

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MENCIÓN: AGRICULTURA SOSTENIBLE**



**ACUMULACIÓN DEL CADMIO EN PLANTONES DE *Theobroma cacao* (CACAO)
OBTENIDOS MEDIANTE ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS EN
CONDICIONES DE VIVERO.**

Tesis

Para optar el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS,
MENCIÓN: AGRICULTURA SOSTENIBLE**

PRESENTADO POR:

JORGE LUIS PAZ URRELO

ASESOR:

VICENTE SERAPIO POCOMUCHA POMA

Tingo María – Perú.

2025



“Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana”

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Nro. 001-2025-UP-FA-UNAS

En la ciudad universitaria, siendo las 9:00 a.m., del miércoles 12 de marzo de 2025, reunidos en la sala de audiovisuales de la Facultad de Agronomía, se instaló el Jurado Calificador a fin de proceder a la sustentación de la tesis titulada:

“ACUMULACIÓN DEL CADMIO EN PLANTONES DE *Theobroma cacao* (CACAO) OBTENIDOS MEDIANTE ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS EN CONDICIONES DE VIVERO”

A cargo del candidato al Grado de Maestro en Ciencias Agrícolas, mención: Agricultura Sostenible, Ing. **JORGE LUIS PAZ URRELO**.

Luego de la exposición y absueltas las preguntas de rigor, el Jurado Calificador procedió a emitir su fallo declarando **APROBADO** con el calificativo de **BUENO**.

Acto seguido, a horas 11:30 a.m. el presidente dio por culminada la sustentación; procediéndose a la suscripción de la presente acta por parte de los miembros del jurado, quienes dejan constancia de su firma en señal de conformidad.

.....
Dr. **JOSE WILFREDO ZAVALA SOLORZANO**
Presidente del Jurado

No asistió
.....
Dr. **HUGO ALFREDO HUAMANI YUPANQUI**
Miembro del Jurado

.....
M. Sc. **JAIME JOSSEPH CHAVEZ MATIAS**
Miembro del Jurado

.....
Dr. **VICENTE SERAPIO POCOMUCHA POMA**
Asesor





UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
DIRECCIÓN DE GESTIÓN DE INVESTIGACIÓN - DGI
REPOSITORIO INSTITUCIONAL - UNAS

Correo: repositorio@unas.edu.pe



“Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana”

CERTIFICADO DE SIMILITUD T.I. N° 157 - 2025 - CS-RIDUNAS

El Director de la Dirección de Gestión de Investigación de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, quien suscribe,

CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Investigación; aprobó el proceso de revisión a través del software TURNITIN, evidenciándose en el informe de originalidad un índice de similitud no mayor del 25% (Art. 3° - Resolución N° 466-2019-CU-R-UNAS).

Programa de Estudio:

Maestría en Ciencias Agrícolas Mención: Agricultura Sostenible

Tipo de documento:

Tesis

X

Trabajo de Suficiencia Profesional

TÍTULO	AUTOR	PORCENTAJE DE SIMILITUD
ACUMULACIÓN DEL CADMIO EN PLANTONES DE <i>Theobroma cacao</i> (CACAO) OBTENIDOS MEDIANTE ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS EN CONDICIONES DE VIVERO	JORGE LUIS PAZ URRELO	17 % Diecisiete

Tingo María, 28 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
UNIDAD DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Dr. Tomas Menacho Mallqui
JEFE

C.C. Archivo

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MENCIÓN EN AGRICULTURA SOSTENIBLE**



**ACUMULACIÓN DEL CADMIO EN PLANTONES DE *Theobroma cacao* (CACAO)
OBTENIDOS MEDIANTE ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS EN
CONDICIONES DE VIVERO**

Autor	: Jorge Luis Paz Urrelo.
Asesor	: Vicente Serapio Pocomucha Poma.
Área de investigación	: Ciencias Agrícolas.
Línea de investigación	: Propagación de plantas y sistemas de producción agrícola.
Eje temático	: Acumulación del cadmio en órganos de plantas de cacao propagadas por enraizamiento de estaquillas.
Lugar de ejecución	: Distrito de Juan Guerra, Provincia de San Martín.
Duración	: Junio 2022 – Agosto 2023
Financiamiento	: S/. 15, 959.00

Tingo María – Perú. 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
VICERECTOR DE INVESTIGACIÓN
UNIDAD DE GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

FORMATO PARA REGISTRAR EL PROYECTO DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO

Universidad : Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Escuela de posgrado : EPG-UNAS

Posgrado : Maestría en Ciencias Agrícolas.

Mención : Agricultura Sostenible.

Título de Tesis : Acumulación del cadmio en plántones de *Theobroma cacao* (cacao) obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas en condiciones de vivero.

Objetivo General : Determinar la acumulación del cadmio (Cd) en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas en condiciones de vivero.

Autor : Jorge Luis Paz Urrelo

DNI : 43452379

Correo electrónico : jorge.paz@unas.edu.pe

Asesor de Tesis : Dr. Vicente Serapio Pocomucha Poma.

Área de Investigación : Ciencias agrícolas.

Grupo de Investigación : Plantas agrícolas, medicinales, ornamentales y florísticos.

Línea de investigación : Propagación de plantas y sistemas de producción agrícola.

Lugar de Ejecución : Distrito de Juan Guerra, Provincia de San Martín.

Fecha de inicio : Junio de 2022

Fecha de término : Agosto de 2023

Presupuesto : S/. 15, 959.00

Financiamiento : Propio (X) FIF () Externo ()

Según resolución N° 461-2023 R-UNAS y resolución N°295 2023 R-UNAS

DEDICATORIA

A Dios con toda la gratitud, que estuvo siempre a mi lado a pesar de las dificultades.

A mis queridos padres Esaú Paz y Enit Urrelo, ejemplos de sacrificio y bondad. A Emanuel Paz, mi motivación clave para seguir adelante a pesar de las adversidades, quien con su cariño y amor me impulsó a seguir con constancia. A Lucero Marinel Paz, por alegrar cada día de mi existencia con su cariño, ternura y sonrisa. A Matías Benjamín Paz, quien alegrará mis días por siempre. A Violeta por su apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

- Al Programa Nacional de Investigación Café y Cacao de la Estación Experimental Agraria El Porvenir, San Martín del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA.

- A Los docentes de la Universidad Nacional Agraria de la Selva – UNAS, en especial al Dr. Vicente Pocomucha Poma, por su aporte y asesoramiento en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

- A Los Miembros del jurado Dr. José Wilfredo Zavala Solórzano, presidente por su aporte en la corrección académica científica en base a las normas de redacción de la Universidad, al Dr. Hugo Huamaní Yupanqui y al M.Sc. Jaime Chávez Matías, por sus aportes y revisión del presente trabajo de investigación.

- A Sergio Vega por el soporte estadístico y sus atinadas sugerencias para el análisis y redacción del presente trabajo de investigación.

- A Edith Vela por el soporte constante en la parte ofimática para redacción del presente trabajo de investigación.

