cultivos*. http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/2441

Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, *184*(1–4), 105–126. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5

Palencia, G. E. (2005). Establecimiento y manejo de sistemas agroforestales con cacao [Manual técnico]. In *Manual técnico.Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria. Corpoica.*

Pereira, M. P., Corrêa, F. F., & Castro, E. M. De. (2017). *Leaf ontogeny of Schinus molle L . plants under cadmium contamination : the meristematic origin of leaf structural changes*. https://doi.org/10.1007/s00709-017-1103-2

Poelmans, E., & Swinnen, J. (2019). A Brief Economic History of Chocolate. *LICOS - Centre for Institutions and Economic Performance, KU Leuven*. https://ideas.repec.org/p/lic/licosd/41219.html

Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - A review. *Environment International*, *29*(4), 529–540. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6

Ramesh, S. A., Shin, R., Eide, D. J., & Schachtman, D. P. (2003). Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiology*, *133*(1), 126–134. https://doi.org/10.1104/pp.103.026815

Ramírez-Ortiz, J., & Monreal, J. (2009). Study of Soil Contaminated with Arsenic, Cadmium and Lead in Ancient Tailings in Zacatecas, México. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, *2*(3), 120–124. http://www.waset.ac.nz/journals/ijcbe/v2/v2-3-23.pdf

Rodríguez-Ortíz, J. C., Valdez-Cepeda, R. D., Lara-Mireles, J. L., Rodríguez-Fuentes, H., Vázquez-Alvarado, R. E., Magallanes-Quintanar, R., & García-Hernández, J. L. (2006). Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of cadmium and lead by tobacco (Nicotiana tabacum L.). *Bioremediation Journal*, *10*(3), 105–114. https://doi.org/10.1080/10889860600939815

Sasaki, A., Yamaji, N., & Yokosho, K. (2012). *Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice*. *24*(May), 2155–2167. https://doi.org/10.1105/tpc.112.096925

Savvas, D., Colla, G., Rouphael, Y., & Schwarz, D. (2010). Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia Horticulturae*, *127*(2), 156–161. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.011

Savvas, D., Savva, A., Ntatsi, G., Ropokis, A., Karapanos, I., Krumbein, A., & Olympios, C. (2011). Effects of three commercial rootstocks on mineral nutrition, fruit yield, and quality of salinized tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *174*(1), 154–162. https://doi.org/10.1002/jpln.201000099

Sekara, A., Poniedziałek, M., Ciura, J., & Jedrszczyk, E. (2005). Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: Implications for phytoremediation. In *Polish Journal of Environmental Studies* (Vol. 14, Issue 4, pp. 509–516).

Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Paula, M. C. A. (2016). Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. *Springer International Publishing, Cham*, *241 Review*(December), 73–137. https://doi.org/10.1007/398

Singh, O. V., Labana, S., Jain, G. P., & K., R. B. · R. (2003). *Phytoremediation : an overview of*

metallic ion decontamination from soil. 405–412. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1244-4

Thangavel, P., & Subbhuraam, C. V. (2004). Phytoextraction: Role of Hyperaccumulators in Metal Contaminated Soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B*, *70*, 109–130.

Thyssen, G. M., Keil, C., Wolff, M., Sperling, M., Kadow, D., Haase, H., & Karst, U. (2018). Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *33*(2), 187–194. https://doi.org/10.1039/c7ja00354d

Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C. F., Ando, T., Yano, M., & Ma, J. F. (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(38), 16500–16505. https://doi.org/10.1073/pnas.1005396107

Ullah, I., Wang, Y., Eide, D. J., & Dunwell, J. M. (2019). *Evolution , and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from Theobroma cacao and their role in cadmium accumulation*. *August 2018*, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y

UNEP. (2010). Final review of scientific information on cadmium. *UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland*, *December*, pp.324.

Uraguchi, S., Mori, S., Kuramata, M., Kawasaki, A., Arao, T., & Ishikawa, S. (2009). Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, *60*(9), 2677–2688. https://doi.org/10.1093/jxb/erp119

Van Hall, C. J. J. (1914). *Cocoa* (London : Macmillan (ed.)).

Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation in plants. *Phytoremediation of Environmental Pollutants*, 99–116. https://doi.org/10.4324/9781315161549

Wang, C., Ji, J., Yang, Z., Chen, L., Browne, P., & Yu, R. (2012). Effects of soil properties on the transfer of cadmium from soil to wheat in the Yangtze River Delta Region, China - A typical industry-agriculture transition area. *Biological Trace Element Research*, *148*(2), 264–274. https://doi.org/10.1007/s12011-012-9367-z

Wieshammer, G., Unterbrunner, R., García, T. B., Zivkovic, M. F., Puschenreiter, M., & Wenzel, W. W. (2007). Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by Salix ssp. and intercropping of Salix caprea and Arabidopsis halleri. *Plant and Soil*, *298*(1–2), 255–264. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9363-9

Wood, G. A. R., & Lass, R. A. (1985). *Cocoa*. Wiley. https://books.google.com.co/books?id=urs9QCMKOw4C

Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Solorzano, R. L., Bouchez, O., Vignes, H., Severts, P., Hurtado, J., Yepez, A., Grivetti, L., Blake, M., & Valdez, F. (2018). The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(12), 1879–1888. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x

Zhang, X., Peng, L. I. U., Yue-suo, Y., & Wen-ren, C. (2007). *Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes*. *19*, 902–909.

Zhou, J., Wan, H., Qin, S., He, J., Lyu, D., & Li, H. (2016). Net cadmium flux and gene expression in relation to differences in cadmium accumulation and translocation in four apple rootstocks. *Environmental and Experimental Botany*, *130*, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.012

Capítulo 1 Dinámica en la acumulación de cadmio en nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao L.*)

Dinámica en la acumulación de cadmio en nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao L.*)

Donald A. Galvis [1 2 3], Yeirme Y. Jaimes [1], Fabricio E. Carvalho [1], Rosalba Ruiz [2], Jairo Rojas [1]

RESUMEN

El cadmio (Cd), un metal traza no esencial que se transloca y acumula fácilmente en los tejidos de la planta de cacao. Esto representa un riesgo para la exportación de cacao y en consecuencia, afecta el bienestar económico de los productores en América Latina. Se evaluaron nueve genotipos de cacao usualmente utilizados como portainjertos para determinar su respuesta a la exposición por Cd en términos de crecimiento y bioacumulación de Cd. Las plántulas de cacao se cultivaron bajo invernadero, en materas durante 180 días en suelo contaminado con 6 ppm y 12 ppm de Cd La concentración de Cd se determinó a los 30, 60 y 90 días de exposición sobre hojas, tallos y raíces junto con los parámetros de crecimiento. Los resultados revelaron que existe un amplio rango de concentraciones de Cd entre los genotipos, encontrando que existen tres mecanismos de respuesta a la exposición de Cd diferentes. Los parámetros de crecimiento mostraron un comportamiento de alta tolerancia de manera general en todos los genotipos, sin embargo, los efectos del Cd fueron diversos en todos los genotipos, siendo algunos de ellos más tolerantes al estrés por Cd que otros cuando son sometidos a la concentración de 12 ppm. Esto

[1] Centro de Investigación La Suiza, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Rionegro, Santander (Colombia).

[2] Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Básicas. Montería, Córdoba (Colombia)

[3] Autor para correspondencia: dgalvis@agrosavia.co

evidencia que las diferentes respuestas de crecimiento al estrés por Cd están relacionadas con un efecto del genotipo. Se propone como potencial alternativo para mitigar el impacto del Cd en el cultivo del cacao, el uso de genotipos que permitan reducir la absorción, el transporte y la acumulación del metal traza hacia los tejidos aéreos. Por tanto, en este estudio se destacan los genotipos IMC-67, PA-46 y PA-121 que podrían ser utilizados como portainjertos de cultivares de importancia económica, revelando alta tolerancia al metal y baja acumulación de Cd en los tejidos aéreos.

Palabras clave: Portainjertos, mecanismos de enfrentamiento, metales pesados, cadmio, fitorremediación, *Theobroma cacao.*

ABSTRACT

Cadmium (Cd), a nonessential trace metal that readily translocates and accumulates in cocoa plant tissues. This represents a risk for cocoa exports and consequently affects the economic well-being of producers in Latin America. Nine cocoa genotypes usually used as rootstocks were evaluated to determine their response to Cd exposure in terms of growth and Cd bioaccumulation. The cocoa seedlings were grown under greenhouse, in pots for 180 days in soil contaminated with 6 ppm and 12 ppm of Cd The concentration of Cd was determined at 30, 60 and 90 days of exposure on leaves, stems and roots together with the growth parameters. The results revealed that there is a wide range of Cd concentrations between genotypes, finding that there are three different response mechanisms to Cd exposure. The growth parameters manifest a high tolerance behavior in general in all genotypes, however, the effects of Cd were diverse in all genotypes, some of them being more tolerant to Cd stress than others when subjected to concentration. of 12 ppm. Therefore, the different growth responses to Cd stress are related to a genotype effect. It is proposed as an alternative potential to mitigate the impact of Cd in cocoa cultivation, the use of genotypes that reduce the absorption, transport, and accumulation of the trace metal towards the aerial tissues. Therefore, this study highlights the IMC-67, PA-46 and PA-121 genotypes that could be used as rootstocks of economically important cultivars, revealing high tolerance to metal and low accumulation of Cd in aerial tissues.

Keywords: Rootstocks, confrontation mechanisms, heavy metals, cadmium, phytoremediation; *Theobroma cacao*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao en Colombia representa un renglón económico importante de la economía del país, producido por 65.341 familias en un área aproximada de 188.722 hectáreas reportando una producción de 59.740 toneladas métricas para el año 2019 (MADR, 2020).

En Colombia el cacao muestra un balance económico positivo en el mercado nacional e internacional , llegando a mercados importantes como México, Malasia, Bélgica y Estados unidos, con un incremento en las exportaciones del 13 % en los últimos 5 años (MADR, 2020).Esta situación es el reflejo de la importancia que ha ganado el producto a nivel regional, en donde países como Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, se destacan con reconocimientos internacionales, indicando que la región latinoamericana produce el 80% del cacao “prime” del mundo y que entre el 70% y 100% del total de la exportación de cacao de países como Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Perú y México corresponde a variedades especiales de cacao debido principalmente a su diversidad genética (ILAC, 2018).

No obstante, por ser un producto de alto valor, demanda requerimiento exigentes en calidad e inocuidad. La concentración de Cd en el grano de cacao es uno de los parámetros más importantes para su comercialización, toda vez que se ha encontrado una íntima relación del cultivo con el metal, demostrando una mayor predisposición para absorber Cd y a su vez encontrando mayor concentración en el chocolate terminado en comparación con otros alimentos y bebidas (Arévalo-Gardini et al., 2017). Así mismo la Unión Europea (UE) ha definido los niveles máximos permitidos para el chocolate y otros productos derivados del cacao. Esta regulación, que inicio su implementación en el año 2019, ha establecido límites de umbral que oscilan entre 0,10 y 0,80 mg Cd kg^{-1} de materia seca, dependiendo del porcentaje de cacao crudo presente en el producto final (Contam EFSA, 2014).

Estudios recientes han demostrado que metales como el níquel (Ni), arsénico (As), bismuto (Bi), cromo (Cr), cadmio (Cd) y plomo (Pb) se pueden acumular en granos de cacao, cáscaras de mazorcas y productos a base de cacao (Bertoldi et al., 2016; Chavez et al., 2015;(Huamaní-Yupanqui et al., 2012a)). El Cd es un metal traza no esencial que se encuentra de forma natural en los suelos debido a la mineralización del material parental que contiene Cd o al aporte por emisiones volcánicas, estas concentraciones pueden aumentarse mediante actividades antropogénicas como las prácticas agrícolas y actividades industriales (Adriano, 2001; Kabata-Pendias & Steke, 2019).

El 90% de la exposición humana al Cd para la población no fumadora está relacionada con los productos alimenticios (EFSA, 2012).La exposición al Cd afecta la salud humana, animal y de plantas. En humanos, se reportan lesiones en el embarazo, irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos, daños renales, enfisema, y cáncer pulmonar (Antoine et al., 2017;Amadi et al., 2017). En plantas generalmente conduce a sufrir estrés oxidativo y fitotoxicidad (Benavides et al., 2005) como resultado de que el Cd reemplaza a otros elementos esenciales (Ca, Fe, Mg y Zn) en las enzimas, que generalmente pierden su función (Clemens, 2006; Verbruggen et al., 2009; Küpper & Andresen, 2016). Sin embargo, también se reportan mecanismos de tolerancia en las plantas al Cd, en donde se destacan la exclusión de metales, la excreción activa, la translocación restringida y redistribución a los tejidos menos sensibles, la unión a la célula o quelación y la compartimentación en vacuolas(Gallego et al., 2012; Shahid et al., 2016).

En estudios previos se ha puesto en evidencia la amplia plasticidad fenotípica en términos de la respuesta del cacao al estrés inducido por exceso de Cd, reconociendo comportamientos de bioacumulación del metal y compartimentación en diferentes genotipos. En Perú, Arévalo-Gardini et al., (2017) reportan mayor predisposición a la acumulación de Cd en los genotipos CCN-51, ICS-95 y algunos híbridos que en los genotipos nativos. Lewis et al., (2018) informaron

una variación de hasta 13 veces la concentración del Cd en granos de cacao de los 100 genotipos evaluados, revelando al grupo genético “Contamana “como los genotipos con mayor acumulación en tejidos, y al grupo “Trinitario” como los genotipos con menor acumulación. Engbersen et al.,(2019) por su lado informaron que el genotipo POUND-7 presentó menor predisposición a incorporar Cd en grano, difiriendo significativamente de los otros 10 cultivares evaluados; reveló a su vez una estrecha relación del contenido de Cd del suelo con el contenido de Cd en los tejidos aéreos de la planta, pero no con la concentración del grano, igualmente encontró que las concentraciones más altas de Cd se encontraron en las ramas y las más bajas en los granos inmaduros, sin encontrar diferencias significativas entre las ramas viejas y jóvenes.

En el mismo contexto, se indica que los granos de cacao tienen diferentes concentraciones de Cd dependiendo no solo de la variedad sino también del sitio geográfico, encontrando concentraciones medias que alcanzan 1,4 mg kg^{1} en América del Sur, 0,5 mg kg^{1} en África Oriental y América Central, 0,3 mg kg^{1} en Asia y 0,09 mg kg^{1} en África Occidental (Bertoldi et al., 2016). De la misma manera (Argüello et al., 2019) desarrolló un análisis en granos de cacao de diferente origen y mostró que la concentración de Cd de América del Sur fue casi tres veces mayor que en los de América Central y África Oriental y diez veces superior a la de África Occidental reportada por Bertoldi et al, en el año 2016. Ese análisis sugiere que las altas concentraciones generalizadas de Cd en América del Sur y en América Central podrían ser de origen geogénico, sin relación con la contaminación antropogénica

La situación en Colombia no es ajena a la reportada en la región, y despierta preocupación por el futuro de las exportaciones del cacao y sus derivados, debido a los lineamientos de la Comunidad Europea, con respecto a los niveles de Cd. En análisis realizados a granos de cacao en cultivos ubicados sobre municipios cacaoteros del departamento de Santander, Colombia se encontró que el 57 % de las muestras colectadas presentan niveles que

superan los máximos establecidos por la Comunidad Europea (Pabón et al., 2014) .De la misma manera, Aguirre-Forero et al., (2020) informa que en la región del departamento del magdalena el contenido de Cd en las muestras de granos excedieron los límites permisibles por la UE en suelos con bajo contenido de cadmio. Bravo et al., (2021) en el estudio más extensivo sobre la contaminación de suelos por Cd en Colombia, informa que de 1837 muestras tomadas en los departamentos cacaoteros del país, cerca del 42 % supera el umbral definido para la concentración natural de Cd en suelo establecido por el ministerio de ambiente de Finlandia (Ministry of the Environment Finland, 2007), encontrando suelos con una contaminación de hasta 27 mg kg^{1}.