- A Todas las personas que contribuyeron directa e indirectamente con el desarrollo del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Descripción morfológica del cacao.	4
2.1.1. Clasificación taxonómica del cacao.....	4
2.1.2. Propagación asexual del cultivo de cacao: Estaquillas.....	5
2.2. Metales pesados: Cadmio (Cd).....	6
2.2.1. Fuentes de origen del Cd.	6
2.2.2. Mecanismos de transporte y efectos fitotóxicos del Cd.	7
2.3. Genotipos de cacao utilizados en el presente estudio.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Ubicación del experimento.	9
3.2. Equipos y materiales.....	9
3.3. Tipo y nivel de investigación.....	10
3.3.1. Diseño de investigación.....	10
3.3.2. Población y muestra.....	12
3.4. Metodología.....	12
3.4.1. Cuantificar la concentración de Cd en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.....	12
3.4.2. Determinar el factor de translocación del Cd en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.	36
3.4.3. Identificar plántulas de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas con menor capacidad de transporte de cadmio.....	37
3.4.4. Evaluar los efectos del Cd tanto a nivel morfológico como en los pigmentos de clorofila en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.	37
3.1. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

4.1.	Cuantificar la concentración de cadmio en plántones de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.....	43
4.1.1.	Concentración de cadmio en raíz, tallos y hojas.....	43
4.2.	Determinar el factor de translocación (FT) del cadmio en plántones de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.....	46
4.3.	Identificar plántones de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas con menor capacidad de transporte de cadmio	48
4.4.	Evaluar los efectos del Cd tanto a nivel morfológico como en los pigmentos de clorofila en plántones de <i>Theobroma cacao</i> obtenidos por enraizamiento de estaquillas.....	49
4.4.1.	Análisis de efectos del cadmio a nivel morfológico.....	49
4.4.1.1	Longitud de brote evaluado a los 40 y 168 ddt.....	49
4.4.1.2	Número de hojas evaluado a los 40 y 168 ddt.....	53
4.4.1.3	Número de raíces evaluado a los 168 ddt.....	56
4.4.2.	Análisis de efectos del cadmio en pigmentos de clorofila.....	58
V.	CONCLUSIONES	61
VI.	PROPUESTAS A FUTURO.....	62
VII.	REFERENCIAS.....	63
	ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Descripción de los tratamientos estudiados	11
2. Análisis de varianza.	11
3. Insumos aplicados durante la etapa de pre-aclimatación.	23
4. Temperatura y humedad del sustrato durante 10 días de solarización.....	26
5. Cálculo de la cantidad de $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ para las dosis de 6 y 12 ppm.	28
6. Registros del número de bolsas y cantidad (Kg) de sustrato en las dosis de Cd estudiados.....	31
7. Estándares de calibración.....	36
8. Escalas de Factor de translocación citado por (Pachura et al.; 2016).....	37
9. Concentración de Cd en órganos vegetales de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.....	43
10. Factor de traslocación (FT) del Cd de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.	46
11. Medias marginales del contenido de Cd (mg Kg^{-1}) en diferentes genotipos. R^2_m y R^2_c representan las proporciones de varianza explicadas por el efecto fijo (genotipo) y por el modelo mixto, respectivamente	48
12. Análisis de varianza para la variable Longitud de brote (cm) evaluada a los 40 y 168 ddt.....	49
13. Efecto principal para clones respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.....	50
14. Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.....	50
15. Longitud de brote (cm) en los diferentes tratamientos (clon x dosis), evaluados a los 168 ddt.....	51
16. ANVA para la variable Número de hojas evaluado a los 40 ddt y 168 ddt.	53
17. Efecto principal para clones respecto a la variable número de hojas, evaluada a los 40 ddt.....	54
18. Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.....	54
19. Efecto principal para clones respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 168 ddt.....	55

20.	Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 168 ddt.....	55
21.	Análisis de varianza para la variable Número de raíces evaluada a los 168 ddt.....	56
22.	Número de raíces en los diferentes tratamientos (clon x dosis), evaluado a los 168 ddt.....	57
23.	Concentración de Clorofila a, Clorofila b y clorofila total de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Imagen satelital de ubicación del vivero – Laboratorio de Biotecnología – EEA El Porvenir.....	9
2. Distribución de las unidades experimentales en el experimento.	12
3. Identificación de la parte apical de la estaca de cacao a colectarse.	13
4. Colecta de material vegetal de las estaquillas, a) clones THS 565, CCN 51, ICS 39 e IMC 67), b) Estaquillas de cacao con hojas cortadas en la parte medial, c) Disposición de estaquillas en bolsas negras, d) Acondicionamiento final para su transporte al vivero.....	14
5. Bandeja forestal conteniendo tubetes con capacidad de albergar a 54 estaquillas	15
6. Desinfección de tubetes, a) Disolución de detergente, b) Lavado de tubetes en solución de detergente y agua, c) Dilución de NaClO al 5 % en agua, d) Lavaje de tubetes en solución de NaClO al 5 % y agua.	15
7. Elaboración de sustrato, a) Sustrato premix, b) Fibra de coco, c) Adición de premix en bandeja, d) Adición de fibra de coco en bandeja, e) Mezcla de premix y fibra de coco, f) Adición de agua a la mezcla de sustrato (premix y fibra de coco).	16
8. Sustrato homogenizado dispuesto en bandejas forestales (tubetes).	17
9. Lavaje de las estaquillas de cacao en laboratorio.....	17
10. Pesado de fungicida agrícola Flutolamil.	18
11. Proceso de desinfección de estaquillas de cacao, a) Sumersión de estaquillas de cacao en solución desinfectante, b) Aireación de estaquillas de cacao luego de sumergidas en solución desinfectante.	18
12. Aplicación de hormona AIB a las estaquillas de cacao.	19
13. Hoyos para siembra de estaquillas de cacao.	20
14. Estaquilla de cacao sembrada en bandeja forestal.	20
15. Bandejas forestales sembradas con estaquillas de cacao de los clones CCN 51, TSH 565, ICS 39 e IMC 67.	21
16. Disposición final de las estaquillas de cacao en micro túnel, a) Acomodo de las bandejas forestales en micro túnel, b) Sellado del micro túnel conteniendo las estaquillas de cacao.	21
17. Primeras emisiones de brotes de raíces, a) Estaquilla del clon ICS 39 con primeras emisiones de raíces, b) Estaquilla del clon TSH 565 con primeras emisiones de	

raíces, c) Estaquilla del clon CCN 51 con primeras emisiones de raíces, d) Estaquilla del clon IMC 67 con primeras emisiones de raíces.....	22
18. Insumos aplicados durante la etapa de preaclimatación.	23
19. Aplicación de insumos agrícolas las estaquillas de cacao (pre-aclimatación).....	23
20. Colecta de suelo agrícola, a) Toma de muestras de suelo, b) Disposición de muestras de suelo en sacos color negro.....	24
21. Suelo agrícola, a) Tamizado. b) Esparcido de suelo en camas de cemento.	25
22. Solarización de sustrato, a) 1er envolvimiento con plástico agrícola, b) 2do envolvimiento con plástico agrícola transparente, c) Disposición final del sustrato para su solarización, d) Volteo a 48 horas de iniciado el proceso de solarización.	25
23. Medición de T° y H° del sustrato con termohigrómetro.....	26
24. Pesado de suelo agrícola.	27
25. Aplicación de agua destilada al suelo agrícola.	27
26. Elaboración de solución de Cd en ppm, a) Pesado del CdCl ₂ H ₂ O, b) Dilución del CdCl ₂ H ₂ O en agua destilada.	29
27. Contaminación de sustrato, a) Formación de rumas, b) Adición de CdCl ₂ H ₂ O, c) Sustrato contaminado con Cd para posterior reposo.....	30
28. Bolsas almacigueras conteniendo sustrato contaminado con Cd.....	30
29. Rotulación de los tratamientos estudiados.	31
30. Hoyo realizado al sustrato con el uso de tubete.	32
31. Disposición final de los tratamientos, a) Trasplante de plantones, b) Siembra de plantones.	33
32. Plantones de cacao distribuidos según tratamientos en vivero.	33
33. Habilitación de muestras vegetales para análisis en laboratorio, a) Plantones de cacao, b) Segmentación de tejidos vegetales (raíz, tallo y hojas), c) Acomodo de tejidos vegetales en sobres manila, d) Secado de los tratamientos en estudio.....	34
34. Evaluaciones morfológicas, a) Evaluación de longitud de brote, b) Conteo del número de hojas, c) Conteo del número de raíces.	38
35. Obtención de muestras para análisis de clorofila.....	39
36. Disposición de muestras antes del centrifugado, a) Tubos de centrífuga, b) Tubo de centrífuga conteniendo macerado de hojas.	40
37. Centrifugado de muestras foliares.....	40
38. Lecturas de muestras foliares, a) Disposición en tubos de ensayo, b) Trasferencia a cubeta del espectrofotómetro UV visible, c) Introducción de cubetas al	

espectrofotómetro UV visible, d) Lectura de absorbancia mediante espectrofotómetro UV visible.	41
39. Contenido de Cd en órganos vegetales, a) raíz, b) tallo y c) hojas en los tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	44
40. FT de los tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	47
41. Longitud de brote en los clones de cacao CCN 51, IMC 67, ICS 39 y TSH 565 por efecto de tres dosis de Cd (0, 6 y 12 ppm), evaluado a los 168 ddt.	52
42. Número de raíces en los clones de cacao CCN 51, IMC 67, ICS 39 y TSH 565 por efecto de tres dosis de Cd (0, 6 y 12 ppm), evaluado a los 168 ddt.	58
43. Concentración de clorofilas, a) Clorofila a, b) Clorofila b y c) Clorofila total de los diferentes tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.	59
44. Supervisión del asesor en campo	71
45. Crecimiento morfológico de los plantones de cacao, a) 40 ddt, b) 1618 ddt.....	71

RESUMEN

El cadmio (Cd) es uno de los metales pesados más tóxicos y representa un riesgo significativo para las plantas, los animales y los seres humanos. Una de las principales preocupaciones para los seres humanos en particular es que los árboles de cacao bioacumulan Cd en niveles más altos que la mayoría de las demás plantas. Este estudio planteó la hipótesis de que los niveles de Cd están influenciados tanto por el contenido de Cd del suelo como por el genotipo del cacao. Se expusieron esquejes de cuatro genotipos de cacao (CCN-51, ICS-39, IMC-67, TSH-565) a dosis de Cd (0, 6, 12 mg/kg) durante 40 y 168 días. Se aplicaron modelos de regresión lineal para evaluar el contenido de Cd de la planta y las respuestas morfológicas y fisiológicas a la exposición al Cd.

Los resultados revelaron niveles consistentemente altos de Cd en todos los genotipos, siendo CCN-51 el que mostró la mayor acumulación; sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) solo entre CCN-51 e IMC-67 en la dosis más alta. Las respuestas morfológicas variaron: el aumento de la dosis de Cd condujo a brotes más largos en CCN-51, ICS-39 y TSH-565, pero brotes más cortos en IMC-67. La dosis de Cd influyó positivamente en el número de raíces en CCN-51 e IMC-67 y en el número de hojas en CCN-51.

Si bien se observaron algunas diferencias genotípicas en la acumulación de Cd, todos los genotipos acumularon Cd en niveles inadecuados para el cultivo en suelos contaminados. Estos hallazgos subrayan la necesidad de estrategias alternativas para mitigar la contaminación por Cd en el cultivo del cacao.

Palabras claves: CCN-51; IMC-67; ICS-39; TSH-565; Perú; Contaminación del suelo

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is one of the most toxic heavy metals, posing significant risks to plants, animals, and humans. One major concern for humans in particular is that cacao trees bioaccumulate Cd at levels higher than most other plants. This study hypothesized that Cd levels are influenced by both the soil Cd content and cacao genotype. Cuttings from four cacao genotypes (CCN-51, ICS-39, IMC-67, TSH-565) were exposed to Cd doses (0, 6, 12 mg/kg) for 40, and 168 days. Linear regression models were applied to evaluate plant Cd content and morphological, and physiological responses to Cd exposure.

Results revealed consistently high Cd levels across genotypes, with CCN-51 showing the highest accumulation; however, a statistically significant difference ($P < 0.05$) was observed only between CCN-51 and IMC-67 at the highest dose. Morphological responses varied: increasing Cd dose led to longer shoots in CCN-51, ICS-39, and TSH-565 but shorter shoots in IMC-67. Cd dose positively influenced root number in CCN-51 and IMC-67 and leaf number in CCN-51.

While some genotypic differences in Cd accumulation were observed, all genotypes accumulated Cd at levels unsuitable for cultivation on contaminated soils. These findings underscore the need for alternative strategies to mitigate Cd contamination in cacao cultivation.

key words: CCN-51; IMC-67; ICS-39; TSH-565; Peru; Soil contamination

I. INTRODUCCIÓN

El sembrío y la producción del cacao están directamente relacionadas con las condiciones medioambientales de las diferentes zonas donde se cultiva, existiendo regiones con mayores niveles de producción como es el caso de San Martín respecto a otras. Durante el período enero a diciembre de 2022, la producción fue liderada por la región San Martín, con 64,9 mil toneladas (representando el 38,1 % de la producción nacional); seguida por la región Junín con 31,9 mil toneladas (18,7 %); Ucayali con 22,7 mil toneladas (13,3 %) y finalmente las regiones de Huánuco y Cusco con 16,6 mil y 8 mil toneladas, respectivamente, constituyéndose de esta forma las cinco regiones en representar alrededor del 80 % de la producción total del país. La producción nacional de cacao en grano en el Perú ha sufrido un crecimiento promedio anual de 10,1 % en los últimos años y esta se basa principalmente en tres variedades, 53,3 % de la variedad trinitario (Junín), 37,3 % de forastero amazónico (Cusco y Ayacucho) y el 9,4 % de criollo (zona norte de San Martín, Amazonas y Cajamarca) (MIDAGRI, 2023).

Sin embargo, actualmente el desarrollo de este cultivo viene siendo afectado por algunas limitantes como la presencia de plagas y enfermedades e incluso la presencia de metales pesados de manera natural en los suelos cultivados con cacao como es el caso del cadmio (Cd), hecho que viene limitando su producción y calidad, y por ende la exportación de subproductos vinculados a este cultivo importante en la generación de divisas para diversos actores de la cadena.

Augstburger et al; (2000), señalan que las plantas de cacao absorben metales pesados del suelo y los concentran en las semillas, hojas y raíces. Para el caso del cadmio, actualmente, no se conoce un papel fisiológico definido en la planta, pero puede concentrarse en las raíces, brotes, hojas o partes comestibles como los granos por su constitución grasosa (Rascio y Navari-Izzo, 2011). El Cd es un elemento móvil en la solución del suelo y se encuentra de manera natural en la corteza terrestre en forma de minerales, de donde pueden ser absorbidos por las plantas y tomados de ellas por el ser humano, y en altas concentraciones pueden resultar ser tóxicas, según (Prieto et al; 2009).

Según Alloway (2013), la presencia de algunos metales pesados está directamente relacionados con fuentes específicas como: fertilizantes (Cd, Cr, Mo, Pb, Zn), plaguicidas (Cu, As, Hg, Pb, Mn, Zn), compost derivados de residuos sólidos convencionales (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) y del estiércol (Cu, As, Zn). Además, Laegreid et al; (1999) manifiestan que los fertilizantes fosforados son una fuente de Cd, debido a los contenidos de apatita, que además de fósforo,

contiene Cd en concentraciones entre 8 y 500 mg/kg, por lo que las plantas expuestas a altos niveles de Cd causan la reducción en la fotosíntesis, en la absorción de agua y nutrientes, consecuentemente, se observa clorosis, inhibición del crecimiento, pardeamiento de las puntas de las raíces y, finalmente, la muerte de la planta (Jiménez, 2015).

Así mismo, los grandes mercados consumidores de los derivados de este cultivo, se han vuelto más exigentes. En 2014, la Unión Europea aprobó el reglamento (UE) N° 488/2014, los cuales regula los umbrales de metales pesados en productos de chocolate y cacao que contienen niveles superiores de 0,8 ppm, situación que podría limitar la dinámica de esta cadena de valor y consecuentemente, afectar a familias y productores que dependen directamente del cultivo de cacao, al disminuir su calidad de vida. En tal sentido, conocer la dinámica del Cd, en plantas de cacao propagadas y producidas asexualmente por enraizamiento de estaquillas podría conllevar a viabilizar las posibilidades de comprender el mecanismo de transporte y translocación de este metal desde el nivel radicular hasta la parte aérea de la planta.