En el establecimiento de cultivos comerciales de cacao se ha recomendado utilizar la propagación asexual por injerto, logrando mayor precocidad, uniformidad, calidad y alta productividad (IICA, 2017). Se recomienda utilizar plantas portainjertos que presenten características agronómicas deseables reconocidas por Palencia, 2005, una de ellas es la resistencia a los patógenos *Ceratocystis sp* y *Phytophthora sp,* enfermedades de importancia económica en Colombia (Palencia & Mejia, 2007). Considerando este contexto, se plantea una alternativa para la mitigación de la bioacumulación de Cd, consistente en la selección de genotipos con baja acumulación de Cd para ser utilizados como plantas portainjertos sobre copas de interés comercial, sugiriendo un potencial desarrollo de combinaciones injerto/portainjertos más efectivos en la exclusión de Cd en los tejidos aéreos. Los estudios sobre éste tópico son limitados en la literatura, por esto, en el presente estudio se evaluó la bioacumulación de Cd en 9 genotipos de cacao bajo condiciones de invernadero, seleccionados por ser cultivares recomendados para su uso como portainjertos en Colombia (Palencia & Mejia, 2007) demostrando características agronómicas importantes presentando resistencia a las

enfermedades producidas por los patógenos *Ceratocystis sp y Phytophthora sp* (Sanches et al., 2008*;* Iwaro et al., 1997)*.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área experimental

Las plantas se cultivaron bajo condiciones de invernadero en el centro de investigación de Agrosavia “la Suiza” ubicado en el municipio de Rionegro, departamento de Santander; (N 7° 22’12”) (W - 73° 10’39”). Ubicada a 530 msnm bajo luz solar natural a una temperatura promedio de 25 ± 4°C y a una densidad de flujo fotónico fotosintético promedio de 1390±534 µmol m^{-2} s^{-1} al mediodía.

Establecimiento de los experimentos

Se utilizaron semillas de los clones EET 61, EET 62, IMC 60, IMC 67, PA 121, PA 150, PA 46, SCC 85 y SCC 86 procedentes del Banco de germoplasma del centro de investigación la Suiza. Estas semillas se pregerminaron en turba *sphagnum* para posteriormente ser trasplantadas en sustrato de desarrollo. Las plantas fueron cultivadas en materas de polietileno con volumen de 2.8 litros. Se utilizó como sustrato suelo de los primeros 30 cm, una parte de arena fina de rio y media parte de abono orgánico. Este sustrato fue triturado, tamizado y desinfectado mediante la técnica de solarizado con cubierta plástica negra. El experimento se sometió a condiciones de umbráculo del 65 % mediante malla polisombra. Se efectuaron riegos diarios y el control de arvenses se efectuó de manera manual, no se desarrolló ningún tipo de fertilización. Las propiedades químicas del sustrato utilizado se resumen en la tabla 1.

Como fuente de cadmio se utilizó el cloruro de cadmio ($CdCl_2$) (SIGMA-ALDRICH, Cadmium chloride-99.99% trace metals basis). La adición de las concentraciones de Cd se realizó a los 90 días después de la siembra (dds). Los tratamientos contemplados se definieron al tomar en cuenta al factor concentración de cadmio con tres niveles (0 ppm, 6 ppm, 12 ppm), el primer nivel constituyó el tratamiento control que representa el sustrato estándar presentando un contenido de cadmio de 0,64 $mg.kg^{-1}$ (Tabla 1)

Se realizaron cuatro lecturas de parámetros de crecimiento efectuadas cada 30 días (60 dds hasta los 180 dds) y tres muestreos destructivos para determinar concentración de cadmio ($mg.kg^{-1}$), en los tejidos de las plantas a los 30, 60 y 90 días después de la adición de las dosis de cadmio.

Tabla 1. Propiedades químicas del sustrato.

Analytical determination	Value	Unit	Analytical determination	Value	Unit
Cadmium (Cd) **	0,64	mg.kg-1	Acidity (Al+H) cmol(+)/kg KCl	N.D	cmol(+)/kg
pH (1:2,5)	6	pH units	(Al) Intercambiable	N.D	cmol(+)/kg
Electric conductivity (EC)	0,08	dS/m	Calcium (Ca) *	3,99	cmol(+)/kg
Organic material (OM) Walkey & Black	0,25	g/100g	Magnesium (Mg) *	0,35	cmol(+)/kg
Phosphorus (P) Bray II *	41,68	mg.kg-1	Potassium (K) *	0,1	cmol(+)/kg
Sulfur (S) *	2,61	mg.kg-1	Iron (Fe) olsen *	37,41	mg.kg-1
Effective cation exchange capacity (ECEC)	4,53	cmol(+)/kg	Copper (Cu) Olsen *	<1,0	mg.kg-1
Boron (B) *	0,18	mg.kg-1	Manganese (Mn) Olsen *	14,18	mg.kg-1
Zinc (zn) Olsen *	1,14	mg.kg-1			

* Metal available values

** Pseudototal value

Variables de crecimiento y contenido de cadmio

Se registraron parámetros fisiológicos de crecimiento a los 60 dds, 90 dds, 120 dds, 150 dds y 180 dds. Estas variables corresponden a: Altura de la planta, diámetro basal y numero de hojas. Se evaluó la concentración del metal pesado acumulado en raíces, tallo y hojas, esto se

desarrolló en 3 momentos mediante tres muestreos destructivos a los 120 dds, 150 dds y 180 días dds (30, 60, y 90 días después de aplicados los tratamientos de cadmio). Las plantas se cosecharon y se separaron la raíz, el tallo y las hojas. Las raíces se lavaron con agua presurizada para luego secar por 24 horas bajo sombra. Los tejidos se empacaron en bolsas de papel previamente rotuladas, se registró el peso húmedo y se llevó a secado en horno por 48 h a 60°C para la determinación de la biomasa desarrollada y con los datos obtenidos definir la tasa relativa de crecimiento (TRC) para cada tratamiento. La TRC se calculó siguiendo la ecuación propuesta por (Hunt, 1982). RGR = [ln (W2) ln (W1)] / (t2 t1); en donde W1 y W2 son el peso fresco (g) inicial y final en el tiempo de duración del experimento t1 y t2 Posteriormente se realizó el envío al laboratorio de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Agrosavia ubicado en Cundinamarca-Colombia. El método analítico utilizado para la cuantificación de cadmio fue por el método de digestión cerrada a través de microondas de presión asistida con una relación acido nitrico:peróxido 5:1(v/v) y cuantificación mediante espectrometría de emisión atómica de plasma inductivamente acoplado ICP/OES Thermo Scientific modelo 6500 (U.S EPA, 2018).

Las relaciones de concentración de cadmio, se evaluaron mediante la metodología propuesta por Zayed et al., (1998) en donde se determinaron los factores de concentracion del metal, factor de translocacion (TF), factor de bioconcentracion de la raiz (BCFR) y factor de bioconcentracion aerea (BCFA). Se consideró también la respuesta de la planta a la acumulación del contaminante en sus tejidos en diferentes niveles de concentración de sustrato , para esto se siguió el protocolo de Wilkins, (1978), para calcular el índice de tolerancia (TI) contrastando la biomasa desarrollada de la planta sometida a niveles crecientes de concentración del contaminante con la biomasa del tratamiento control.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se dispuso bajo un diseño en bloques completamente al azar, en donde se emplearon 20 plantas por tratamiento con tres repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 20 plantas, en donde se tomaron 3 plantas para mediciones de variables de crecimiento y nueve plantas para los muestreos destructivos por tratamiento.

Para la elaboración de gráficas se utilizó el software SigmaPlot for Windows versión 14.0 y MetaboAnalyst 5.0. Se realizaron análisis estadísticos para todos los parámetros evaluados utilizando el software IBM SPSS Statistics 21. Se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene, ($p < 0.05$) respectivamente, de no cumplirse se realizó transformación logarítmica (ln) de los datos. Por cada parámetro evaluado se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) y cuando se detectaron diferencias significativas, se efectuó una prueba de comparación de medias Duncan ($p < 0.05$) para evaluar contrastes entre tratamientos.

RESULTADOS

Al evaluar la interacción del factor concentración de sustrato con las variables altura, diámetro basal y numero de hojas se encuentra que no se evidencian diferencias significativas ($p<0.05$) en ninguno de los niveles de contaminación con Cd para ningún genotipo de cacao (Resultados no mostrados). Sin embargo, la producción de biomasa total, representada con la variable peso seco, se vio afectada de manera significativa por los tratamientos con Cd en los genotipos de cacao (Tabla 2). El desarrollo de biomasa en el tratamiento -control, demostró que el genotipo PA-121 presentó el mejor desarrollo, produciendo 21,3 gr de biomasa total a una tasa relativa de crecimiento (TRC) de 0,011 $g.dia^{-1}$, y el genotipo con menor desarrollo revelado fue

EET-61 produciendo 15,5 gr de biomasa total con una TRC de 0,007 g. dia^{-1} (Figura 1). No se presentaron diferencias significativas en TRC para la mayoría de los genotipos de cacao en el tratamiento control, excepto para EET-61 y EET-62 los cuales presentaron el menor valor en la tasa de crecimiento.

Tabla 2. Biomasa de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días

	Total dry mass (g)			Aerial dry mass (g)			Root dry mass (g)		
Genotype[a,b]	Control	6 ppm	12 ppm	Control	6 ppm	12 ppm	Control	6 ppm	12 ppm
EET-61	15,5 ± 1,0 a	14,3 ± 0,4 a	12,6 ± 0,6 a	11,2 ± 0,8 a	10,7 ± 0,4 a	8,8 ± 0,3 a	4,2 ± 0,3 a	3,5 ± 0,3 a	3,8 ± 0,3 a
EET-62	17,2 ± 0,9 ab	15,8 ± 0,6 abc	14,6 ± 0,4 b	12,1 ± 0,8 ab	11,5 ± 0,5 ab	10,3 ± 0,3 b	5,0 ± 0,3 ab	4,2 ± 0,2 ab	4,3 ± 0,2 a
IMC-60	19,6 ± 1,8 bc	19,0 ± 0,5 d	19,3 ± 0,3 d	14,9 ± 1,5 b	14,2 ± 0,5 de	13,8 ± 0,4 e	4,7 ± 0,5 a	4,7 ± 0,3 bc	5,4 ± 0,3 bc
IMC-67	18,4 ± 1,5 abc	17,0 ± 0,3 bc	17,3 ± 0,7 c	14,0 ± 1,1 b	12,8 ± 0,3 bcd	12,7 ± 0,5 de	4,4 ± 0,5 a	4,2 ± 0,4 ab	4,6 ± 0,4 a
PA-121	21,3 ± 1,2 c	20,9 ± 0,6 e	18,0 ± 0,8 cd	14,9 ± 0,9 b	15,5 ± 0,5 e	12,2 ± 0,6 cd	6,3 ± 0,3 c	5,4 ± 0,3 c	5,7 ± 0,4 c
PA-150	18,8 ± 0,7 abc	16,2 ± 1,1abc	15,6 ± 0,6 b	14,3 ± 0,6 b	12,1± 0,9 abc	11,1± 0,4 bc	4,4 ± 0,3 a	4,1± 0,3 ab	4,5 ± 0,3 a
PA-46	18,3 ± 0,6 abc	15,0 ± 0,7 ab	15,0 ± 0,7 b	13,6 ± 0,5 ab	11,5 ± 0,5 ab	11,1± 0,5 bc	4,7 ± 0,3 a	3,4 ± 0,3 a	3,8 ± 0,3 a
SCC-85	19,4 ± 0,9 bc	16,2 ± 0,8 abc	14,4 ± 0,5 b	14,7 ± 0,8 b	11,9 ± 0,6 abc	10,5 ± 0,4 b	4,7 ± 0,3 a	4,2 ± 0,3 ab	3,8 ± 0,3 a
SCC-86	20,1± 0,6 bc	17,8 ± 0,7 cd	17,9 ± 0,5 cd	14,1± 0,4 b	13,5 ± 0,6 cd	13,5 ± 0,5 e	5,9 ± 0,3 bc	4,2 ± 0,3 ab	4,3 ± 0,3 a

a. Values are the mean ± SE (n = 9)
b. Significant differences among treatments are represented by differents letters according to the Duncan's test ($p < 0.05$)

Todos los genotipos de cacao presentaron una afectación variable en el crecimiento bajo la exposición de sustrato contaminado por Cd. SCC-85 y PA-46 ajustaron la mayor afectación en el crecimiento, estos genotipos sufrieron una pérdida de biomasa del 14 % (Tabla 2) cuando se expusieron a contaminación de 12 ppm con una reducción de su TRC de 35 y 32 % respectivamente (Figura 1). En el nivel de contaminación 6 ppm se evidenció una pérdida en el desarrollo de biomasa de 8 y 10 % con una reducción de TRC de 15 y 24% respectivamente Por otro lado, IMC-60 e IMC-67 fueron los genotipos que obtuvieron el mejor rendimiento cuando se sometieron a estrés por la exposición con cadmio, estos genotipos presentaron valores similares entre los dos niveles de contaminación ajustando una pérdida de biomasa del 3% y 6 % con una reducción del 3 y 9% de su TRC respectivamente.

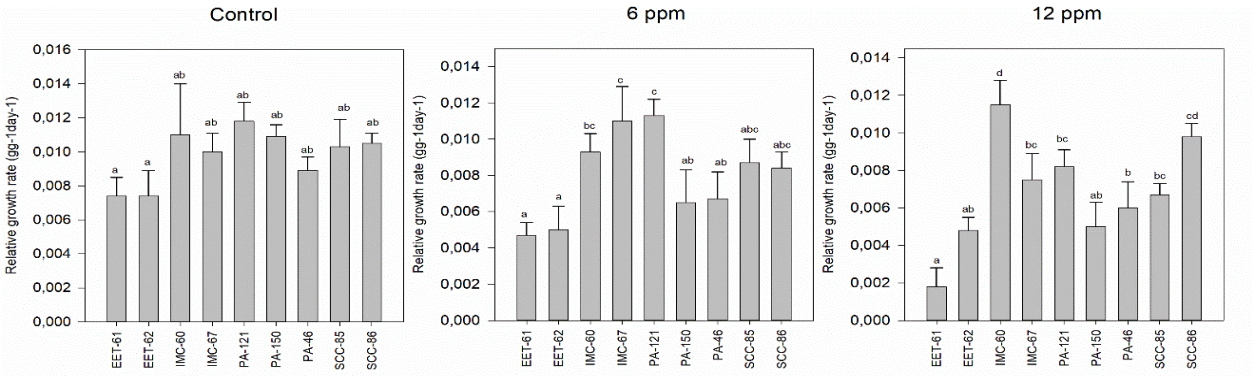

Figura 1. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el Test de Duncan ($p<0.05$).

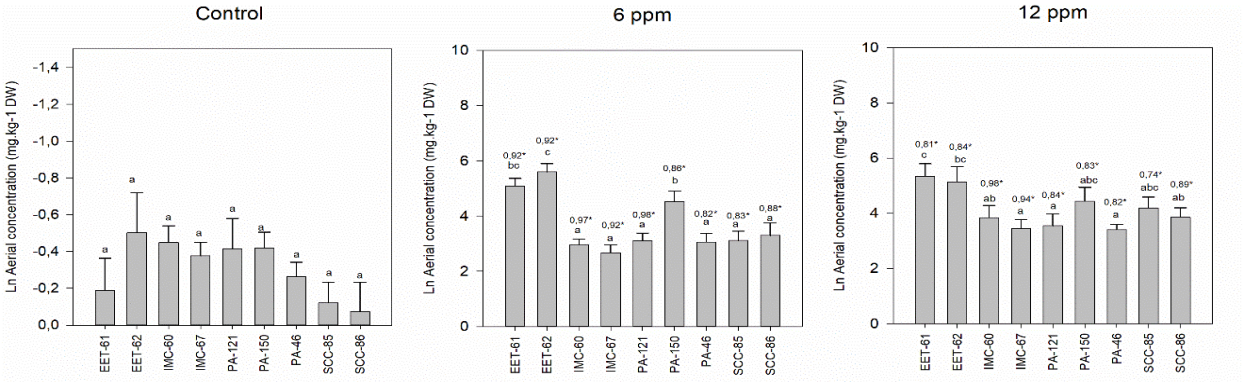

Figura 2. Concentración aérea de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el Test de Duncan ($p<0.05$).

Cuando las plantas estuvieron expuestas a los diferentes niveles de Cd, la concentración de este metal en la parte aérea de los genotipos IMC-60, IMC-67, PA-46, SCC-86, SCC-86 y PA-121 demostraron tener diferencias estadísticas significativas ($p< 0.05$) con respecto a los otros genotipos (Figura 2), siendo estos los genotipos con menor acumulación. También se destacan los genotipos IMC-67 y PA-46 por presentar valores menores a 50 $mg.kg^{-1}$ en los dos niveles de contaminación por Cd (Tabla 3). Los genotipos EET-61, EET 62, PA-150 revelaron valores de concentración aérea mayores a 100 $mg.kg^{-1}$ en los dos niveles de contaminación con un valor de tolerancia al metal aceptable (Tabla 4), criterios suficientes para reconocer a éstos genotipos como hiperacumuladores de Cd (Baker & Reeves, 2000). Según la clasificación propuesta por

(Lux et al., 2004), todos los genotipos evaluados estarían definidas como altamente tolerantes (TI= > 60%) cuando son sometidos a una contaminación de hasta 12 ppm de Cd .

Tabla 3. Concentración de cadmio en tejidos de nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días.