Actualmente, la limitada o escasa información científica sobre los mecanismos de transporte de Cd en el cultivo de cacao, genera contextos reducidos que aterricen en posibles soluciones sobre la acumulación de este metal en tejidos y órganos. Es así que, la ejecución de la presente propuesta de investigación buscará entender este mecanismo de transporte desde las raíces hasta la parte foliar (aérea), cuantificando su absorción interna, mediante el análisis por espectrofotometría de absorción atómica. Además, se buscará la identificación de genotipos comerciales con menor afinidad a la translocación de Cd.

Consecuentemente, los resultados generados tendrán un impacto para algunos eslabones de esta cadena de valor y en particular para el sector agrícola y la comunidad científica. Para el sector agrícola es muy probable que identifiquemos genotipos comerciales propagados por enraizamiento de estaquillas con menor translocación a cadmio; en tanto que, para la comunidad científica los resultados obtenidos tendrán la veracidad respectiva y existiendo posibilidades de ser publicables en revistas científicas de gran impacto.

Finalmente, el desarrollo y ejecución de la presente propuesta de investigación conllevará a fortalecer las líneas de investigación entre la Estación Experimental Agraria EL Porvenir, San Martín del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), además, la presente propuesta plantea como hipótesis que la dinámica del cadmio en plántulas de *Theobroma cacao* obtenidas mediante enraizamiento de estaquillas en condiciones de vivero involucra la absorción y translocación del cadmio desde la parte radicular hasta la zona foliar, teniéndose como objetivos:

Objetivo general.

Determinar la acumulación del cadmio (Cd) en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas en condiciones de vivero.

Objetivos específicos.

1. Cuantificar la concentración de Cd en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.
2. Determinar el factor de translocación del Cd en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.
3. Identificar plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas con menor capacidad de transporte de cadmio.
4. Evaluar los efectos del Cd tanto a nivel morfológico como en los pigmentos de clorofila en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción morfológica del cacao.

Durán (2010), señala que el cacao presenta un sistema radical que se compone de una raíz pivotante y que en condiciones favorables puede penetrar más de 2 m de profundidad en el suelo. Esta condición favorece el reciclaje de nutrientes. Además, presenta un extenso sistema superficial de raíces laterales distribuidas alrededor de 15 cm de la superficie del suelo. Según su origen, la raíz es radicular porque proviene de la radícula del embrión. Además, posee un tallo que crece de forma recta, alcanzando una altura que oscila entre 0,80 a 1,00 m, para luego formar un conjunto de ramas, según refiere Johnson et al. (2008). Después de un año y con una altura de 1,5 m, suele interrumpirse el crecimiento apical, surgiendo 5 yemas laterales que formarán ramas plagiotrópicas dorsiventrales (horquetas), las que se diferencian del brote ortotrópico por las hojas pecioladas.

Las hojas adultas poseen una coloración verde, son glabras, presentando una variación de ovada – oblonga a lanceolada, acuminatas con borde liso y nerviación peninervia.

La flor del cacao es pedicelada, hermafrodita con 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estambres, 5 estaminoides y un ovario pentacarpelar súpero (Benito, 1992). Las inflorescencias son caulinares (se originan del tallo), cimosas o cerradas (IICA, 2017). El fruto, presenta tamaños, colores y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya denominada mazorca, pesando aproximadamente 450 g cuando madura, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café.

Las semillas son blancas y están compuestas por dos cotiledones, es decir, hojas germinales y un pequeño embrión. Todos estos componentes están encerrados por la cubierta, llamada también testa. Los cotiledones almacenan el alimento para la posterior germinación, así como también las primeras hojas de la planta cuando germina la semilla. Además, las semillas son grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o púrpúreo, de 2 a 3 cm de largo, presentando también un sabor amargo; no tienen albumen y están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco, con sabor dulce y acidulado. Finalmente, cada semilla contiene una cantidad significativa de grasa (40 – 45 % como manteca de cacao) y su componente activo más resaltante es la teobromina (Durán, 2010).

2.1.1. Clasificación taxonómica del cacao

Según (Alverson et al; 1999), el cacao es una especie perenne perteneciente a la familia Malvaceae, cuyo crecimiento demanda el uso de especies de sombra, y la producción de grano sustenta a la industria chocolatera. Coincidentemente (Arguello et al;

2000) manifiesta que el cacao pertenece a la familia Malvaceae y al orden Malvales. Por otra parte, Benito (1992), reporta que la planta de cacao presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	: Vegetal
División	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisión	: Angiosperma
Clase	: Dicotiledóneas
Orden	: Malvales
Familia	: Esterculáceas
Género	: <i>Theobroma</i>
Especie	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.1.2. Propagación asexual del cultivo de cacao: Estaquillas.

Este tipo de propagación se realiza por medio de partes vegetativas de la planta seleccionada y no implica un cambio en la constitución genética de la nueva planta debido a que todas las características de la planta madre se presentan en la nueva planta, sin embargo, debido a factores como el clima, tipo de suelo y el ataque de enfermedades pueden modificar la apariencia de la planta, flores o incluso de los frutos sin involucrar un cambio genético. Las estacas o ramillas deben ser obtenidas de las ramas con hojas adultas sanas y presentar una coloración parda, sin flores. Preferentemente las estacas deben ser colectadas por las mañanas, debiendo ser cortadas en el extremo en forma perpendicular a medio centímetro del nudo. Estas deben tener como mínimo tres hojas que se cortarán a 1/3 de la superficie foliar; además las estacas se tratan con hormonas enraizantes antes de la multiplicación (Durán, 2010).

Las raíces adventicias de las estaquillas, parte fundamental de este método de propagación clonal, se producen como resultado de la aplicación de altas concentraciones de auxinas (Steffens y Rasmussen, 2016). La aplicación exógena de auxinas, favorece el traslado de carbohidratos, compuestos nitrogenados y otros desde la parte apical hacia la parte basal de la estaca, dando origen y apertura a la etapa de rizogénesis (Puri y Khala, 1992). Para Guan et al.; (2015), la formación de raíces en las estaquillas abarca tres etapas: 1) inducción, el cual hace referencia a los eventos químicos y moleculares que preceden a los cambios morfológicos, 2) iniciación, en la cual la división celular permite la formación de primordios y meristemos y 3) extensión, en las cuales las raíces adventicias prosiguen su crecimiento y emergen.

Para Enríquez (2004), el método de propagación asexual por medio de estacas o ramillas se basa en la utilización de ramas con hojas adultas sanas y sin flores, cuyas

yemas se observen claramente, las cuales son cortadas en el extremo de forma perpendicular y tratadas con fitorreguladores inductores de raíces para la formación de una planta nueva idéntica a la original. Por otra parte, Lima et al; (2001) señala que entre las ventajas que presenta el sistema de propagación por estaquillas sobre otros métodos es que las plantas pueden ser producidas en menor tiempo que las plantas injertadas, además se prescinde del uso de portainjertos, y por tanto los problemas de incompatibilidad entre el injerto y el patrón. Finalmente, es considerado como el método más adecuado para una producción de mayor escala e industrial de plantas de cacao en la actualidad.

La eficacia de este método depende de varios factores tales como el tipo de clon de cacao, condición de las estacas, la hormona utilizarse y las condiciones ambientales durante el proceso de propagación y entre las ventajas de este tipo de propagación es que las plantas comienzan a producir precozmente en relación a otras, además las plantas son de poco porte, que bien podadas conforman un buen arquetipo (Benito, 1992).

2.2. Metales pesados: Cadmio (Cd).

Un metal pesado puede ser definido como aquel elemento que tiene una densidad superior o igual a 5 g cm^{-3} cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalino-térreos) (García y Dorronsoro, 2005). Para Alloway (2013), el término metal pesado se ha venido utilizado hace muchos años y es por lo general reconocido como una referencia al grupo de los metales y metaloides de relativamente alta masa atómica ($> 5 \text{ g cm}^{-3}$) sobre todo los metales de transición, tales como Pb, Cd y Hg, que pueden causar graves problemas de toxicidad. El Cd es uno de los metales pesados más tóxicos presentes en el ambiente sin comprobada y conocida función fisiológica y biológica en plantas o humanos (Tchounwou et al., 2012; Vanderschueren et al, 2021, Guarín et al: 2024). Además, es considerado un metal pesado no esencial para las plantas (Pinto et al., 2003). Trazas de Cd presente en los suelos pueden conllevar a su acumulación sucesiva en estructuras vegetales comestibles y, en última instancia, migrar a la cadena alimentaria humana (Barraza et al., 2018; Guarín et al., 2024). Los metales pesados más comunes y ampliamente distribuidos como contaminantes ambientales incluyen plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y el metaloide arsénico (As) (Reilly, 2002).

2.2.1. Fuentes de origen del Cd.

Existen dos fuentes potenciales de Cd en suelos y plantas. El primero, que se encuentra presente de forma natural en el ambiente, y particularmente en los suelos debido a procesos de erosión que liberan este elemento de los materiales originales que contienen metales pesados (Cd geogénico) (Engbersen et al; 2019; Guarín et al.; 2024). Además, los

procesos de transporte y deposición de sedimentos de litologías potencialmente altas en Cd pueden conducir a la acumulación de Cd en suelos aluviales (Capparelli et al; 2020; Chávez et al.; 2015; Gramlich et al; 2018; Guarín et al.; 2024).

En segundo lugar, las fuentes de Cd que devienen de las actividades antropogénicas en los suelos y que se relacionan con una amplia gama de industrias vinculadas a la producción de metales pesados (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Los derivados de las industrias petrolera, minera, textil y agroquímica pueden explicar el alto contenido de Cd y otros metales pesados en el ambiente (Barraza et al; 2018). Las prácticas agrícolas, especialmente de producción a través del uso de fertilizantes fosfatados derivados de rocas ricas en cadmio, también se identifican como una fuente antropogénica de Cd en los suelos (Barraza et al.; 2017; Capparelli et al.; 2020; Chávez et al.; 2015), en tal sentido, las rocas de fosfato destinadas para la producción de fertilizantes son una de las principales fuentes de contaminación por Cd en suelos agrícolas (Mortvedt y Beaton, 1995). Es así que, en las últimas décadas, se registró un aumento significativo de Cd en el ambiente, principalmente como resultado de actividades antrópicas o industriales como la minería, fundición y refinación de zinc, fabricación y uso de fertilizantes fosfatados y fungicidas (Arduini et a.; 2004; Benavides et al.; 2005; Castro et al; 2015).

2.2.2. Mecanismos de transporte y efectos fitotóxicos del Cd.

Las plantas usualmente absorben el Cd que está presente de forma natural en el suelo o procedente de deposiciones atmosféricas, o del presente en fertilizantes orgánicos o fosfatados (Galego et al.; 2012; Castro et al.; 2015). Una vez que ingresa dentro de la planta, la acumulación de Cd genera cambios morfológicos y ultraestructurales, alteraciones en procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, modificando como consecuencia las actividades metabólicas (Almeida et al.;2013), por lo que el Cd genera efectos adversos en el crecimiento de la planta, en el proceso fotosintético, en la absorción de nutrientes, en el contenido de pigmentos del cloroplasto, en la expresión genética y en los metabolismos antioxidantes (Pereira de Araújo et al.; 2017), como es caso de las peroxidasas de clase III y el superóxido dismutasa (Almeida et al.;2010). Actualmente, existen evidencias en las cuales se conoce que el árbol del cacao bioacumula Cd a nivel de raíces, hojas, vainas y semillas (Barraza et al.; 2017; Lewis et al.; 2018; Pérez Moncada et al.; 2019; Zug et al.; 2019) a un nivel superior al reportado normalmente en otras especies de plantas (Argüello et al.; 2019; Barraza et al.; 2019; Guarín et al.; 2024).

Las plantas captan alrededor de un 75 % de cadmio por vía apoplástica (a través de paredes celulares y espacios intercelulares) y en menores proporciones por vía

simplástica (a través de paredes celulares y el citoplasma de las células), sin embargo, en especies hiperacumuladoras la toma de este metal es en proporciones iguales tanto por vía apoplástica como por vía simplástica (Zhao et al; 2002). Para Sánchez (2003), el cadmio y la mayoría de los metales pesados incorporados al suelo, pueden seguir cuatro diferentes vías:

- Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación. Estos procesos son importantes ya que el contenido total de cadmio en el suelo da idea del nivel de contaminación, pero es la fracción de cadmio asimilable por la planta, la que indica el grado de toxicidad potencial del elemento para los seres vivos. La fracción del metal considerada asimilable, se define como la suma de la fracción soluble en la fase líquida y la retenida en la fase sólida que puede ser transferida a la solución para ser absorbida por las raíces de las plantas.

- Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas.
- Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.
- Pueden movilizarse a aguas superficiales y subterráneas.
- Estudios plantean que, los metales pesados podrían ser incorporados por las raíces de las plantas, utilizando mecanismos para la absorción de elementos esenciales (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+}), debido a su similitud química con algunos de estos elementos (Kim et al., 2002).

Por otra parte, los efectos fitotóxicos del Cd pueden verse traducidos en la afección de los procesos metabólicos de las plantas, reduciendo la fotosíntesis y la transpiración (Sandalio et al.; 2001). Para Benáková et al; 2017, la toxicidad del Cd en las plantas podría reflejarse en una reducción del crecimiento, de la biomasa y el rendimiento de los cultivos, además de alterar la nutrición mineral, podría generar también una reducción de la fotosíntesis y el cierre estomático, afectar el metabolismo del nitrógeno (N) y la estructura de las membranas, entre otros.

2.3. Genotipos de cacao utilizados en el presente estudio.

El genotipo CCN-51 (Colección Castro Naranjal) es un híbrido entre los genotipos IMC-67 y Trinitario cacao ICS-95. Se considera un genotipo universal debido a su adaptabilidad a todas las zonas de producción y su tolerancia a enfermedades como *Moniliophthora perniciosa* y *Moniliophthora roreri* (Boza et al; 2014). El genotipo TSH-565 (Trinidad Selected Hybrid) y el ICS-39 (Imperial College Selection) son genotipos que pertenecen al grupo de los Trinitarios (Perea et al.; 2013). El genotipo IMC 67 (Iquitos mezclado con calabacillo), pertenece al grupo Forastero Alto Amazonas (MIDAGRI, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento.

Los procedimientos vinculados a la propagación y obtención de plántulas de cacao por el método de propagación enraizamiento de estacas, se desarrolló dentro de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología (ver Figura 1) de la Estación Experimental Agraria (EEA) El Porvenir, San Martín, ubicado en el Km 14.5 carretera Fernando Belaunde Terry zona sur, distrito de Juan Guerra, Provincia y Departamento de San Martín, en 354849 m. E y 9271185 m. N.