	Aerial concentration			Root Concentration		
Genotype[a]	Control	6 ppm	12 ppm	Control	6 ppm	12 ppm
EET-61	0,89 ± 0,15	186,41 ± 33,53	341,98 ± 147,28	0,29 ± 0,06	8,68 ± 1,18	11,59 ± 3,27
EET-62	0,66 ± 0,11	323,77 ± 70,25	282,81 ± 97,10	0,39 ± 0,15	12,90 ± 5,05	12,17 ± 3,00
IMC-60	0,65 ± 0,05	21,23 ± 4,15	75,92 ± 34,05	0,36 ± 0,06	15,94 ± 4,12	38,85 ± 13,80
IMC-67	0,69 ± 0,04	17,65 ± 5,02	41,49 ± 14,99	0,27 ± 0,18	21,31 ± 8,7	34,78 ± 15,77
PA-121	0,71 ± 0,04	26,79 ± 6,80	54,41 ± 21,85	0,37 ± 0,10	36,63 ± 16,92	47,56 ± 13,38
PA-150	0,67 ± 0,05	121,75 ± 32,98	141,65 ± 53,59	0,29 ± 0,01	11,84 ± 2,79	14,89 ± 2,13
PA-46	0,77 ± 0,05	26,11 ± 6,56	32,63 ± 5,74	0,34 ± 0,04	25,43 ± 9,13	34,49 ± 11,88
SCC-85	0,91 ± 0,10	29,63 ± 9,66	94,62 ± 32,89	0,30 ± 0,03	50,65 ± 18,11	49,35 ± 13,97
SCC-86	0,99 ± 0,18	47,76 ± 16,46	61,56 ± 18,51	0,44 ± 0,05	18,63 ± 3,78	57,02 ± 19,32

a. Values are the mean ± SE (n = 3)

Se evidencia entonces una alta capacidad de acumulación de Cd en el tejido aéreo sobre todos los genotipos de cacao evaluados, esta condición también es revelada al evaluar el factor de traslocación (TF), en donde se alcanza una translocación efectiva mayor al 200 % del metal presente en la raíz hacia los tejidos aéreos en cualquier nivel de contaminación por Cd para todos los casos estudiados De igual manera, es de destacar el comportamiento de los genotipos IMC-67, PA-46, PA-121 evidenciando la eficiencia en la translocación del metal más baja de los genotipos evaluados, llevando 10 y 15 veces menos metal que los genotipos EET-61 y EET 62 (Tabla 4).

La distribución del metal en los tejidos de la planta reveló dos propensiones marcadas de bioacumulación (Figura 3) , la primera obedece a los genotipos con baja acumulación (IMC-67 ,PA-121 y PA-46) desarrollando los valores de BCFA más bajos y un BCFR representado en 45 % 50% y 54 % del BCF total respectivamente cuando son sometidos a una alta exposición por Cd (12 ppm) involucrando por supuesto una respuesta a la estabilización del metal en raíces; por

otro lado, la tendencia de los genotipos con mayor acumulación (EET-61,EET 62 y PA-150) presentaron el mayor valor BCFA y un BCFR por debajo de 1 % del BCF total en los dos niveles de contaminación por Cd respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de Concentración (TF, BCFA, BCFR) e índice de tolerancia de nueve genotipos expuestos a niveles crecientes de contaminación por cadmio durante 90 días.

	TF			BCFA			BCFR			Tolerance Index (TI)	
Genotype[a]	Control	6 ppm	12 ppm	Control	6 ppm	12 ppm	Control	6 ppm	12 ppm	6 ppm	12 ppm
EET-61	3,21±0,38	23,40 ±5,53	35,07± 13,66	1,39 ±0,23	31,06 ±5,58	28,49± 12,27	0,46 ±0,10	1,44 ±0,19	0,96 ±0,27 a	0,92 ±0,007	0,87 ±0,083
EET-62	2,18 ±0,39	53,03± 19,47	32,33 ± 11,06	1,04 ±0,18	53,96 ± 11,70	23,56 ±8,09	0,61±0,24	2,15 ±0,84	1,01±0,25 ab	0,96 ±0,064	0,90 ±0,087
IMC-60	2,20 ±0,49	2,23 ±0,78	4,11± 1,72	1,01±0,08	3,53 ±0,69	6,32 ±2,83	0,57 ±0,10	2,65 ±0,68	3,23 ± 1,15	0,93 ±0,042	0,97±0,013
IMC-67	2,55 ±0,15	2,19 ±0,98	2,79 ± 1,35	1,08 ±0,07	2,94 ±0,83	3,45 ± 1,24	0,42 ±0,02	3,55 ± 1,45	2,89 ± 1,31	0,92 ±0,001	0,94 ±0,012
PA-121	2,12 ±0,27	2,07 ±0,79	2,46 ± 1,00	1,11±0,21	4,46 ± 1,12	4,53 ± 1,82	0,59 ±0,16	6,10 ±2,82	3,93 ± 1,11	1,00 ±0,036	0,86 ±0,034
PA-150	2,28 ±0,22	17,06 ±6,39	10,08 ±3,80	1,04 ±0,08	20,29 ± 5,49	11,80 ±4,46	0,46 ±0,02	1,97 ±0,46	1,24 ±0,17	0,93 ±0,099	0,90 ±0,107
PA-46	2,43 ±0,35	2,00 ±0,72	2,00 ±0,70	1,21±0,18	4,35 ± 1,09	2,71±0,47	0,54 ±0,07	4,23 ± 1,52	2,87 ±0,99	0,90 ±0,123	0,84 ±0,038
SCC-85	3,12 ±0,42	2,34 ± 1,50	3,84 ± 1,70	1,42 ±0,15	4,93 ± 1,61	7,88 ±2,74	0,,47 ±0,05	8,44 ±3,01	4,11± 1,16	0,94 ±0,153	0,86 ±0,180
SCC-86	2,31±0,31	3,80 ± 1,64	3,22 ± 1,33	1,55 ±0,28	7,12 ±2,74	5,13 ± 1,54	0,70 ±0,91	3,10 ±0,63	4,75 ± 1,61	0,92 ±0,050	0,90 ±0,015

a. Values are the mean ± SE (n = 3)

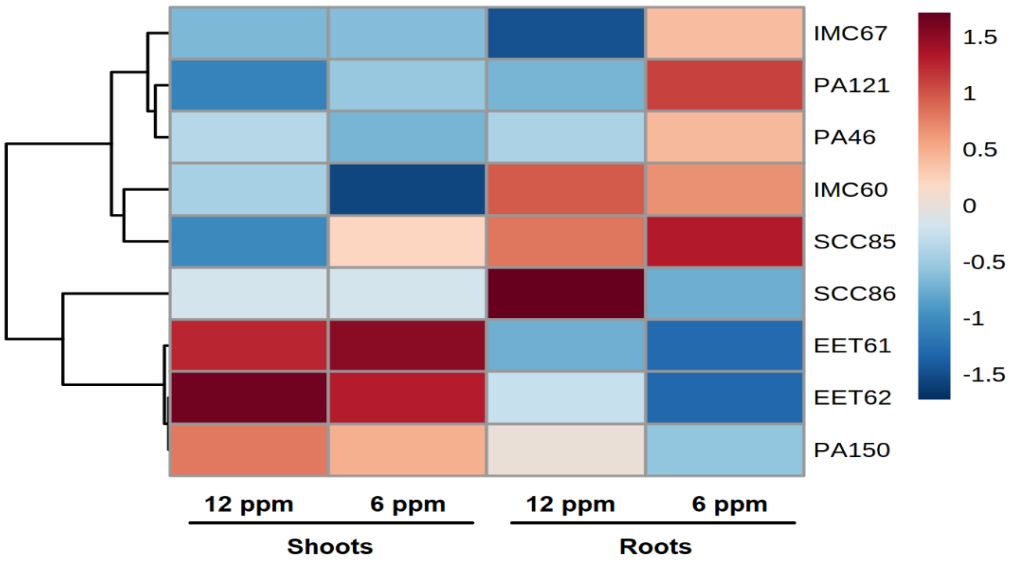

Figura 3. Concentración aérea y de raíces nueve genotipos de cacao expuestos a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Los grupos se definieron utilizando la correlación como medida de distancia y la media como algoritmo de agrupación. Datos transformados mediante transformación logarítmica (ln).

DISCUSIÓN

Las plantas son organismos complejos, modulados, autorregulados y presentan mecanismos de respuesta no lineales y extremadamente redundantes al ambiente que las rodea (Neto et al., 2021). Los rendimientos de materia seca disminuyeron a medida que aumentaba la concentración de Cd, corroborando que las altas concentraciones de Cd inhiben el crecimiento de las plantas, reduciendo la absorción de agua y nutrientes, la fotosíntesis y el metabolismo de carbono y nitrógeno en las plantas (Pietrini et al., 2003). La concentración aérea de Cd cuando los genotipos fueron sometidos a una contaminación de 6 y 12 ppm del metal, tuvo una variación de hasta 10 y 18 veces del cadmio acumulado entre los genotipos con baja acumulación (PA-46, IMC-67) y los hiperacumuladores (EET-61, EET-62) (Tabla 3), presentándose un valor similar a estudios de la misma naturaleza (Lewis et al., 2018; Arevalo-Hernandez et al., 2020). Esto demuestra que la absorción de Cd por las raíces de las plantas y su transferencia a tejidos aéreos está influenciada por las diferencias morfológicas, fisiológicas y anatómicas que se cambian conforme la especie o cultivar (Wang et al., 2012; Gupta et al., 2019; Yang et al., 2016).

Los resultados demuestran que los genotipos de cacao estudiados desencadenan tres mecanismos de enfrentamiento a la exposición de Cd: 1) plantas con predisposición a acumular Cd en el sistema radicular; 2) plantas que adoptan la evitación de la absorción de cadmio de las raíces y 3) plantas que activan la translocación de cadmio y exportan intensamente el metal hacia las partes aéreas. Curiosamente, esta respuesta no solo está determinada por los antecedentes genéticos de cada clon, sino también como consecuencia del proceso de interacción con los diferentes niveles de cadmio utilizados.

Por tanto, los clones EET61, EET62 y PA150 podrían agruparse claramente como plantas con alta eficiencia en la translocación de cadmio, dado que tanto a niveles moderados (6 ppm)

como a niveles superiores (12 ppm) estos clones muestran una acumulación de cadmio preferentemente en las partes aéreas, mientras que en las raíces se mantienen bajos los niveles de este metal (Figura 3). De hecho, el Cd, una vez absorbido por el sistema radicular, puede cargarse fácilmente en la xilema y distribuirse a otros tejidos vegetales (Huang et al., 2021). Además, es evidente que estos clones (EET61, EET62 y PA150) también mostraron una perdida considerable en la acumulación de biomasa (Tabla 2), lo que resalta los efectos deletéreos que este metal pesado puede tener sobre procesos metabólicos fundamentales, posiblemente involucrando desequilibrios en procesos de fotosíntesis y en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, como se describe ampliamente en otras especies vegetales(Nasraoui-hajaji et al., 2013).

En condiciones de exposición moderada a cadmio (6 ppm), los clones SCC-85, IMC-60, PA-46, PA-121 e IMC-67 presentan claramente una estrategia de acumulación de Cd en los tejidos radiculares, modulando así el sistema fotosintético ubicado principalmente en las hojas y manteniendo por tanto los procesos biosintéticos fundamentales. Este tipo de respuesta ha sido ampliamente descrita en la literatura para plantas hiperacumuladoras de Cd (Liang et al., 2016). En la mayoría de las especies que activan estos mecanismos, después de ser absorbido por las células de la raíz, el Cd se inmoviliza rápidamente a través de acción de las fitoquelatinas, que son péptidos sintetizados a partir de la vía metabólica del glutatión (El Rasafi et al., 2020). Una vez quelado, el complejo fitoquelatina-Cd se compartimenta en las vacuolas de las células radiculares, evitando así la translocación de este metal a las partes aéreas y, por tanto, preservando el funcionamiento metabólico de estos tejidos aéreos (Liang et al., 2016; Bashir et al., 2015).Se destacan en éste grupo, los genotipos IMC-60, PA-121 e IMC-67 que presentan poca afectación en el crecimiento revelando los valores más altos de tolerancia por la exposición

en los dos niveles de contaminación por Cd (Tabla 4), lo que sugiere la efectividad de esta estrategia de compartimentación del metal pesado en las raíces.

Los genotipos SCC-86, SCC-85 e IMC-60 demuestran la capacidad de modular y evitar la translocación hacia la parte aérea de la planta, revelando una respuesta de acumulación en las raíces en los dos niveles de contaminación por Cd (Figura 3). Diferente a la estrategia de los genotipos PA-46, PA-121 e IMC-67, que además de presentar una baja acumulación de Cd en la parte aérea, también presentan una baja acumulación de este metal en los tejidos radiculares, cuando son expuestas a 12 ppm de Cd. Estos resultados sugieren que estos clones tienen el potencial de activar mecanismos reguladores de retroalimentación negativa específicos a niveles más elevados de Cd (12 ppm), posiblemente implicando una regulación a la baja en la expresión y/o actividad de las proteínas transportadoras de Cd en las raíces (Ullah et al., 2019). Por tanto, esta estrategia posiblemente podría aportar muchas ventajas técnicas para el uso de estos genotipos (PA-46, PA-121 e IMC-67) como portainjertos, ya que presentan una respuesta de evitación de la primera etapa de acumulación de Cd (absorción radicular). Curiosamente, los clones PA46, PA121 e IMC67 tienen estrategias diferentes dependiendo del nivel de Cd al que están expuestos (Figura 3). Este tipo de respuesta, no lineal, de interacción planta-ambiente se observa comúnmente en varias especies vegetales (Neto et al., 2021) reflejando el alto grado de complejidad de los mecanismos de señalización involucrados en la respuesta del cacao al Cd (Dalcorso et al., 2010)

En cacao no se ha estudiado la estrategia de enfrentamiento al metal, pero posiblemente existan los mismos mecanismos reportados por otras plantas como el arroz (Meng et al., 2019; Uraguchi et al., 2009; Xu et al., 2017) la cebada (Sghayar et al., 2015), el trigo (Harris & Taylor, 2013) y la papa (Mengist et al., 2017) en donde la translocación desde la raíz hacia los brotes está mediada por diferentes mecanismos de quelación y compartimentación relacionados con variaciones

genotípicas. Así mismo la variación en la acumulación de Cd, así como la compartimentación entre cultivares de la misma especie vegetal podría atribuirse a la variación en una serie de factores morfológicos, como el tamaño y morfología de raíces, así como también factores fisiológicos como la producción de exudados radicales con agentes quelantes que inmovilicen los iones metálicos, y la actividad de transportadores de absorción de iones metálicos en la superficie de la raíz (Grant et al., 2007)

Los genotipos estudiados se seleccionaron por poseer características agronómicas importantes para ser utilizados como plantas portainjertos, los trabajos realizados para la evaluación de genotipos portainjertos han sido escasos, en su mayoría se eligen tratando de abarcar los grupos genéticos de *T. cacao* sin importar alguna característica sobresaliente para ser usada como portainjerto. Lewis et al (2018) relacionaron el trabajo más extenso hasta el momento realizado sobre la evaluación de genotipos con respecto a la bioacumulación de Cd, en donde evalúa 100 accesiones distribuidas en los ocho grupos genéticos reportados por Motamayor et al (2008) , se revela en éste estudio valores de concentración similares para el genotipo IMC-67 al ser sometido a baja contaminación por Cd, y a su vez lo agrupa dentro de los 10 genotipos con menor acumulación en tejidos. Por otro lado Engbersen et al (2019) estudiaron la bioacumulación de Cd en diferentes genotipos sembrados en suelos con una contaminación por Cd similar al tratamiento control del presente estudio, aquí se registraron concentraciones promedio de Cd más altas que las del presente estudio para el genotipo IMC-67, probablemente por la influencia del portainjerto utilizado o por la fertilización aplicada en dicho experimento. Chupillon et al (2017) y Arevalo-Hernandez et al (2020) en estudios realizados en macetas con un nivel de contaminación de Cd mayor al del presente estudio, destacan la baja acumulación del metal en el genotipo IMC-67 y a su vez revela la mayor concentración en el genotipo EET-400, coincidiendo con la condición hiperacumuladora de la colección EET, también revelada por

Barraza et al., 2017 encontrando que las concentraciones más altas de Cd en las hojas fueron las de los genotipos EET-103, EET-116 y EET-576.