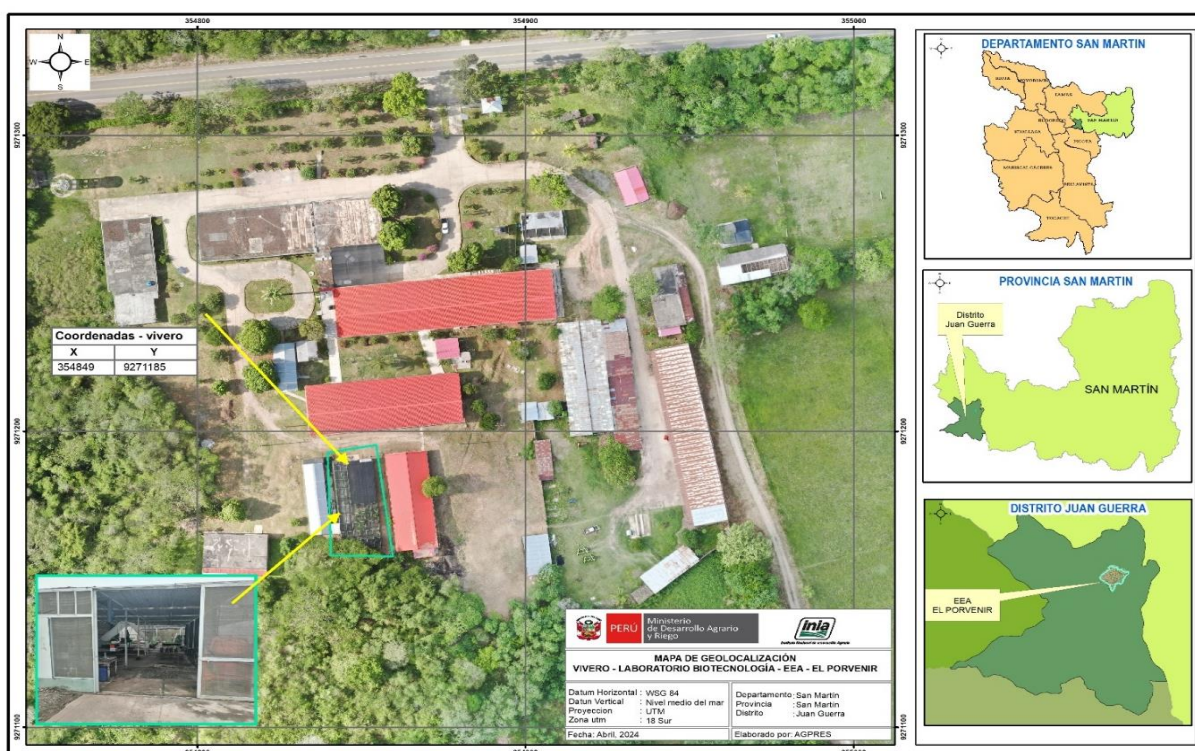


Figura 1. Imagen satelital de ubicación del vivero – Laboratorio de Biotecnología – EEA El Porvenir.

3.2. Equipos y materiales.

a) Equipos.

- Balanza analítica.
- GPS.
- Laptop.
- Espectrómetro de Emisión Atómica de plasma inducida por microondas MP – AES.

- Espectrofotómetro UV GENESIS 150.
 - Termohidrómetro.
 - Potenciómetro de mano (pH)
- b) Materiales e insumos.
- Tijera de podar.
 - Hormona AIB.
 - Etiquetas.
 - Tijeras.
 - Sustrato (Premix 3).
 - Fungicida.
 - Bandejas forestales.
 - Bolsas almacigueras 2, 3 y 4 Kg.
 - Hidrato de cloruro de Cadmio ($\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$).

3.3. Tipo y nivel de investigación.

La investigación fue de tipo paramétrica, descriptiva, generándose nuevos conocimientos (investigación básica).

3.3.1. Diseño de investigación.

Se utilizó un Diseño Completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 4 x 3 factores, con 3 repeticiones, donde cada tratamiento estuvo formado por 4 plántulas de cacao obtenidas por enraizamiento de estaquillas, teniéndose en total 36 unidades experimentales. Se estudió dos factores:

- Factor A: Clones de cacao, el factor A presentó 4 niveles:
 - a₁: Clon CCN – 51,
 - a₂: Clon IMC – 67,
 - a₃: Clon: ICS – 39 y
 - a₄: Clon TSH – 565.
- Factor B: Concentraciones de cadmio (Cd) El factor B presentó 3 niveles:
 - b₁: 0 ppm,
 - b₂: 6 ppm y
 - b₃: 12 ppm.

Los tratamientos estudiados se describen a continuación en la Tabla

Tabla 1. Descripción de los tratamientos estudiados

Tratamientos		Descripción	
Número	Clave	Clones	Concentración de Cadmio
T ₁	a ₁ x b ₁	CCN – 51	0 ppm
T ₂	a ₁ x b ₂	CCN – 52	6 ppm
T ₃	a ₁ x b ₃	CCN – 53	12 ppm
T ₄	a ₂ x b ₁	IMC – 67	0 ppm
T ₅	a ₂ x b ₂	IMC – 68	6 ppm
T ₆	a ₂ x b ₃	IMC – 69	12 ppm
T ₇	a ₃ x b ₁	ICS – 39	0 ppm
T ₈	a ₃ x b ₂	ICS – 40	6 ppm
T ₉	a ₃ x b ₃	ICS – 41	12 ppm
T ₁₀	a ₄ x b ₁	TSH – 565	0 ppm
T ₁₁	a ₄ x b ₂	TSH – 566	6 ppm
T ₁₂	a ₄ x b ₃	TSH – 567	12 ppm

a) Modelo matemático.

El modelo estadístico que se utilizó en la presente investigación es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

$$\text{Para } i = 1, \dots, a, j = 1, \dots, b, k = 1, \dots, n$$

Donde:

Y_{ijk} = valor estimado de la variable.

μ = media general.

α_j = efecto del factor clones de cacao

β_k = efecto del factor concentraciones de Cd

$(\alpha\beta)_{jk}$ = efecto de interacción clones de cacao y concentración de Cd.

ϵ_{ijk} = efecto del error experimental.

b) Análisis de varianza.

En la Tabla 2, se presenta el esquema para el análisis de varianza.

Tabla 2. Análisis de varianza.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F
Factor A	a - 1	SC _A	CM _A = SC _A /a-1	F _A = CM _A / CM _E
Factor B	b - 1	SC _B	CM _B = SC _B /b-1	F _B = CM _B / CM _E
Interacción AB	(a - 1) (b - 1)	SC _{AB}	CM _{AB} = SC _{AB} /(a-1)(b-1)	F _{AB} = CM _{AB} / CM _E
Error exp.	(ab)(n-1)	SC _E	CM _E = SC _E /(ab)(n-1)	
Total	abn - 1	SC _T		

c) Distribución de unidades experimentales.

La unidad experimental consistió en cuatro bolsas, cada una conteniendo una plántula de cacao obtenida mediante la técnica de propagación por enraizamiento de estaquillas. A continuación, se describe la distribución y dimensiones de la unidad experimental:

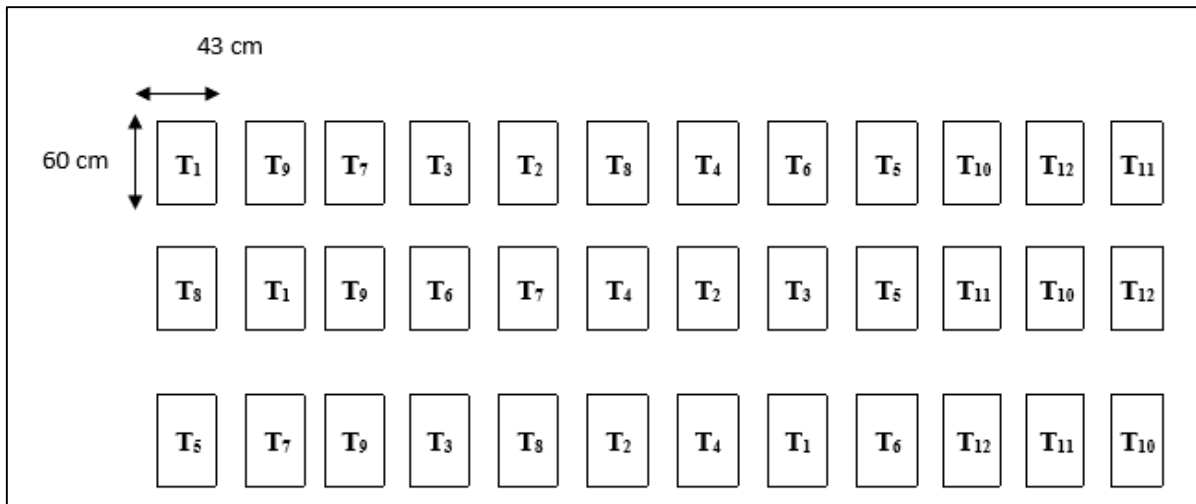


Figura 2. Distribución de las unidades experimentales en el experimento.