Debido a la naturaleza del estudio no se puede concluir sobre la expresión de estos genotipos y su capacidad para acumular Cd en el grano, sin embargo Lewis et al (2018) revela una correlación significativa entre el contenido de Cd de la hoja y del grano, justificando que éstos estudios proporcionan una evidencia importante para la evaluación de la interacción del metal con la planta de cacao y su expresión génica, contribuyendo al mejoramiento de la especie permitiendo desarrollar estrategias para reducir los contenidos de Cd en el grano de cacao. Además, existe amplia evidencia sobre la influencia del portainjerto en la acumulación de Cd en otras especies como *Solanum photeinocarpum* (Lin et al., 2016), *Cyphomandra betacea* (Liu et al., 2019), *Galinsoga parviflora* (Xia et al., 2019), *Arabidopsis thaliana* (Chao et al., 2021), y *Glycine max* (Sugiyama et al., 2007), por esto se considera que el uso de los genotipos con baja acumulación usados como portainjertos en plantaciones comerciales podría constituir una estrategia importante para reducir la bioacumulación de Cd en grano de cacao en el corto plazo.

CONCLUSIONES

Al igual que en otras especies de plantas, las diferentes respuestas entre genotipos de cacao al estrés por Cd pueden estar relacionadas con su naturaleza genética. Las diferentes respuestas de la planta de cacao a la exposición con Cd encontradas en este estudio permiten proponer tres genotipos (IMC-67, PA-46 y PA 121) con características importantes para la fitorremediación del cadmio en el cultivo de cacao, estos genotipos revelan una tendencia a la evitación del metal mitigando la translocación y acumulación en los tejidos aéreos de la planta. Por tanto, constituyen una herramienta útil para el mejoramiento de cultivares de cacao con baja

acumulación de Cd, o para su uso como portainjerto, toda vez que estos materiales genéticos demuestran características agronómicas deseables como un desarrollo adecuado y resistencia a las enfermedades producidas por los patógenos *Ceratocystis sp Phytophthora sp* (Iwaro et al., 1997; Sanches et al., 2008). De la misma manera, para obtener mejores resultados en relación con el problema del Cd se sugiere incluir la evaluación de diferentes combinaciones injerto/portainjerto en respuesta a diferentes interacciones específicas planta-ambiente, es decir, incluyendo las recomendaciones más efectivas para cada escenario.

RECOMENDACIONES

Se debe ampliar el trabajo en los genotipos de cacao para comprender la variación genética en la acumulación del cadmio presentada, conociendo la ruta metabólica del metal en genotipos acumuladores, evidenciando los mecanismos de regulación implicados en la absorción, translocación, acumulación y compartimentación de cadmio. El conocimiento de estos mecanismos sumado a los factores que realizan el control genético permitirá incorporar o silenciar genes de importancia para el mejoramiento de variedades en términos de bioacumulación de Cd.

Agradecimientos

Los autores expresan gratitud con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) por suministrar los recursos necesarios para el desarrollo del experimento.

Conflicto de intereses

El manuscrito fue realizado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

REFERENCIAS

Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., & Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, *11*(2), 92–102. https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700

Adriano, D. C. (2001). Trace elements in the terrestrial environment. In *Trace elements in the terrestrial environment.* https://doi.org/10.2134/jeq1987.00472425001600010030x

Agudelo-Castañeda, G. A., Cadena-Torres, J., Almanza-Merchán, P. J., & Pinzón-Sandoval, E. H. (2018). Desempeño fisiológico de nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo la sombra de tres especies forestales en Santander, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *12*(1), 223–232. https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7341

Aguirre-Forero, S. E., Piraneque-Gambasica, N. V., & Vásquez-Polo, J. R. (2020). Heavy metals content in soils and cocoa tissues in Magdalena department Colombia: emphasis in cadmium. *Entramado*, *16*(2), 298–310. https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.6753

Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Martínez-Pérez, A., Thompson, A. J., Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2015). *Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security*. https://doi.org/10.1093/jxb/erv027

Alkorta, I., & Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of Organic Contaminants in Soils. *Bioresource Technology*, *79*, 273–276. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00016-5

Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability,Environmental Pollution 22. In *Archives of Dermatology* (Vol. 114, Issue 11). https://doi.org/10.1001/archderm.1978.01640230053014

Almeida, A.-A., & Valle, R. R. (2008). Ecophysiology of the cacao tree . Braz J Plant Physiol Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *19*(December), 425–448.

Amadi, C. N., Igweze, Z. N., & Orisakwe, O. E. (2017). Heavy metals in miscarriages and stillbirths in developing nations. *Middle East Fertility Society Journal*, *22*(2), 91–100. https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.03.003

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

Antoine, J. M. R., Fung, L. A. H., & Grant, C. N. (2017). Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica. *Toxicology Reports*, *4*(March), 181–187. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.03.006

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, *605–606*(2017), 792–800.

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122

Arevalo-Hernandez, C. O., Arevalo-Gardini, E., Barraza, F., Farfán, AbelHe, Z., & Baligar, V. C. (2020). Growth and nutritional responses of wild and domesticated cacao genotypes to soil cd stress. *Science of the Total Environment*, 143340. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111495

Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, *649*, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292

Arunakumara, K., Walpola, B. C., & Yoon, M.-H. (2013). Agricultural Methods for Toxicity Alleviation in Metal Contaminated Soils: A Review. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, *46*(2), 73–80. https://doi.org/10.7745/kjssf.2013.46.2.073

Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., & Smith, J. A. C. (2020). Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, *January*, 85–107. https://doi.org/10.1201/9780367803148-5

Baker, A. J. M., & Reeves, R. D. (2000). Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean the Environment. *Journal of Plant Biotechnology*, *1*(1), 304.

Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, *229*, 950–963. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080

Barton, C. D., Marx, D. H., Adriano, D. C., Koo, B. J., Newman, L., Czapka, S. J., & Blake, J. (2005). Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences*, *12*(4), 251–265. https://doi.org/10.1306/eg.06210404021

Bashir, H., Qureshi, M. I., Ibrahim, M. M., & Iqbal, M. (2015). *Chloroplast and photosystems : Impact of cadmium and iron deficiency* . *53*(X), 1–15.

Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 21–34. https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans and cocoa products. *Food Control*, *65*, 46–53. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013

Bonomelli, C., Bonilla, C., & Valenzuela, A. (2003). Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *38*(10), 1179–1186. https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003001000007

Brady, N. C., & Weil, R. R. (2002). The Nature and Properties of Soils, 13th Edition.By N. C. Brady and R. R. Weil. In *Agroforestry Systems* (Vol. 54, Issue 3). Pearson. https://doi.org/10.1023/A:1016012810895

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*, *11*(4), 761. https://doi.org/10.3390/agronomy11040761

Broadley, M. R., Willey, N. J., Wilkins, J. C., Baker, A. J. M., Mead, A., & White, P. J. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytologist*, *152*(1), 9–27. https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00238.x

Castro, A. V., de Almeida, A. A. F., Pirovani, C. P., Reis, G. S. M., Almeida, N. M., & Mangabeira, P. A. O. (2015). Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of Theobroma cacao L. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 115, pp. 174–186). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.003

Chao, D., Silva, A., Baxter, I., Huang, Y. S., Nordborg, M., Danku, J., Lahner, B., & Yakubova, E. (2021). *Genome-Wide Association Studies Identify Heavy Metal ATPase3 as the Primary Determinant of Natural Variation in Leaf Cadmium in Arabidopsis thaliana*. 1–13.

Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, *533*, 205–214. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106

Chupillon, C., Arévalo, H., Arévalo-Gardini, & Farfán-Pinedo. (2017). Acumulación de cadmio en seis genotipos de cacao utilizados como patrón. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR), Lima, Peru, 13-17 November 2017*, *37*(12), 1648–1653. https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-4254.2017.12.15

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, *88*(11), 1707–1719. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003

Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., & Verbruggen, N. (2013). Plant science: The key to

preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, *18*(2), 92–99. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.003

Contam EFSA. (2014). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, *9*(2), 10–14. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975

Cortés-Martínez, R., Solache-Ríos, M., Martínez-Miranda, V., & Alfaro-Cuevas, R. (2009). Removal of cadmium by natural and surfactant-modified mexican zeolitic rocks in fixed bed columns. *Water, Air, and Soil Pollution*, *196*(1–4), 199–210. https://doi.org/10.1007/s11270-008-9769-x

Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus Theobroma. *National Herbarium*, *35*(6), 379–607. https://repository.si.edu/handle/10088/27110?show=full

Cui, L., Pan, G., Li, L., Bian, R., Liu, X., Yan, J., Quan, G., Ding, C., Chen, T., Liu, Y., Liu, Y., Yin, C., Wei, C., Yang, Y., & Hussain, Q. (2016). Continuous immobilization of cadmium and lead in biochar amended contaminated paddy soil: A five-year field experiment. *Ecological Engineering*, *93*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.007

Dahmani-Muller, H., Van Oort, F., Gélie, B., & Balabane, M. (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, *109*(2), 231–238. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00262-6

Dalcorso, G., Farinati, S., Furini, A., Dalcorso, G., Farinati, S., & Furini, A. (2010). *Regulatory networks of cadmium stress in plants Regulatory networks of cadmium stress in plants*. *2324*. https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11425

De Oliveira, V. H., & Tibbett, M. (2018). Tolerance, toxicity and transport of Cd and Zn in Populus trichocarpa. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 155, pp. 281–292). https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.011

Delgadillo, A., Gonzalez, C., Prieto, F., Villagómez, J., & Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *14*(2), 597–612.

Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., Denys, S., Tack, K., Caboche, J., Delalain, P., Denys, S., & Halatte, V. (2014). *Assessing metals bioaccessibility to man in human health risk assessment of contaminated site To cite this version : HAL Id : ineris-00973245 Assessing metals bioaccessibility to Man in human health risk assessment of contaminated sites*.

Dickinson, N. M., & Pulford, I. D. (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice Salix: The evidence trail. *Environment International*, *31*(4), 609–613. https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.013

Dushenkov, V., Kumar, P., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environmental Science & Technology*, *29*, 1239–1245. https://doi.org/10.1021/es00005a015

EFSA. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, *10*(1), 1–37. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551

El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M. G., Sebastian, A., & Rinklebe, J. (2020). Technology Cadmium stress in plants : A critical review of the effects , mechanisms , and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental*

Science and Technology, *0*(0), 1–52. https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435

Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of the Total Environment*, *678*, 660–670. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001

Fan, K. C., Hsi, H. C., Chen, C. W., Lee, H. L., & Hseu, Z. Y. (2011). Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (Swietenia macrophylla) seedlings for phytoextraction applications. *Journal of Environmental Management*, *92*(10), 2818–2822. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.032

FAOStat. (2021). *FAOSTAT*. Food and Agriculture Organization. http://www.fao.org/faostat/en/#data%0D

Fedecacao, F. N. D. C. (2020). *fedecacao, 2020 El cultivo del cacao y su contribución al medio ambiente* (p. http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/20).

Fischerová, Z., Tlustoš, P., Jiřina Száková, & Kornelie Šichorová. (2006a). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. In *Environmental Pollution* (Vol. 144, Issue 1, pp. 93–100). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.005

Fischerová, Z., Tlustoš, P., Jiřina Száková, & Kornelie Šichorová. (2006b). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*, *144*(1), 93–100. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.005

Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., & Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity

and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, *83*, 33–46. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006

Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, *580*, 677–686. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014

Grant, C. A., Clarke, J. M., Duguid, S., & Chaney, R. L. (2007). *Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation*. *0*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.038

Greger, M., & Landberg, T. (1999). Use of willow in phytoexfraction. *International Journal of Phytoremediation*, *1*(2), 115–123. https://doi.org/10.1080/15226519908500010

Gupta, N., Yadav, K. K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R. P., & Kumar, A. (2019). Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Science of the Total Environment*, *651*, 2927–2942. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.047

Hannink, N., Rosser, S. J., French, C. E., Basran, A., Murray, J. A. H., Nicklin, S., & Bruce, N. C. (2001). *Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase*. *19*(December).

Harris, N. S., & Taylor, G. J. (2013). Cadmium uptake and partitioning in durum wheat during grain filling. *BMC Plant Biology*, *13*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-103

Hernández-Martínez, R., & Navarro, I. (2012). Estimation of dietary intake and content of lead

and cadmium in infant cereals marketed in Spain. *Food Control*, *26*, 6–14. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.024

Hoagland, D. R. ., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, *347*(2), 32. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257

Huamaní-Yupanqui, H. A., Huauya-Rojas, M. Á., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012a). Presence of heavy metals in organic cacao [Theobroma cacao L.) crop. *Acta Agronómica*, *61*(4), 339–344.

Huamaní-Yupanqui, H. A., Huauya-Rojas, M. Á., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012b). Presencia de metales pesados en cultivo de cacao [Theobroma cacao L.) orgánico. *Acta Agronomica*, *61*(4), 339–344.

Huang, Y., Chen, J., Zhang, D., Fang, B., Yangjin, T., Zou, J., Chen, Y., Su, N., & Cui, J. (2021). Ecotoxicology and Environmental Safety Enhanced vacuole compartmentalization of cadmium in root cells contributes to glutathione-induced reduction of cadmium translocation from roots to shoots in pakchoi (Brassica chinensis L .). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111616. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111616

Hunt, R. (1982). *Plant Growth Curves*. Edward Arnold.

ICCO. (2013). *Growing Cocoa, International Cocoa Organization -ICCO.* Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World; International Cocoa Organization. https://www.icco.org/growing-cocoa/

IICA. (2017). *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Manual técnico del*

cultivo de cacao Buenas prácticas para América Latina. www.iica.int

ILAC. (2018, July). Iniciativa Latinoamericana del Cacao.Observatorio del cacao fino y de aroma para america latina. *Boletin N°3*.

Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N. K., & Nakanishi, H. (2012). Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(47), 19166–19171. https://doi.org/10.1073/pnas.1211132109

Iwaro, A. D., Sreenivasan, T. N., & Umaharan, P. (1997). Foliar resistance to Phytophthora palmivora as an indicator of pod resistance in Theobroma cacao. *Plant Disease*, *81*(6), 619–624. https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.6.619

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

Kabata-Pendias, A., & Steke, B. (2019). *Trace elements in abiotic and biotic environments* (T. & F. Gorup (ed.)). CRC Press. www.crcpress.com

Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, *137*(1–2), 19–32. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024

Klang-Westin, E., & Eriksson, J. (2003). Potential of Salix as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant and Soil*, *249*(1), 127–137.

https://doi.org/10.1023/A:1022585404481

Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Phytoextraction: The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Soils. *Environmental Science & Technology*, *29*, 1232–1238. https://doi.org/10.1021/es00005a014

Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, *8*(3), 269–285. https://doi.org/10.1039/c5mt00244c

Kuzovkina, Y. A., & Quigley, M. F. (2005). Willows beyond wetlands: Uses of salix L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution*, *162*(1–4), 183–204. https://doi.org/10.1007/s11270-005-6272-5

Lasat, M. (2001). Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, *31*, 109–120. https://doi.org/10.2134/jeq2002.1090

Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., & Ceulemans, R. (2004). Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, *131*(3), 485–494. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.02.009

Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in Theobroma cacao L. *Science of the Total Environment*, *640–641*, 696–703. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365

Li, Q. S., Cai, S. S., Mo, C. H., Chu, B., Peng, L. H., & Yang, F. B. (2010). Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *73*(1), 84–88. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.002

Liang, T., Ding, H., Wang, G., Kang, J., Pang, H., & Lv, J. (2016). Ecotoxicology and Environmental Safety Sulfur decreases cadmium translocation and enhances cadmium tolerance by promoting sulfur assimilation and glutathione metabolism in Brassica chinensis L . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *124*, 129–137. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.011

Lin, L., Yang, D., Wang, X., Liao, M., Wang, Z., Lv, X., Tang, F., Liang, D., Xia, H., Lai, Y., & Tang, Y. (2016). Effects of grafting on the cadmium accumulation characteristics of the potential Cd-hyperaccumulator Solanum photeinocarpum. *Environmental Monitoring and Assessment*, *188*(2), 1–11. https://doi.org/10.1007/s10661-015-5084-3

Liu, Q., Huo, R., Lin, L., Liao, M., Wang, J., Tang, Y., Liang, D., Xia, H., Wang, X., Lv, X., Jiang, W., & Ren, W. (2019). Effects of different rootstocks on cadmium accumulation of grafted Cyphomandra betacea seedlings. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *00*(00), 1–8. https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1628953

Lux, A., Šottníková, A., Opatrná, J., & Greger, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in Salix clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum*, *120*(4), 537–545. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0275.x

MADR. (2005). La cadena del cacao en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005 Documento de Trabajo No. 58. *Min. Agricultura y Desarrollo Rural, Obs. Agrocadenas Colombia*, *1*(61), 51. http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/5890/1/2005112145659_caracterizacion_cacao.pdf

MADR. (2020). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.Cadena de valor de Cacao. In *Direccion de cadenas agrícolas y forestales*. https://sioc.minagricultura.gov.co

Marín Q, M. del P., Andrade, H. J., & Sandoval, A. P. (2016). Fijación de carbono atmosférico en la biomasa total de sistemas de producción de cacao en el departamento del Tolima, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *19*(2), 351–360. https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n2.2016.89

Mejía, L. A., & Palencia, G. E. (2003). Una aproximacion a los sistemas agroforestales. In *Programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria*.

Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytoestabilization of mine Tailings in Arid and Semiarid Environments-An Emergin Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*, *116*.

Meng, L., Huang, T., Shi, J., Chen, J., Zhong, F., Wu, L., & Xu, J. (2019). Decreasing cadmium uptake of rice (Oryza sativa L.) in the cadmium-contaminated paddy field through different cultivars coupling with appropriate soil amendments. *Journal of Soils and Sediments*, *19*(4), 1788–1798. https://doi.org/10.1007/s11368-018-2186-x

Mengist, M. F., Milbourne, D., Griffin, D., McLaughlin, M. J., Creedon, J., Jones, P. W., & Alves, S. (2017). Cadmium uptake and partitioning in potato (Solanum tuberosum L.) cultivars with different tuber-Cd concentration. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(35), 27384–27391. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0325-3

Mercedes Ordoñez, C., & Rangel-Ch, J. O. (2020). Composición florística y aspectos de la estructura de la vegetación en sistemas agroforestales con cacao (Theobroma cacao L. - Malvaceae) en el departamento del Huila, Colombia. *Revista de La Academia Colombiana*

de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, *44*(173), 1033–1046. https://doi.org/10.18257/raccefyn.1183

Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A., & Luyssaert, S. (2004). Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: Limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment*, *326*(1–3), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.12.010

Ministry of the Environment Finland. (2007). Threshold and guideline values for harmful substances in soil. In *Government Decree on the Assessment of Soil Contamination and Remediation Needs*. http://www.finlex.fi

Miranda, F. (1962). Wild Cacao in the Lacandona Forest, Chiapas, Mexico. *CATIE: Costa Rica.*, 7.

Mite, F. (2015). *Metales Pesados en Cacao , Perspectivas y Posible Manejo*. http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/049b3f076c63e02705257e0e005767b1

Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de ecuador. *Xii Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 17–19.

Miteva, E., Hristova, D., Nenova, V., & Maneva, S. (2005). Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: Changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. *Scientia Horticulturae*, *105*(3), 343–358. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.026

Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (Theobroma cacao L). *PLoS ONE*, *3*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311

Nasraoui-hajaji, A., Gharbi, F., & Ghorbel, M. H. (2013). *PSII efficiency in tomato grown on NO 3 or NH 4 as nitrogen source*. *8078*. https://doi.org/10.1080/12538078.2010.10516192

Nawaz, M. A., Imtiaz, M., Kong, Q., Cheng, F., Ahmed, W., Huang, Y., & Bie, Z. (2016). Grafting: A technique to modify ion accumulation in horticultural crops. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue OCTOBER2016). https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01457

Neto, M. L. C., Carvalho, F. E. L., Souza, G. M., & Silveira, J. A. G. (2021). Understanding photosynthesis in a spatial-temporal multiscale : The need for a systemic view Understanding photosynthesis in a spatial – temporal multiscale : The need for a systemic view. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, *April*. https://doi.org/10.1007/s40626-021-00199-w

Pabón, M. G., Sepúlveda, W., & Herrera Roa, L. (2014). *Caracterización de la producción de cacao en Santander y análisis de la presencia de cadmio en suelos y cultivos*. http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/2441

Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, *184*(1–4), 105–126. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5

Palencia, G. E. (2005). Establecimiento y manejo de sistemas agroforestales con cacao [Manual técnico]. In *Manual técnico.Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria.*

Corpoica.

Palencia, G. E., & Mejia, L. A. (2007). *Patrones para cacao*. Corporacion Colombiana de Investigación Agropecuaria. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2222/42973_48680.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pereira, M. P., Corrêa, F. F., & Castro, E. M. De. (2017). *Leaf ontogeny of Schinus molle L . plants under cadmium contamination : the meristematic origin of leaf structural changes*. https://doi.org/10.1007/s00709-017-1103-2

Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., & Massacci, A. (2003). Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology*, *133*(2), 829–837. https://doi.org/10.1104/pp.103.026518

Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, *56*, 15–39. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214

Poelmans, E., & Swinnen, J. (2019). A Brief Economic History of Chocolate. *LICOS - Centre for Institutions and Economic Performance, KU Leuven*. https://ideas.repec.org/p/lic/licosd/41219.html

Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - A review. *Environment International*, *29*(4), 529–540. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6

Punshon, T., & Dickinson, N. (1999). Heavy metal resistance and accumulation characteristics in

willows. *International Journal of Phytoremediation*, *1*(4), 361–385. https://doi.org/10.1080/15226519908500025

Ramesh, S. A., Shin, R., Eide, D. J., & Schachtman, D. P. (2003). Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiology*, *133*(1), 126–134. https://doi.org/10.1104/pp.103.026815

Ramírez-Ortiz, J., & Monreal, J. (2009). Study of Soil Contaminated with Arsenic, Cadmium and Lead in Ancient Tailings in Zacatecas, México. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, *2*(3), 120–124. http://www.waset.ac.nz/journals/ijcbe/v2/v2-3-23.pdf

Raskin, L., Smith, R. D., & Salt, D. E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment Abbreviation EDTA ethylenediaminetetraacetic acid. *Current Opinion in Biotechnology*, 8221–8226.

Rodríguez-Ortíz, J. C., Valdez-Cepeda, R. D., Lara-Mireles, J. L., Rodríguez-Fuentes, H., Vázquez-Alvarado, R. E., Magallanes-Quintanar, R., & García-Hernández, J. L. (2006). Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of cadmium and lead by tobacco (Nicotiana tabacum L.). *Bioremediation Journal*, *10*(3), 105–114. https://doi.org/10.1080/10889860600939815

Sanches, C. L. G., Pinto, L. R. M., Pomella, A. W. V., Silva, S. D. V. M., & Loguercio, L. L. (2008). Assessment of resistance to Ceratocystis cacaofunesta in cacao genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, *122*(4), 517–528. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9319-9

Sánchez Fonseca, C., Lama, D., & Suatunce Cunuhay, P. (2008). Hojas Caídas Y Aporte De Nutrientes De Diez Especies Forestales Tropicales. *Ciencia y Tecnología*, *1*(2), 73. https://doi.org/10.18779/cyt.v1i2.105

Santos, B., & Ríos, D. (2016). *Cálculo de Soluciones Nutritivas En suelo y sin suelo*. http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_622_soluciones_nutritivas.pdf

Sasaki, A., Yamaji, N., & Yokosho, K. (2012). *Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice*. *24*(May), 2155–2167. https://doi.org/10.1105/tpc.112.096925

Savvas, D., Colla, G., Rouphael, Y., & Schwarz, D. (2010). Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia Horticulturae*, *127*(2), 156–161. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.011

Savvas, D., Savva, A., Ntatsi, G., Ropokis, A., Karapanos, I., Krumbein, A., & Olympios, C. (2011). Effects of three commercial rootstocks on mineral nutrition, fruit yield, and quality of salinized tomato. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *174*(1), 154–162. https://doi.org/10.1002/jpln.201000099

Sekara, A., Poniedziałek, M., Ciura, J., & Jedrszczyk, E. (2005). Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: Implications for phytoremediation. In *Polish Journal of Environmental Studies* (Vol. 14, Issue 4, pp. 509–516).

Sghayar, S., Ferri, A., Lancilli, C., Lucchini, G., Abruzzese, A., Porrini, M., Ghnaya, T., Nocito, F. F., Abdelly, C., & Sacchi, G. A. (2015). Analysis of cadmium translocation, partitioning and tolerance in six barley (Hordeum vulgare L.) cultivars as a function of thiol metabolism. *Biology and Fertility of Soils*, *51*(3), 311–320. https://doi.org/10.1007/s00374-014-0977-9

Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Paula, M. C. A. (2016). Cadmium Bioavailability, Uptake, Toxicity and Detoxification in Soil-Plant System. *Springer International Publishing, Cham*, *241 Review*(December), 73–137. https://doi.org/10.1007/398

Singh, O. V., Labana, S., Jain, G. P., & K., R. B. · R. (2003). *Phytoremediation : an overview of metallic ion decontamination from soil*. 405–412. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1244-4

Sonwa, D. J., Nkongmeneck, B. A., Weise, S. F., Tchatat, M., Adesina, A. A., & Janssens, M. J. J. (2007). Diversity of plants in cocoa agroforests in the humid forest zone of Southern Cameroon. *Biodiversity and Conservation*, *16*(8), 2385–2400. https://doi.org/10.1007/s10531-007-9187-1

Sugiyama, M., Ae, N., & Arao, T. (2007). *Role of roots in differences in seed cadmium concentration among soybean cultivars — proof by grafting experiment*. 1–11. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9252-2

Thangavel, P., & Subbhuraam, C. V. (2004). Phytoextraction: Role of Hyperaccumulators in Metal Contaminated Soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B*, *70*, 109–130.

Thyssen, G. M., Keil, C., Wolff, M., Sperling, M., Kadow, D., Haase, H., & Karst, U. (2018). Bioimaging of the elemental distribution in cocoa beans by means of LA-ICP-TQMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *33*(2), 187–194. https://doi.org/10.1039/c7ja00354d

U.S EPA, (United States Environmental Protection Agency). (2018). *"Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry,": Vol. Revision 5*. https://www.epa.gov/esam/epa-method-6010d-sw-846-inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectrometry

Ueno, D., Yamaji, N., Kono, I., Huang, C. F., Ando, T., Yano, M., & Ma, J. F. (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, *107*(38), 16500–16505. https://doi.org/10.1073/pnas.1005396107

Ullah, I., Wang, Y., Eide, D. J., & Dunwell, J. M. (2019). *Evolution , and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from Theobroma cacao and their role in cadmium accumulation*. *August 2018*, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y

UNEP. (2010). Final review of scientific information on cadmium. *UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland*, *December*, pp.324.

Uraguchi, S., Mori, S., Kuramata, M., Kawasaki, A., Arao, T., & Ishikawa, S. (2009). Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, *60*(9), 2677–2688. https://doi.org/10.1093/jxb/erp119

Van Hall, C. J. J. (1914). *Cocoa* (London : Macmillan (ed.)).

Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation in plants. *Phytoremediation of Environmental Pollutants*, 99–116. https://doi.org/10.4324/9781315161549

Vysloužilová, M., Tlustoš, P., & Száková, J. (2003). Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of Salix spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant, Soil and Environment*, *49*(12), 542–547. https://doi.org/10.17221/4191-pse

Wang, C., Ji, J., Yang, Z., Chen, L., Browne, P., & Yu, R. (2012). Effects of soil properties on the transfer of cadmium from soil to wheat in the Yangtze River Delta Region, China - A typical industry-agriculture transition area. *Biological Trace Element Research*, *148*(2), 264–274.

https://doi.org/10.1007/s12011-012-9367-z

Wieshammer, G., Unterbrunner, R., García, T. B., Zivkovic, M. F., Puschenreiter, M., & Wenzel, W. W. (2007). Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by Salix ssp. and intercropping of Salix caprea and Arabidopsis halleri. *Plant and Soil*, *298*(1–2), 255–264. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9363-9

Wilkins, D. A. (1978). the Measurement of Tolerance To Edaphic Factors By Means of Root Growth. *New Phytologist*, *80*(3), 623–633. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01595.x

Wood, G. A. R., & Lass, R. A. (1985). *Cocoa*. Wiley. https://books.google.com.co/books?id=urs9QCMKOw4C

Xia, H., Wang, Y., Liao, M., Lin, L., Zhang, F., Tang, Y., Zhang, H., Wang, J., Liang, D., Deng, Q., Lv, X., Chen, C., & Ren, W. (2019). Effects of different rootstocks on cadmium accumulation characteristics of the post-grafting generations of Galinsoga parviflora . *International Journal of Phytoremediation*, *0*(0), 1–7. https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1644287

Xu, Q., Wang, C., Li, S., Li, B., Li, Q., Chen, G., Chen, W., & Wang, F. (2017). Cadmium adsorption, chelation and compartmentalization limit root-to-shoot translocation of cadmium in rice (Oryza sativa L.). *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(12), 11319–11330. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8775-1

Yadav, S. K., Juwarkar, A. A., Kumar, G. P., Thawale, P. R., Singh, S. K., & Chakrabarti, T. (2009). Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by Jatropha curcas L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology*, *100*(20), 4616–4622. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.062

Yang, Y., Chen, W., Wang, M., & Peng, C. (2016). Regional accumulation characteristics of cadmium in vegetables: Influencing factors, transfer model and indication of soil threshold content. *Environmental Pollution*, *219*, 1036–1043. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.003

Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., Fouet, O., Argout, X., Guichoux, E., Salin, F., Solorzano, R. L., Bouchez, O., Vignes, H., Severts, P., Hurtado, J., Yepez, A., Grivetti, L., Blake, M., & Valdez, F. (2018). The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(12), 1879–1888. https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x

Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants : I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, *27*(3), 715–721. http://www.refdoc.fr/Detailnotice?idarticle=14140782

Zhang, X., Peng, L. I. U., Yue-suo, Y., & Wen-ren, C. (2007). *Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes*. *19*, 902–909.

Zhou, J., Wan, H., Qin, S., He, J., Lyu, D., & Li, H. (2016). Net cadmium flux and gene expression in relation to differences in cadmium accumulation and translocation in four apple rootstocks. *Environmental and Experimental Botany*, *130*, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.012

Capítulo 2 Dinámica de la acumulación y potencial para fitorremediación de cadmio de las especies *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC, *Terminalia superba* Engl. & Diels, *Albizia guachapele* (Kunth) Dugand, *Cariniana pyriformis* Miers asociadas al cultivo de cacao.

Dinámica de la acumulación y potencial para fitorremediación de cadmio de las especies *Tabebuia rosea (Bertol.) DC, Terminalia superba Engl. & Diels, Albizia guachapele (Kunth) Dugand*, *Cariniana pyriformis Miers* asociadas al cultivo de cacao.

Donald A. Galvis [1 2 3,] Yeirme Y. Jaimes [1], Fabricio E. Carvalho [1], Rosalba Ruiz [2], Jairo Rojas [1,]

RESUMEN

T.cacao se ha utilizado en todo el mundo para la producción de chocolates y productos derivados. Por considerarse una planta umbrófila, su cultivo en Sudamérica se desarrolla asociandola a sistemas agroforestales (SAF), considerándose también como como una alternativa que aporta numerosos servicios ambientales. Sin embargo, recientemente ha surgido una preocupación por la acumulación de cadmio (Cd) en granos de cacao, dado que este metal se encuentra naturalmente en muchos suelos de origen volcánico en America del Sur, especialmente en la región andina. El sistema agroforestal del cacao presenta una gran diversidad de especies acompañantes al cultivo, éstas pueden presentar una variación sustancial en la y potencial de bioacumulación de Cd, por esto, la elección de especies forestales acompañantes puede desempeñar un papel de fitoremediación importante en el ciclo del Cd de los suelos contaminados. Para valorar esta variabilidad, cuatro especies forestales comúnmente empleadas en modelos SAF de Colombia (*Tabebuia rosea (Bertol.) DC, Terminalia superba Engl. & Diels,*

[1] Centro de Investigación La Suiza, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Rionegro, Santander (Colombia).

[2] Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Básicas. Montería, Córdoba (Colombia)

[3] Autor para correspondencia: dgalvis@agrosavia.co

Albizia guachapele (Kunth) Dugand, Cariniana pyriformis Miers), se sometieron a contaminación creciente de Cd (0, 6 y 12 ppm) sobre sustrato hidropónico durante 90 días para evaluar la dinámica de crecimiento, tolerancia y eficiencia en la acumulación del metal.

T. rosea y *C. pyriformis* revelaron ser las especies con la mayor eficiencia en la translocacion del metal, demostrando que son plantas que activan el mecanismo de translocacion y exportan intensamente el metal hacia las partes aereas, pero al someterse a una acomulacion progresiva revelaron una restrición considerable de su crecimiento exhibiendo los valores mas bajos de tolerancia de las especies en estudio. La tolerancia de *T. superba* y *A. guachapele*, indicados por el alto rendimiento en biomasa y acomulación de Cd en tejidos aereos, al ser sometidas a los dos niveles de contaminacion de Cd, sugieren un alto potencial para restaurar los suelos contaminados con Cd, demostrando resultados similares a los reportados por las especies forestales hiperacomuladoras *Populus sp y Salix sp.* Estudios complementares futuros aún se hacen necesarios para evaluar la efectividad de esas especies maderables dentro de sistemas agroflorestales de cacao complejos.