3.3.2. Población y muestra.

a) Población.

La población de estudio estuvo constituida por 144 plántulas, las mismas que fueron establecidos en condiciones de invernadero.

b) Muestra.

La muestra estará conformada por 4 plantas por tratamiento, todas ellas serán tomadas al azar y en diferentes tiempos de evaluación.

3.4. Metodología

A continuación, se detalla la metodología desarrollada para cada objetivo:

3.4.1. Cuantificar la concentración de Cd en plántulas de *Thebroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

a) Etapa de campo.

1. Identificación del material vegetal (estaquillas de cacao).

Constó de partes vegetativas (estaquillas de cacao) correspondiente a los clones CCN – 51 (Colección Castro Naranjal), IMC – 67 (Colección Iquitos mezclado con calabacillo), ICS – 39 (Selección del Colegio Imperial) y el TSH – 565 (Selección Híbrido

Trinidad). Las estacas seleccionadas correspondieron al segmento apical de las ramas de la planta de cacao, debido a que en ensayos preliminares realizados en el laboratorio de Biotecnología de la EEA El Porvenir, San Martín, fueron éstas quienes mostraron mayor cantidad de prendimiento (sobrevivencia). Una vez identificada la estaquilla con las características agronómicas deseadas como un adecuado grosor, coloración con tonalidad marrón verdusco, presencia de hojas verdaderas, presencia como mínimo de 4 a 5 yemas axilares vivas y activas, entre otras, luego se procede con la colecta de la misma (ver Figura 3)



Figura 3. Identificación de la parte apical de la estaca de cacao a colectarse.

2. Colecta del material vegetal.

La colecta (ver Figura 4), se realizó en las primeras horas de la mañana, con el objeto de evitar mayores niveles de estrés (pérdida de humedad) en las estaquillas de cacao colectadas. Estas fueron extraídas de plantas donadoras con buen estado nutricional y agronómico, para ello se utilizó una tijera podadora de mano. Como se mencionó anteriormente y por los motivos explicados, se consideró segmentos apicales al momento de colectar las estaquillas, luego se cortó las hojas verdaderas de las estaquillas en su parte medial, dejando entre tres a cinco hojas cortadas y una longitud de estaquilla de 15 a 20 cm. Luego, las estacas colectadas fueron cuidadosamente dispuestas en bolsas de color negro, acomodándolas una sobre otra, evitando rupturas tanto en hojas como en yemas axilares. Finalmente, éstas fueron acondicionadas y envueltas con papel humedecido (mediante el uso de aspersores conteniendo agua) para evitar desecamiento y estrés por calor y de esta forma mantener su hidratación y luego fueron transportadas al laboratorio y vivero.



Figura 4. Colecta de material vegetal de las estaquillas, a) clones THS 565, CCN 51, ICS 39 e IMC 67), b) Estaquillas de cacao con hojas cortadas en la parte medial, c) Disposición de estaquillas en bolsas negras, d) Acondicionamiento final para su transporte al vivero

b) Etapa de vivero.

1. Acondicionamiento de materiales, insumos y material vegetal

- Limpieza y desinfección de las bandejas forestales.

Antes de la siembra de las estaquillas de cacao en las bandejas forestales (tubetes) (Figura 5), se procedió con su desinfección (Figura 6). Esta etapa se realizó dos días antes de la colecta, realizando las siguientes actividades:

Se pesó 100 gr de detergente en una balanza analítica, los mismos que fueron disueltos en agua, para ello se utilizó una bandeja con capacidad de 60 L, se mezcló manualmente hasta enraizar y homogenizar la solución.

Luego los tubetes, fueron introducidos y lavados, con el objeto de eliminar rastros de cualquier insumo que pueda contaminar el sustrato que posteriormente será contenido por los tubetes.



Figura 5. Bandeja forestal conteniendo tubetes con capacidad de albergar a 54 estaquillas

Seguidamente, los tubetes fueron introducidos en otra bandeja con capacidad de 60 L, en la cual se mezcló hipoclorito sódico (NaClO) al 5 % y agua, para ello se usó una probeta con el objeto de medir 240 mL de NaClO , cantidad que fue diluida en 60 L de agua.



Figura 6. Desinfección de tubetes, a) Disolución de detergente, b) Lavado de tubetes en solución de detergente y agua, c) Dilución de NaClO al 5 % en agua, d) Lavaje de tubetes en solución de NaClO al 5 % y agua.

Luego de homogenizado la solución, los tubetes fueron introducidos durante 10 minutos y después fueron enjuagados en 60 L de agua limpia. Este procedimiento se realizó con la finalidad de eliminar patógenos.

- Elaboración de sustrato para ser contenidos en tubetes.

El procedimiento constó en enrazar un balde con capacidad de 17 L con sustrato Premix 3 y un balde de la misma capacidad con fibra de coco para ser mezclados en una bandeja de 60 L manualmente y de manera uniforme tratando de eliminar presencia de grumos. Una vez homogenizada la mezcla, procedimos a separar dos baldes de 17 L de la misma, y luego aplicamos gradualmente agua tratando de no sobre humedecer la mezcla, con el objeto de tener un sustrato con adecuada humedad y textura (Figura 7).



Figura 7. Elaboración de sustrato, a) Sustrato premix, b) Fibra de coco, c) Adición de premix en bandeja, d) Adición de fibra de coco en bandeja, e) Mezcla de premix y fibra de coco, f) Adición de agua a la mezcla de sustrato (premix y fibra de coco).

La relación proporcional de la mezcla fue 2:1, es decir dos baldes de 17 L de Premix 3, y un balde de la misma capacidad de fibra de coco. Finalmente, el sustrato preparado fue dispuesto luego en los tubetes de las bandejas forestales (Figura 8).



Figura 8. Sustrato homogenizado dispuesto en bandejas forestales (tubetes).

- Siembra de estaquillas.

Después de haber realizado la colecta de estaquillas de cacao, éstas fueron conducidas al laboratorio de Biotecnología de la EEA El Porvenir San Martín para un proceso cuidadoso de lavaje, antes de ser sometidas a un tratamiento fitosanitario. Cabe señalar que la etapa de lavaje solo se hizo con agua con la finalidad de no contaminar el material vegetal con algún componente químico que pueda afectar su viabilidad (Figura 9).



Figura 9. Lavaje de las estaquillas de cacao en laboratorio.

Posteriormente, estas fueron trasladadas al vivero para ser sometidas a un tratamiento fitosanitario a base de fungicida agrícola (Flutolanil, Captan e

ingredientes inertes) a una dosis de 2 g/ L de agua por espacio de tiempo correspondiente a 10 minutos con el objeto de desinfectar ante la posible presencia de patógenos a las estaquillas de cacao (Figura 10).



Figura 10. Pesado de fungicida agrícola Flutolamil.