***Palabras clave*:** Sistemas agroforestales (SAF); mecanismos de exclusión; metales pesados; cadmio; Fitorremediación; *Theobroma cacao*

ABSTRACT

T. cocoa has been used throughout the world to produce chocolates and derived products. Because it is considered an umbrophilic plant, its cultivation in South America is developed by associating it with agroforestry systems (AFS), also being considered as an alternative that provides numerous environmental services. However, a concern has recently arisen about the accumulation of cadmium (Cd) in cocoa beans, since this metal is found naturally in many soils of volcanic origin in South America, especially in the Andean region. The cacao agroforestry system presents a great diversity of species accompanying the cultivation, these can present a substantial variation in the and potential of bioaccumulation of Cd, for this reason, the choice of forest companion species can play an important role of phytoremediation in the cycle of the Cd of contaminated soils. To assess this variability, four forest species commonly used in AFS models from Colombia (*Tabebuia rosea (Bertol.) DC, Terminalia superba Engl. & Diels, Albizia guachapele (Kunth) Dugand, Cariniana pyriformis Miers*), were subjected to increasing Cd contamination (0, 6 and 12 ppm) on hydroponic substrate for 90 days to evaluate growth dynamics, tolerance, and efficiency in metal accumulation.

T. rosea and C. pyriformis revealed to be the species with the highest efficiency in metal translocation, showing that they are plants that activate the translocation mechanism and intensely export the metal to the aerial parts, but when subjected to progressive accumulation they revealed a considerable restriction of its growth exhibiting the lowest tolerance values of the species under study. The tolerance of *T. superba* and *A. guachapele*, indicated by the high yield in biomass and accumulation of Cd in aerial tissues, when subjected to the two levels of Cd contamination, suggest a high potential to restore soils contaminated with Cd, demonstrating results similar to those reported by the hypercomulatory forest species *Populus sp* and *Salix sp*.

Future complementary studies are still necessary to evaluate the effectiveness of these timber species within complex cacao agroforestry systems.

Keywords: Agroforestry systems (AFS); exclusion mechanisms; heavy metals; cadmium; phytoremediation; *Theobroma cacao*.

INTRODUCCIÓN

En Colombia existen alrededor de 188.722 hectáreas de cacao cultivadas por 65.341 familias productoras , con bajos niveles de tecnificación y productividad, ubicados en zonas económicamente deprimidas y en muchos casos de difícil orden público, en donde se ha usado como alternativa de sustitución de cultivos ilícitos (MADR, 2020), considerándose por la presidencia colombiana en 2016 como el cultivo de la paz del país. Según la federación de cacaoteros de Colombia (Fedecacao, 2020) el cacao en Colombia se cultiva en su mayoría bajo sistemas agroforestales (SAF), sin embargo, no hay evidencia de la participación real en superficie de dichos sistemas en la cultura cacaotera colombiana.

La composición florística en estos sistemas está determinada por el tipo de sombra y por el arreglo que se les confiera, éstas a su vez varían en la relación de la estructura con la proporción y diversidad de la sombra del arreglo, afectando las condiciones ambientales del cultivo, así como la dinámica hídrica del sistema. Las especies forestales más utilizadas en los doseles de sombra en plantaciones de cacao en Camerún son *T. superba, S. campanulata, y A. adianthifolia* (Sonwa et al., 2007). Mercedes Ordoñez & Rangel-Ch (2020) reporta una composición florística abundante en una zona productora de cacao de Colombia, dominada por las especies forestales en orden de predominancia *A. guachapele, E. poeppigiana, G. arborea, y C. alliodora*.

Por otro lado, la Corporación Colombiana Agropecuaria (Agrosavia) ha venido promoviendo una oferta tecnológica que asocia el modelo agroforestal de cacao con especies maderables finas tropicales, allí se evalúan especies como *T. grandis, S. macrophylla, T. rosea y H. brasiliensis , C. pyriformis* (Mejía & Palencia, 2003) por su potencial uso en el SAF. Agudelo-Castañeda et al (2018) recientemente reportó ventajas en el uso de *C. pyriformis* sobre las otras

especies al permitir al cacao mantener actividad fotosintética constante durante la época seca y húmeda -del periodo productivo. Además, el cultivo de cacao bajo sistema agroforestal destaca su importancia por su aporte ambiental, ofreciendo servicios ambientales importantes como la fijación de CO_2 atmosférico, conservación de suelos y aumento de la fertilidad (Mejía & Palencia, 2003; Marín Q et al., 2016).

Es de resaltar los reconocimientos internacionales obtenidos por Colombia en el ámbito internacional, el International Cocoa Awards del "salón du chocolat", otorgó premios importantes "Cocoa of Excellence" (CoEx) en los años 2010, 2011,2015 y 2019, dejando bien ubicado al cacao colombiano, moviendo la balanza comercial de manera positiva, incrementando la demanda de países con mercados importantes como México, Malasia Bélgica, EE. UU, Argentina, Holanda e Indonesia, superando las nueve mil toneladas exportadas para el año 2019 (MADR, 2020). Sin embargo, pese a tener un aumento en la demanda y a las grandes posibilidades de fomento del cultivo, paralelamente se han incrementado las exigencias de calidad, dentro de estas lo referente a los contenidos de Cd-, limitando su exportación.

La exposición al Cd afecta la salud humana, animal y de plantas. En humanos, se reportan lesiones en el embarazo, irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos, daños renales, enfisema, y cáncer pulmonar (Antoine et al., 2017; Amadi et al., 2017). En plantas generalmente conduce a sufrir estrés oxidativo y fitotoxicidad (Benavides et al., 2005) como resultado de que el Cd reemplaza a otros elementos esenciales (Ca, Fe, Mg y Zn) en las enzimas, que generalmente pierden su función (Clemens, 2006; Verbruggen et al., 2009; Küpper & Andresen, 2016). El estrés oxidativo tienen cómo consequecias directas, la reducción en la fotosíntesis, la absorción de agua y la absorción de nutrientes y, en consecuencia, se observa clorosis, inhibición del crecimiento, pardeamiento de las puntas de las raíces y, finalmente, en casos extremos la muerte (Yadav et al., 2009).

Los estudios desarrollados sobre el Cd en el grano de cacao reflejan un panorama preocupante para el desarrollo del cultivo en la región, uno de éstos revela que la concentración de Cd de América del Sur fue casi tres veces mayor que en los de América Central y África Oriental y diez veces superior a la de África Occidental reportada por Bertoldi et al., en el año 2016 (Argüello et al., 2019). Ese análisis sugirió que las altas concentraciones generalizadas de Cd en América del Sur y en América Central podrían ser de origen geogénico, sin relación con la contaminación antropogénica.

Colombia no es ajena a esta situación, y existe preocupación por el futuro de las exportaciones del cacao y sus derivados, debido a los lineamientos de la Comunidad Europea, con respecto a los niveles de Cd (Contam EFSA, 2014). En análisis realizados a granos de cacao en cultivos ubicados sobre municipios cacaoteros del departamento de Santander, Colombia se encontró que el 57 % de las muestras colectadas presentan niveles que superan los máximos establecidos por la Comunidad Europea (Pabón et al., 2014) .

Para eliminar el Cd de las áreas contaminadas, se han aplicado con éxito técnicas no convencionales que involucran procesos biológicos. Como caso particular, se usa la tecnología de fitoextracción, buscando aprovechar la capacidad de algunas plantas para eliminar metales pesados del suelo y acumularlos en las partes cosechables (Raskin et al., 1997; Padmavathiamma & Li, 2007). Esta tecnología es menos costosa y perjudicial para el medio ambiente que los sistemas de remediación convencionales (Pilon-Smits, 2005), además de que posibilita la producción de biomasa, pudiendo utilizarla como fuente de energía y obtención de otros productos como la madera.

La eficiencia de la fitoextracción depende en gran medida de la biodisponibilidad del metal presente en la matriz contaminada, así como de características propias de la naturaleza de la

planta, como la capacidad translocar metales efectivamente desde sus raíces hacia los tejidos aéreos, la capacidad de hiperacumular metales esenciales y no esenciales, tener un rápido crecimiento y poseer un sistema de raíces extenso y profundo (Dahmani-Muller et al., 2000). La investigación en cuanto a remediación de metales pesados utilizando árboles forestales, ha reportado que la tecnología podría ser más efectiva que en las especies herbáceas o arbustivas hiperacumuladoras, debido a que se desarrolla un mayor rendimiento en la producción de biomasa,(Greger & Landberg, 1999; Fischerová et al., 2006a).

Algunos estudios han centrado su atención en la potencialidad de los sauces y álamos en la fitoextracción ((Punshon & Dickinson, 1999; Laureysens et al., 2004; Dickinson & Pulford, 2005; Kuzovkina & Quigley, 2005). De hecho, se reporta que algunas especies de la familia Salicaceae no solo están adaptadas a condiciones de suelo extremas, sino que también son capaces de acumular metales pesados (Pulford & Watson, 2003). De la misma manera, (Dickinson & Pulford, 2005) reportan que clones de *Salix alba* L podrían ser utilizados en un método eficaz y rentable para eliminar la contaminación por Cd del suelo agrícola.

Dado que existe una amplia variación en la absorción y acumulación de metales pesados, incluido el Cd, no solo entre diferentes especies de plantas sino también a menudo entre diferentes genotipos o variedades de la misma especie (Broadley et al., 2001; Laureysens et al., 2004) la hipótesis soportada en ésta investigación es que también las especies maderables evaluadas tienen variación significativa en la acumulación de Cd contribuyendo en diferentes escalas sobre el ciclo del Cd del SAF con cacao. Para verificar el potencial de las especies forestales con fines de fitoextracción de Cd, se realizaron experimentos hidropónicos sometiendo a las plantas a contaminación con concentración creciente de Cd. El objetivo de este trabajo es evaluar la tolerancia, respuesta a la acumulación y translocación de Cd en cuatro especies forestales *T. rosea, T. superba, A. guachapele, C. pyriformis*, comúnmente asociadas al SAF de

cacao, permitiendo caracterizar las especies conforme a su respuesta fisiológica a la exposición del metal, identificando el aporte al ciclo del metal traza en el sistema agroforestal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área experimental

Las plantas se cultivaron bajo condiciones de invernadero en el centro de investigación de Agrosavia “la Suiza” ubicado en el municipio de Rionegro, departamento de Santander; (N 7° 22’12”) (W - 73° 10’39”). Ubicada a 530 msnm bajo luz solar natural a una temperatura promedio de 25 ± 4°C y a una densidad de flujo fotónico fotosintético promedio de 1390±534 µmol m^{-2} s^{-1} al mediodía.

Desarrollo del experimento hidropónico

Se utilizaron semillas certificadas de las especies forestales *T. rosea, T. superba, A. guachapele, C. pyriformis* procedentes del productor de semillas forestales “El semillero S.A.S”. Estas semillas se sometieron a germinación y desarrollo durante 60 días en turba *sphagnum* dispuesta en bandejas plásticas. Luego se estableció un sistema hidropónico donde se cultivaron las plantas hasta que alcanzaron seis meses de edad. Las plántulas se transfirieron a recipientes de plástico de 30 L que contenían la solución de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) en donde se mantuvieron durante 180 días. Mediante un equipo oxigenador tipo blower con capacidad de 3 L/h se mantuvo una concentración de oxígeno disuelto en el medio entre 9 a 11 ppm, recomendada para la mayoría de las especies cultivadas en hidroponía (Santos & Ríos, 2016).Se controlaron diariamente las variables de pH, Conductividad eléctrica y solidos disueltos totales (TDS) mediante el uso del medidor multiparámetro Hanna Hi98129. El pH se controló mediante

la aplicación del aditivo ácido fosfórico (H_3PO_4) y como aditivo básico se utilizó el hidróxido de potasio (KOH), permitiendo desarrollar el experimento en condiciones de pH neutro en un intervalo de 5,8 a 6,2. Los sólidos disueltos totales (TDS) indicaron las necesidades de fertilización del sustrato, siempre manteniéndolo entre 1500 y 2000 ppm. La conductividad eléctrica se mantuvo entre 1 a 2 dS/m, valor recomendado para la mayoría de las especies según Santos & Ríos, (2016).

Se empleó la solución nutritiva de Hoagland como tratamiento control y dos tratamientos con solución nutritiva de Hoagland contaminada con concentraciones de Cd, 6 y 12 ppm. La adición de las concentraciones de Cd se realizó a los 90 días después de la siembra (dds) utilizando como fuente de cadmio el cloruro de cadmio (SIGMA-ALDRICH, $CdCl_2$, Cadmium chloride-99.99% trace metals basis.). Se realizaron cinco lecturas de parámetros de crecimiento efectuadas cada 30 días (60 dds hasta los 180 dds) y tres muestreos destructivos para determinar concentración de Cd ($mg.kg^{-1}$), en los tejidos de las plantas a los 30, 60 y 90 días después de la adición de las dosis de Cd.

Variables de crecimiento y contenido de cadmio

Se registraron parámetros fisiológicos de crecimiento a los 60 dds, 90 dds, 120 dds, 150 dds y 180 días dds. Estas variables corresponden a: Altura de la planta, diámetro basal y numero de hojas o foliolos totales. Se evaluó la concentración del metal pesado acumulado en raíces, tallo y hojas, esto se desarrolló en tres momentos mediante tres muestreos destructivos a los 120 dds, 150 dds y 180 días dds (30, 60, y 90 días después de aplicados los tratamientos de cadmio). Las plantas se cosecharon y se separaron la raíz, el tallo y las hojas. Las raíces se lavaron con agua presurizada para luego secar por 24 horas bajo sombra. Los tejidos se empacaron en bolsas de papel previamente rotuladas, se registró el peso húmedo y se llevó a

secado en horno por 48 h a 60°C para la determinación de la biomasa desarrollada por tratamiento. Posteriormente se realizó el envío al laboratorio de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) ubicado en Cundinamarca-Colombia. El método analítico utilizado para la cuantificación de cadmio fue mediante espectrometría de emisión atómica de plasma inductivamente acoplado, EPA Method 6010C (U.S EPA, 2018).

Para evaluar las relaciones de concentración de Cd, se siguió la metodología propuesta por Zayed et al (1998), en donde se determinaron los factores de concentracion del metal, factor de translocacion (TF), factor de bioconcentracion de la raiz (BCFR) y factor de bioconcentracion aerea (BCFA). Al tratarse de especies como comportamientos de crecimiento diferentes es importante evaluar la concentración de elementos en cada tejido de la planta con respecto a la biomasa generada, para esto si siguio la metodologia de Vysloužilová et al., (2003) permitiendo calcular el factor de remediación (Rf), que representa el porcentaje del metal eliminado en un tiempo y volumen determinado de sustrato. Es importante considerar en la selección de plantas para la fitorremediación, la tolerancia que éstas presenten a diferentes niveles de concentración, toda vez que no altere de manera significativa su metabolismo; para calcular la tolerancia al metal se sigue la metodología presentada por Wilkins,(1978), en donde presenta el índice de tolerancia (TI) contrastando la biomasa desarrollada de la planta sometida a niveles crecientes de concentración del contaminante con la biomasa del tratamiento control.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se dispuso bajo un diseño en bloques completamente al azar, en donde se emplearon 20 plantas por tratamiento con tres repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por 20 plantas, en donde se tomaron 3 plantas para mediciones de variables de crecimiento y nueve plantas para los muestreos destructivos por tratamiento. Los tratamientos

contemplados se definieron al tomar en cuenta al factor concentración de Cd con tres niveles (0 ppm, 6 ppm, 12 ppm), el primer nivel constituyó el tratamiento control que representa el medio hidropónico estándar presentando un contenido de Cd de 0,134 $mgKg^{-1}$.

Para la elaboración de gráficas y ajustes de mediante regresión lineal se utilizó el software SigmaPlot for Windows versión 14.0. Se realizaron análisis estadísticos para todos los parámetros evaluados utilizando el software IBM SPSS Statistics 21. Se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene, ($p < 0.05$) respectivamente. Por cada parámetro evaluado se realizó un ANOVA ($p \leq 0.05$) y cuando se detectaron diferencias significativas, se efectuó una prueba de comparación de medias Duncan ($p < 0.05$) para evaluar contrastes entre tratamientos.

RESULTADOS

La producción de biomasa, representada con la variable peso seco total, se vio afectada de manera significativa por los tratamientos con Cd en las cuatro especies forestales. El desarrollo de biomasa en el tratamiento control, demostró que *A. guachapele* presentó el mejor desarrollo, produciendo 14,7 gr de biomasa total (Figura 1) a una tasa relativa de crecimiento (TRC) de 0,022 $g.g^{-1}dia^{-1}$, seguido por *T. superba, T. rosea* y *C. pyriformis,* ésta última desarrollando 2,82 g de biomasa total a una TRC de 0,008 $g.g^{-1}dia^{-1}$ (Figura 3). Todas las especies forestales revelaron afectación en el crecimiento bajo la exposición de Cd cuando fueron sometidas a la concentración de 6 ppm. *C. pyriformis* revelo la mayor afectación por esta concentración de sustrato, infiriendo una reducción en su crecimiento del 74 %, de igual manera registró los valores más altos de afectación en el crecimiento junto con *T. rosea cuando* fueron sometidas a una concentración de Cd en sustrato de 12 ppm, presentando una inferencia en el

crecimiento de 98 % y 100 % respectivamente. *T. superba* y *A. guachapele* al ser sometidas a una concentración de 6 ppm presentaron una reducción en el crecimiento relativamente baja (24% y 63%), de la misma manera revelaron la afectación más baja de las especies evaluadas cuando fueron sometidas al nivel de concentración 12 ppm (72 % y 67 %) (Figura 1).

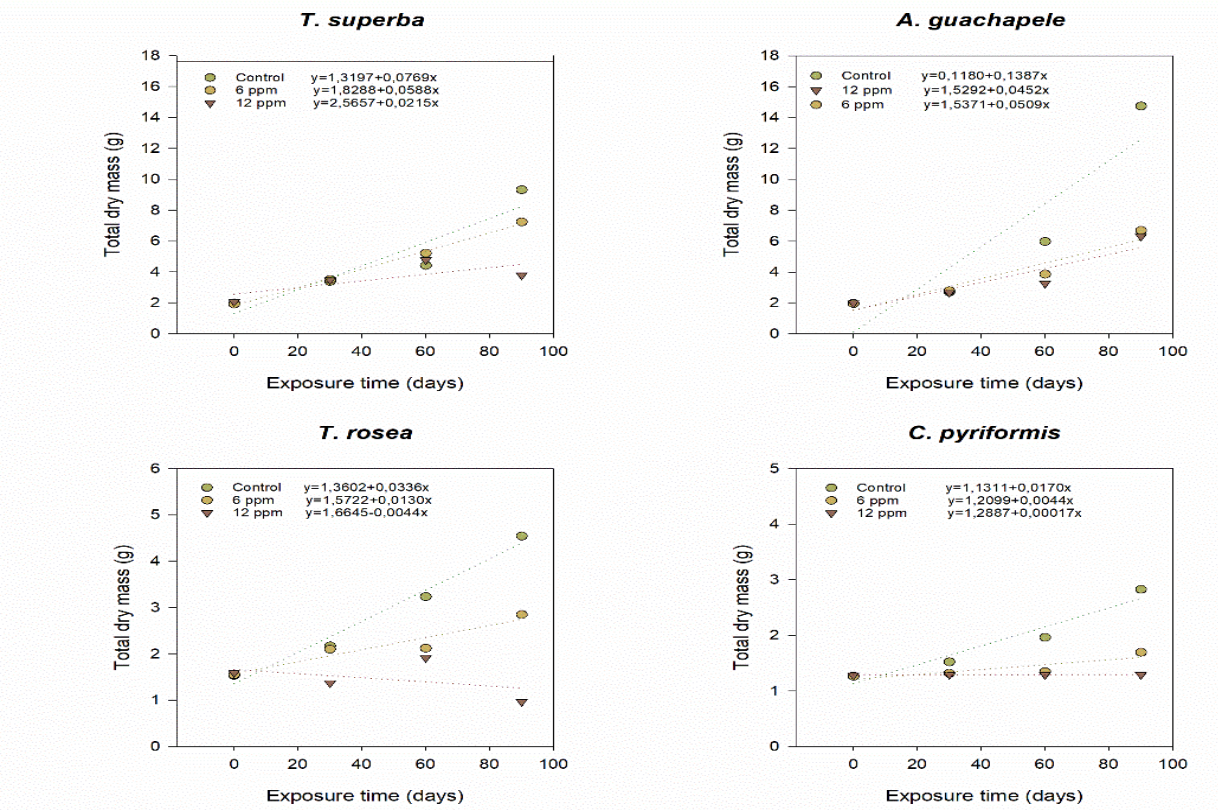

Figura 1. Biomasa total desarrollada por cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días.

La concentración de Cd en la parte aérea de la planta en las cuatro especies sobrepasó valores de 100 mg.kg $^{-1}$, siendo *T. superba* la que presentó un mayor valor de acumulación seguido por *A. guachapele*, *C. pyriformis* y *T. rosea* respectivamente (Figura 3). Una concentración en tejidos aéreos mayor a 100 mg.kg $^{-1}$, con tolerancia demostrable constituye un criterio adecuado para reconocer a una planta con comportamiento hiperacomulador de Cd (Baker & Reeves, 2000).

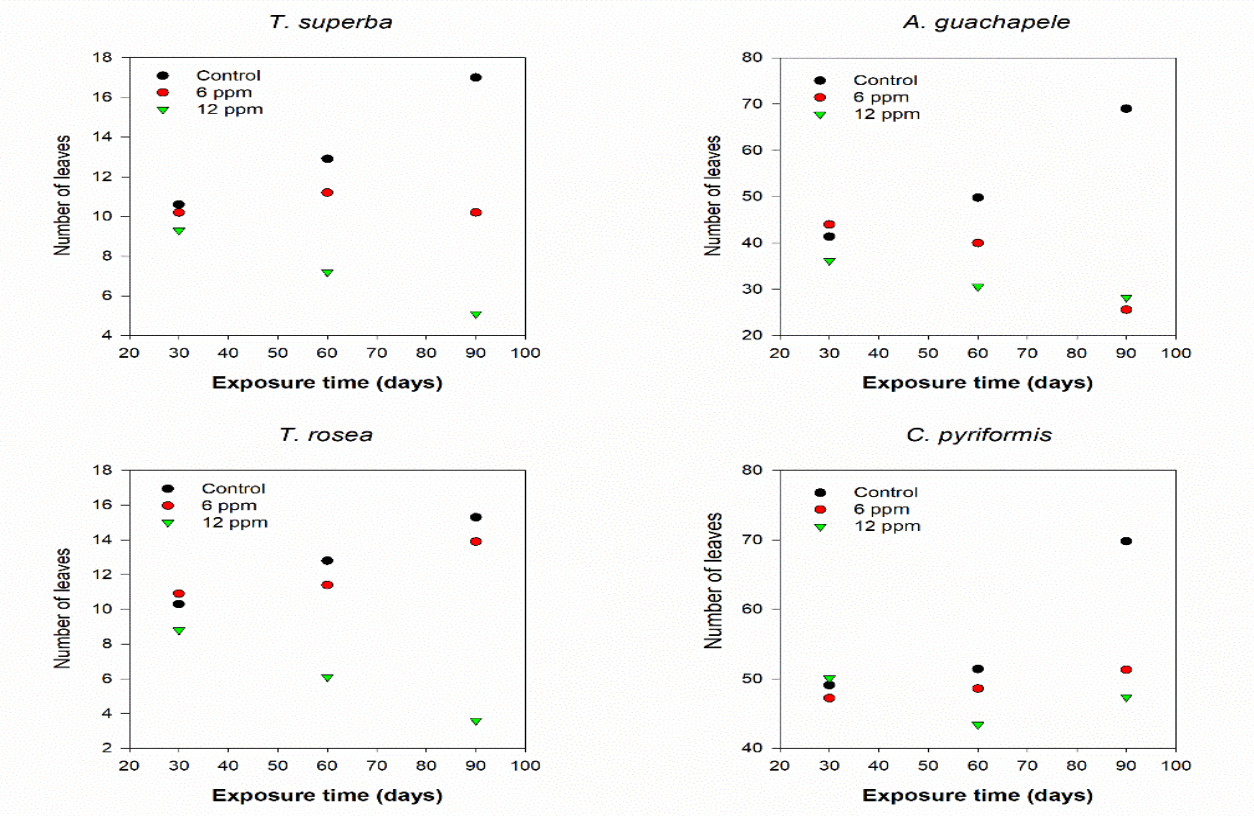

Figura 2. Número de hojas de cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días.

Al evaluar la interacción del factor concentración de sustrato con las variables de concentración de Cd en la raíz y en los tejidos aéreos, se evidencian diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre las especies con un comportamiento de acumulación diferente. La acumulación de Cd en raíces representó entre el 69 y el 88 % del Cd acumulado por las plantas de las especies forestales, siendo *A. guachapele y T. superba* las especies con la mayor tendencia de acumulación en este tejido, presentando los valores más altos de BCFR sin presentar diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) (Tabla 1), acumulando hasta 817,22 mg.kg $^{-1}$ y 776,15 mg.kg $^{-1}$de Cd en el nivel de contaminación 12 ppm. Del mismo modo *A. guachapele* también presentó la mayor acumulación de Cd en las hojas al ser sometida a una contaminación de 12 ppm (70,10 mg.kg $^{-1}$), *C. pyriformis* y *T. superba* reflejaron la mayor

tendencia de acumulación del metal en el tallo (130,92 mg.kg $^{-1}$ y 125,26 mg.kg $^{-1}$), desarrollando así el doble del valor al acumulado de las otras dos especies sometidas al valor más alto de contaminación del experimento (Figura 3). El factor de traslocación (TF), reveló que todas las especies estudiadas evidenciaron una baja eficiencia en la traslocación del metal, transportando menos del 10 % del metal presente en las raíces hacia la parte aérea de la planta (Tabla 1). De igual manera, es de destacar el comportamiento de las especies al ser sometidas a una concentración baja de Cd; a excepción de *A. guachapele*, todas las especies cuando fueron sometidas al tratamiento control (0,13 ppm), evidenciaron una alta eficiencia en la translocación del metal sin presentar diferencias significativas ($p<0.05$), llevando más del 30 % del metal acumulado en las raíces hacia la parte área.

Tabla 1. Factores de concentración (TF, BCFA, BCFR) de cuatro especies expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días.

	Treatment	TF	BCFR	BCFA
C. pyriformis	Control	0,30 ± 0,05 cd	55,72 ± 3,72 de	17,24 ± 2,24 d
	6 ppm	0,20 ± 0,04 bc	30,98 ± 4,92 ab	5,76 ± 0,67 a
	12 ppm	0,40 ± 0,04 d	30,24 ± 2,44 ab	11,79 ± 0,75 c
A. guachapele	Control	0,16 ± 0,06 ab	40,88 ± 5,91 bc	5,92 ± 1,52 a
	6 ppm	0,08 ± 0,00 ab	81,20 ± 8,08 f	6,76 ± 0,93 ab
	12 ppm	0,15 ± 0,01 ab	68,10 ± 3,23 e	9,96 ± 0,66 bc
T. rosea	Control	0,33 ± 0,06 cd	42,50 ± 2,55 bc	13,85 ± 2,78 c
	6 ppm	0,07 ± 0,02 ab	53,90 ± 5,77 cd	3,83 ± 1,08 a
	12 ppm	0,45 ± 0,04 d	23,43± 1,79 a	10,34 ± 0,35 bc
T. superba	Control	0,32 ± 0,03 cd	21,59 ± 2,65 a	6,92 ± 0,24 ab
	6 ppm	0,05 ± 0,00 a	85,37 ± 2,28 f	4,21 ± 0,07 a
	12 ppm	0,19 ± 0,00 b	64,68 ± 3,62 de	12,70 ± 0,77 c

a. Values are the mean ± SE (n = 3)
Significant differences among treatments are represented by different letters. Duncan's test, $p < 0.05$.

El TF más bajo entre todas las especies se obtuvo cuando fueron sometidas a una exposición moderada (6 ppm), siendo *C. pyriformis* la especie que transloca el metal con mayor eficiencia bajo este nivel (TF=0,20). Ésta misma especie, junto con el roble, representan también a las especies con mayor eficiencia en la translocación del metal bajo el nivel de contaminación 12 ppm, llevando hacia la parte aérea el 40 % del Cd acumulado en la raíz. La especie que se

destacó como la menos eficiente para la traslocación fue *A. guachapele* junto con *T. superba* en los dos niveles de contaminación, llevando hacia sus tejidos aéreos solo el 5 y 19 % del Cd acumulado por la raíz.

Según la clasificación propuesta por Lux et al., (2004), todas las especies estudiadas aquí, excepto *A. guachapele*, estarían definidas como altamente tolerantes, a un nivel de contaminación de 6 ppm (TI= > 60%), *A. guachapele* en los dos niveles de concentración se desarrolló como una especie moderadamente tolerante (TI= 35- 60%); igualmente en ésta misma clasificación estarían las demás especies en el nivel de contaminación 12 ppm, excluyendo a *T. rosea* , la cual es la única que se ubica dentro de las plantas sensibles por presentar un valor de TI menor a 35 % (Figura 3).

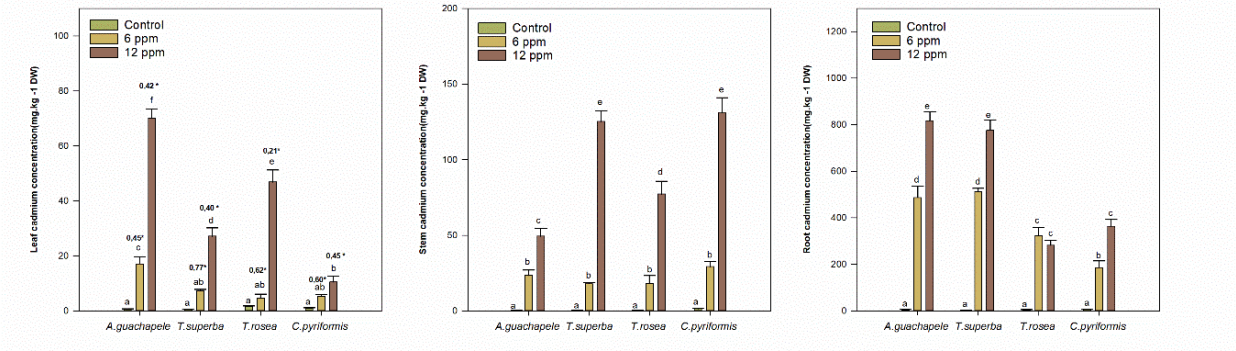

Figura 3. Concentración de cadmio en hojas, tallo y raíces de cuatro especies forestales expuestas a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$)

Es muy importante destacar que la variable de concentración de Cd en tejidos por sí sola, no genera un instrumento de juicio para concluir sobre la capacidad efectiva de la especie en términos de extracción y acumulación del metal, toda vez que se trata de especies que tienen comportamientos de crecimiento diferentes (Figura 1). Por esto, es importante considerar la biomasa generada por la especie en contraste de la acumulación del metal durante los 90 días de exposición, así como el factor de remediación (Rf) de cada especie. Siendo así, *A. guachapele*

sigue siendo la especie más efectiva en la acumulación pese a su afectación significativa en la biomasa, contrario al comportamiento de *T. rosea* y *C. pyriformis* que a pesar de que reveló acumular altas concentraciones de Cd, presumiendo una alta capacidad de translocación del metal, demostró acumular una cantidad de Cd por biomasa producida muy baja en los dos niveles de contaminación, presentando un valor de factor de remediación 4 y 11 veces menor que *A. guachapele* respectivamente. (Figura 4).

DISCUSIÓN

El deterioro del crecimiento es un efecto típico de la toxicidad del Cd, el desarrollo foliar y los rendimientos de materia seca disminuyeron a medida que aumentaba la concentración de Cd, probablemente como un efecto de la redución en la absorción de agua y nutrientes, la fotosíntesis, la acumulacion de energia y el metabolismo de carbono y nitrógeno en las plantas (Pietrini et al., 2003). El desbalance energetico entre el aporte de energia fotoquimica y su consumo en los procesos anabolicos, como efecto indirecto del exceso de Cd, está intrinsicamente asociado con la acumulación en especies reactivas de oxigeno (EROS) (El Rasafi et al., 2020). Además, para mantener bajos niveles de EROS y mitigar la ocurencia de la senescencia foliar inducida por Cd, las plantas necesitan invertir grandes aportes de energia en los procesos de defensa, especialmente relacionados con el metabolismo del glutatión y la síntesis de fitoquelatinas (Liang et al., 2016), generando competencia directa con los procesos implicados en el crecimiento de plantulas, similar a el observado para otras condiciones influenciadas por estres abiótico. Asi mismo, el daño ejercido por el Cd a nivel de la hoja es un aspecto importante por evaluar en plantas seleccionadas para el trabajo con metales pesados, toda vez que un aparato fotosintético eficiente permite a las plantas mantener un flujo de transpiración efectivo que impulsa los metales desde las raíces hasta las partes aéreas. La

pérdida de biomasa reportada en la Figura 1 por *T. rosea y T. superba* obedece a un proceso de senescencia drástica de las hojas maduras de la planta al ser sometidas a una concentración de sustrato de 12 ppm, reduciendo la cantidad de hojas por planta hasta un 69% y 76 % respectivamente (Figura 2). Las especies *C. pyriformis* y *A. guachapele,* tuvieron una afectación constante en respuesta a los diferentes niveles de concentración de Cd en el sustrato, presentando una reducción cercana al 30 % para y el 60 % para el *A. guachapele* respectivamente. En todas las especies se revelaron síntomas de clorosis y necrosis en hojas maduras para el tratamiento con la dosis de 12 ppm, además de presentarse la mortalidad del 10 % de las plantas para la especie. *T. rosea y C. pyriformis.*

Por otro lado, la tendencia en la acumulación de Cd en diferentes tejidos en las especies evaluadas fue similar a la reportada en especies forestales como *Salix* spp, *S.macrophylla, S.viminalis y T. caerulescens* (Wieshammer et al., 2007*;* Vysloužilová et al., 2003*;* Fan et al., 2011; Klang-Westin & Eriksson, 2003), la concentración de Cd fue mayor en raíz seguido por el tallo y hojas, y su concentración en todos los tejidos de la planta aumentó significativamente ($p < 0.05$) a medida que aumentaron los niveles de Cd sobre el tiempo (Figura 2).

La concentración aérea de Cd en las especies evaluadas, al estar sometidas al nivel de 6 ppm de contaminación no difirió de las especies de *Populus sp* y de *Salix sp* (Fischerová et al., 2006b; Wieshammer et al., 2007) en éste mismo nivel de contaminación. Se destaca entonces la alta capacidad de remediación de *A. guachapele y T. superba* , presentando valores de Rf más altos (Figura 4) que los reportados en especies hiperacomuladoras *Populus sp* y de *Salix sp* (Fischerová et al., 2006b), resaltando a su vez que *A. guachapele y T. superba* presentan mayor tasa de crecimiento que las especies en referencia al ser sometidas a contaminación por Cd. De la misma manera Fan et al (2011) reporta que *S. Macrophylla* presenta un RGR en el tratamiento control similar a *A. guachapele y T. superba* (Figura 3), además de evidenciar una

concentración aérea aún más alta Sin embargo, también se reporta una reducción a la mitad del RGR cuando estas especies son sometidas a una contaminación de 7,5 ppm y 15 ppm, difiriendo de *A. guachapele y T. superba* que revelaron una reducción en RGR de apenas 40 % y el 14 %, respectivamente, en el nivel de contaminación de 6 ppm.

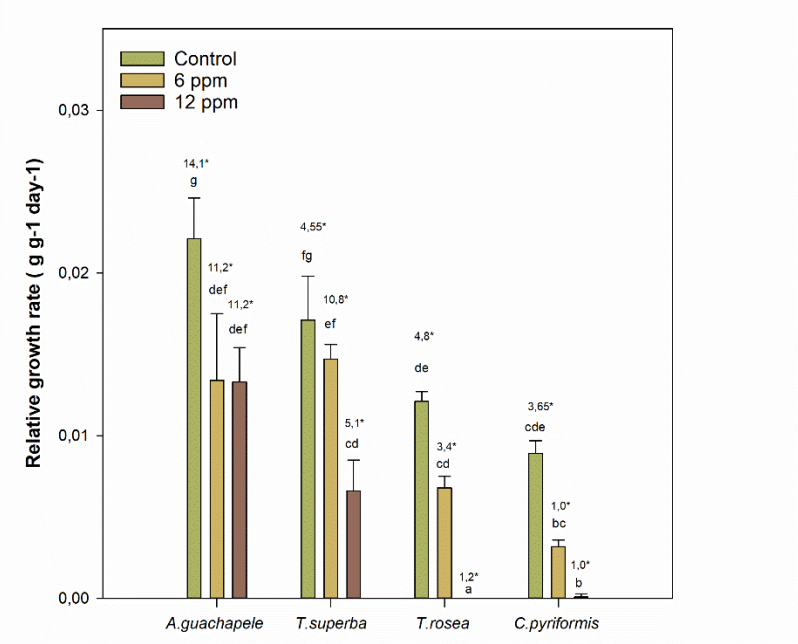

Figura 4. Tasa relativa de crecimiento de cuatro especies forestales expuestas a a niveles crecientes de contaminación por Cd durante 90 días. Valores de la media con letras diferentes al control muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). * Factor de remediación

Las especies forestales incluidas dentro del SAF con cacao, no tienen ninguna practica de manejo dirigida hacia la fitorremediación en los cultivos en Colombia, por esto existe la probabilidad de que las especies forestales evaluadas dentro del presente estudio podrían estar influyendo en gran medida sobre el reciclaje del Cd extrayéndolo de horizontes del suelo profundos a los cuales no avanzan las raíces del *T.cacao* permitiendo la acumulación en horizontes menos profundas. *A. guachapele y T. superba* demuestran tener una alta y moderada capacidad en la fitorremediación de suelos contaminados con Cd, éstos podrían tener un mayor impacto en el reciclaje del metal, pero por presentar altas tasas de senescencia foliar natural,

aportando al suelo 1.780 y 4,547 ton ha^{-1} $año^{-1}$ de hojas respectivamente (Sánchez Fonseca et al., 2008).

Cuando se habla del reciclaje de Cd dentro de los sistemas de producción de *T.cacao* se otorga un peso fuerte al aporte de la hojarasca y las vainas de frutos que se dejan en el lote en el momento de la cosecha, ya que representan contenidos de Cd considerables (Huamaní-Yupanqui et al., 2012b; Barraza et al., 2017). A pesar de que esos materiales presentan una gran importancia para el ciclaje de carbono y nutrientes minerales, es también un factor alarmante los contenidos de Cd presumiblemente alocados en hojas senescentes de algunas especies hiperacumuladoras. Relacionando los contenidos de Cd en hojas de *T. cacao* (Lewis et al., 2018*;* Arévalo-Gardini et al., 2017) y las especies forestales evaluadas, se presentan contenidos mucho más altos en dichas especies forestales, por lo tanto, hay que empezar a considerar el aporte de las especies acompañantes del SAF con *T.cacao* en el ciclo del Cd del sistema.

CONCLUSIONES

La concentración y los factores de concentración de Cd en los brotes y la alta tolerancia observada en *T. superba* y *A. guachapele* al ser sometidas a sustratos con 6 ppm de contaminacion con Cd indican que estas tienen un alto potencial para restaurar los suelos contaminado. Sin embargo, el uso de estas especies para la fitoextracción podria tener una desventaje sobre el reciclaje del metal por su naturaleza caducifolia (Mertens et al., 2004). De hecho, entre estas dos especies, *T. superba* es la que tiene el menor contenido de Cd en las hojas, por lo que tendría el menor efecto potencial de disponer este metal en los suelos activando la senescencia foliar. Sin embargo, considerando la alta incidencia de este fenómeno en condiciones de alta exposicion con Cd (12 ppm), que se encuentran en algunas regiones de

Colombia (Bravo et al., 2021), se debe tener precaución con el uso de esta especie en SAF asociado al cacao. Por otro lado, si estas especies se cultivan en zonas de moderada contaminación, de manera adecuada dentro del SAF-cacao con el proposito de secuestrar Cd, programando cosechas de tejidos y retiro de hojas senecentes con frecuencia se podria tener éxito en la reduccion del Cd disponible en el suelo para el cacao y por consiguiente se reduciria la concentración en grano.

Por lo tanto, considerando todas las respuestas discutidas en ese presente estudio, *A. guachapele* es la especie que presenta el mejor rendimiento en biomasa y en acomulación de Cd en tejidos aereos al ser sometida a los dos niveles de contaminacion de Cd, presentando un factor de remediación mayor en comparación con las especies *Populus sp y Salix sp*, communmente reportadas como hiperacomuladoras (Fischerová et al., 2006b) y con una tolerancia aceptable al estrés por la exposición al metal. Sin embargo, estudios futuros aún se hacen necesarios para que se confirmen mediante ensayos de rendimiento en campo, los resultados aquí obtenidos en condiciones hidropónicas.

Agradecimientos

Los autores expresan gratitud con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) y a la Universidad de Cordoba por suministrar los recursos necesarios para el desarrollo del experimento.

Conflicto de intereses

El manuscrito fue realizado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

REFERENCIAS

Agudelo-Castañeda, G. A., Cadena-Torres, J., Almanza-Merchán, P. J., & Pinzón-Sandoval, E. H. (2018). Desempeño fisiológico de nueve genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo la sombra de tres especies forestales en Santander, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *12*(1), 223–232. https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7341

Amadi, C. N., Igweze, Z. N., & Orisakwe, O. E. (2017). Heavy metals in miscarriages and stillbirths in developing nations. *Middle East Fertility Society Journal*, *22*(2), 91–100. https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.03.003

Antoine, J. M. R., Fung, L. A. H., & Grant, C. N. (2017). Assessment of the potential health risks associated with the aluminium, arsenic, cadmium and lead content in selected fruits and vegetables grown in Jamaica. *Toxicology Reports*, *4*(March), 181–187. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.03.006

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, *605–606*(2017), 792–800. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122

Argüello, D., Chavez, E., Lauryssen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, *649*, 120–127. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292

Baker, A. J. M., & Reeves, R. D. (2000). Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean

the Environment. *Journal of Plant Biotechnology*, *1*(1), 304.

Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, *229*, 950–963. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080

Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 21–34. https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans and cocoa products. *Food Control*, *65*, 46–53. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*, *11*(4), 761. https://doi.org/10.3390/agronomy11040761

Broadley, M. R., Willey, N. J., Wilkins, J. C., Baker, A. J. M., Mead, A., & White, P. J. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytologist*, *152*(1), 9–27. https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00238.x

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, *88*(11), 1707–1719. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003

Contam EFSA. (2014). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, *9*(2), 10–14. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975

Dahmani-Muller, H., Van Oort, F., Gélie, B., & Balabane, M. (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, *109*(2), 231–238. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00262-6

Dickinson, N. M., & Pulford, I. D. (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice Salix: The evidence trail. *Environment International*, *31*(4), 609–613. https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.013

El Rasafi, T., Oukarroum, A., Haddioui, A., Song, H., Kwon, E. E., Bolan, N., Tack, F. M. G., Sebastian, A., & Rinklebe, J. (2020). Technology Cadmium stress in plants : A critical review of the effects , mechanisms , and tolerance strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *0*(0), 1–52. https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835435

Fan, K. C., Hsi, H. C., Chen, C. W., Lee, H. L., & Hseu, Z. Y. (2011). Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (Swietenia macrophylla) seedlings for phytoextraction applications. *Journal of Environmental Management*, *92*(10), 2818–2822. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.032

Fedecacao, F. N. D. C. (2020). *fedecacao, 2020 El cultivo del cacao y su contribución al medio ambiente* (p. http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/20).

Fischerová, Z., Tlustoš, P., Jiřina Száková, & Kornelie Šichorová. (2006a). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. In *Environmental Pollution* (Vol. 144, Issue 1, pp. 93–100). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.005

Fischerová, Z., Tlustoš, P., Jiřina Száková, & Kornelie Šichorová. (2006b). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environmental Pollution*, *144*(1), 93–100. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.005

Greger, M., & Landberg, T. (1999). Use of willow in phytoexfraction. *International Journal of Phytoremediation*, *1*(2), 115–123. https://doi.org/10.1080/15226519908500010

Hoagland, D. R. ., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, *347*(2), 32. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257

Huamaní-Yupanqui, H. A., Huauya-Rojas, M. Á., Mansilla-Minaya, L. G., Florida-Rofner, N., & Neira-Trujillo, G. M. (2012). Presencia de metales pesados en cultivo de cacao [Theobroma cacao L.) orgánico. *Acta Agronomica*, *61*(4), 339–344.

Klang-Westin, E., & Eriksson, J. (2003). Potential of Salix as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant and Soil*, *249*(1), 127–137. https://doi.org/10.1023/A:1022585404481

Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, *8*(3), 269–285. https://doi.org/10.1039/c5mt00244c

Kuzovkina, Y. A., & Quigley, M. F. (2005). Willows beyond wetlands: Uses of salix L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution*, *162*(1–4), 183–204. https://doi.org/10.1007/s11270-005-6272-5

Laureysens, I., Blust, R., De Temmerman, L., Lemmens, C., & Ceulemans, R. (2004). Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I.

Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environmental Pollution*, *131*(3), 485–494. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.02.009

Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in Theobroma cacao L. *Science of the Total Environment*, *640–641*, 696–703. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365

Liang, T., Ding, H., Wang, G., Kang, J., Pang, H., & Lv, J. (2016). Ecotoxicology and Environmental Safety Sulfur decreases cadmium translocation and enhances cadmium tolerance by promoting sulfur assimilation and glutathione metabolism in Brassica chinensis L . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *124*, 129–137. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.011

Lux, A., Šottníková, A., Opatrná, J., & Greger, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in Salix clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum*, *120*(4), 537–545. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0275.x

MADR. (2020). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.Cadena de valor de Cacao. In *Direccion de cadenas agrícolas y forestales*. https://sioc.minagricultura.gov.co

Marín Q, M. del P., Andrade, H. J., & Sandoval, A. P. (2016). Fijación de carbono atmosférico en la biomasa total de sistemas de producción de cacao en el departamento del Tolima, Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *19*(2), 351–360. https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n2.2016.89

Mejía, L. A., & Palencia, G. E. (2003). Una aproximacion a los sistemas agroforestales. In *Programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria*.

Mercedes Ordoñez, C., & Rangel-Ch, J. O. (2020). Composición florística y aspectos de la estructura de la vegetación en sistemas agroforestales con cacao (Theobroma cacao L. - Malvaceae) en el departamento del Huila, Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *44*(173), 1033–1046. https://doi.org/10.18257/raccefyn.1183

Mertens, J., Vervaeke, P., De Schrijver, A., & Luyssaert, S. (2004). Metal uptake by young trees from dredged brackish sediment: Limitations and possibilities for phytoextraction and phytostabilisation. *Science of the Total Environment*, *326*(1–3), 209–215. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.12.010

Pabón, M. G., Sepúlveda, W., & Herrera Roa, L. (2014). *Caracterización de la producción de cacao en Santander y análisis de la presencia de cadmio en suelos y cultivos*. http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/2441

Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, *184*(1–4), 105–126. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5

Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., & Massacci, A. (2003). Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology*, *133*(2), 829–837. https://doi.org/10.1104/pp.103.026518

Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, *56*, 15–39. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214

Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees

- A review. *Environment International*, *29*(4), 529–540. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6

Punshon, T., & Dickinson, N. (1999). Heavy metal resistance and accumulation characteristics in willows. *International Journal of Phytoremediation*, *1*(4), 361–385. https://doi.org/10.1080/15226519908500025

Raskin, L., Smith, R. D., & Salt, D. E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment Abbreviation EDTA ethylenediaminetetraacetic acid. *Current Opinion in Biotechnology*, 8221–8226.

Sánchez Fonseca, C., Lama, D., & Suatunce Cunuhay, P. (2008). Hojas Caídas Y Aporte De Nutrientes De Diez Especies Forestales Tropicales. *Ciencia y Tecnología*, *1*(2), 73. https://doi.org/10.18779/cyt.v1i2.105

Santos, B., & Ríos, D. (2016). *Cálculo de Soluciones Nutritivas En suelo y sin suelo*. http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_622_soluciones_nutritivas.pdf

Sonwa, D. J., Nkongmeneck, B. A., Weise, S. F., Tchatat, M., Adesina, A. A., & Janssens, M. J. J. (2007). Diversity of plants in cocoa agroforests in the humid forest zone of Southern Cameroon. *Biodiversity and Conservation*, *16*(8), 2385–2400. https://doi.org/10.1007/s10531-007-9187-1

U.S EPA, (United States Environmental Protection Agency). (2018). *“Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry,”: Vol. Revision 5*. https://www.epa.gov/esam/epa-method-6010d-sw-846-inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectrometry

Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation in plants. *Phytoremediation of Environmental Pollutants*, 99–116. https://doi.org/10.4324/9781315161549

Vysloužilová, M., Tlustoš, P., & Száková, J. (2003). Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of Salix spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant, Soil and Environment*, *49*(12), 542–547. https://doi.org/10.17221/4191-pse

Wieshammer, G., Unterbrunner, R., García, T. B., Zivkovic, M. F., Puschenreiter, M., & Wenzel, W. W. (2007). Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by Salix ssp. and intercropping of Salix caprea and Arabidopsis halleri. *Plant and Soil*, *298*(1–2), 255–264. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9363-9

Wilkins, D. A. (1978). the Measurement of Tolerance To Edaphic Factors By Means of Root Growth. *New Phytologist*, *80*(3), 623–633. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01595.x

Yadav, S. K., Juwarkar, A. A., Kumar, G. P., Thawale, P. R., Singh, S. K., & Chakrabarti, T. (2009). Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by Jatropha curcas L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresource Technology*, *100*(20), 4616–4622. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.062

Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants : I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, *27*(3), 715–721. http://www.refdoc.fr/Detailnotice?idarticle=14140782