Luego de pesado los 40 g del fungicida agrícola, éste es mezclado con agua, en un contenedor de plástico conteniendo 20 L de agua. Finalmente, las estaquillas de cada clon de cacao fueron introducidas y sumergidas a la solución desinfectante para realizar el proceso aséptico. Después de 10 minutos de sumersión de las estaquillas de cacao en la solución desinfectante, éstas son aireadas por un lapso de tiempo aproximado de 5 minutos con el objeto de escurrir los sobrantes de la solución desinfectante (Figura 11).



Figura 11. Proceso de desinfección de estaquillas de cacao, a) Sumersión de estaquillas de cacao en solución desinfectante, b) Aireación de estaquillas de cacao luego de sumergidas en solución desinfectante.

Pasado la etapa de desinfección, se procedió con la aplicación de la hormona ácido indol-3-butírico (AIB) a una dosis de 6000 ppm a las estaquillas de cacao, con la finalidad de estimular el enraizamiento de brotes (raíces), para ello se preparó 100 mL de solución, en tal sentido se pesó 0.6 g de AIB en una balanza analítica. Luego, se disuelve el AIB en alcohol de 96° agitando suavemente la solución, hasta que el AIB se haya disuelto por completo. De esta forma, se obtiene una solución de AIB a 6000 ppm, prosiguiéndose a sumergir la parte terminal o basal de las estacas en un recipiente conteniendo la solución hormona antes mencionada, por un espacio de 5 segundos (Figura 12).

Para la siembra de las estaquillas de cacao en las bandejas forestales, estas deben tener entre tres a cinco hojas cortadas en su parte medial y como mínimo cuatro yemas axilares vivas y activas. Luego, las estaquillas serán trasladadas y sembradas en bandejas forestales, las mismas que contendrán un sustrato enriquecido.



Figura 12. Aplicación de hormona AIB a las estaquillas de cacao.

Antes de la siembra de las estaquillas de cacao, éstas son separadas por grupos, donde cada clon fue dispuesto en una bandeja forestal rotulado, con la finalidad de evitar confusiones y se hace un remojo ligero del sustrato contenido en los tubetes, para después hacer hoyos con el uso de un lapicero a una profundidad no mayor a 5 cm (Figura 13).

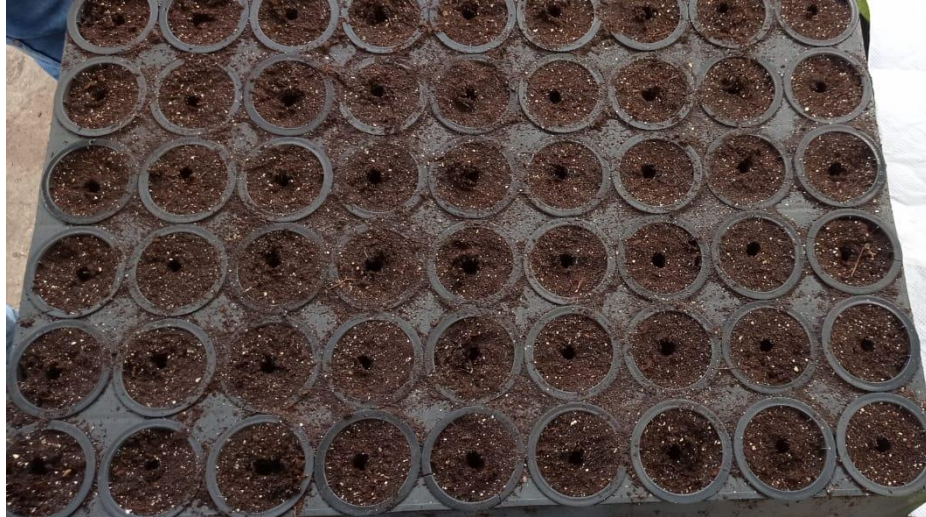


Figura 13. Hoyos para siembra de estaquillas de cacao.

Después, la siguiente etapa consistió en la siembra de las estaquillas de los cuatro clones (CCN 51, TSH 565, ICS 39 e IMC 67) previamente colectadas y acondicionadas, en los tubetes de las bandejas forestales, procediendo con los dedos de la mano a ejercer suavemente cierta presión a la parte basal de las estaquillas para darle estabilidad al ser sembrada (Figura 14).



Figura 14. Estaquilla de cacao sembrada en bandeja forestal.

Luego, las bandejas forestales que contuvieron las estaquillas de cacao fueron dispuestos en micro túneles (previa limpieza del micro túnel con agua y detergente) (Figura 15).



Figura 15. Bandejas forestales sembradas con estaquillas de cacao de los clones CCN 51, TSH 565, ICS 39 e IMC 67.

Además, el micro túnel contó con riego automatizado (agua entubada, captada de quebrada), con la finalidad de garantizar la humedad y condiciones favorables para el desarrollo de las plantas, luego el micro túnel fue sellado con el uso de cinta de embalaje (Figura 16).

Durante esta etapa, las plantas permanecieron en el micro túnel aproximadamente entre 40 a 60 días con temperaturas que oscilaron entre $29^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ y una humedad relativa del 80 %, en las cuales se podrá observar el desarrollo de las primeras raíces (ver Figura 17).

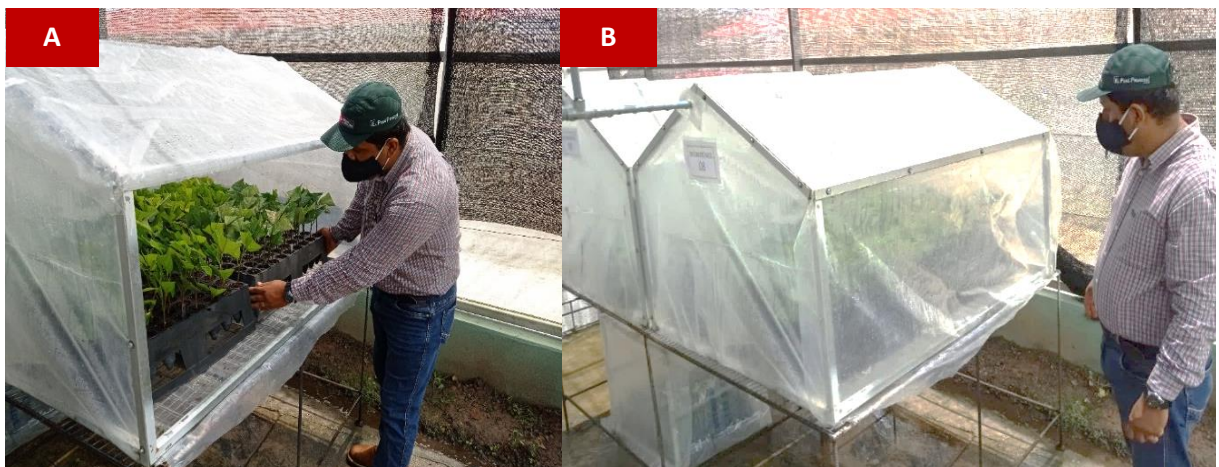


Figura 16. Disposición final de las estaquillas de cacao en micro túnel, a) Acomodo de las bandejas forestales en micro túnel, b) Sellado del micro túnel conteniendo las estaquillas de cacao.



Figura 17. Primeras emisiones de brotes de raíces, a) Estaquilla del clon ICS 39 con primeras emisiones de raíces, b) Estaquilla del clon TSH 565 con primeras emisiones de raíces, c) Estaquilla del clon CCN 51 con primeras emisiones de raíces, d) Estaquilla del clon IMC 67 con primeras emisiones de raíces.

Pasado este tiempo las plantas fueron sometidas a un proceso de preaclimatación que consistió en dos etapas: La primera dentro del micro túnel, donde alrededor de una semana el micro túnel gradualmente fue abierto, es decir, el primer día el micro túnel fue abierto por espacio de tiempo de 1 hora, el segundo día 2 horas, y así sucesivamente hasta completar la semana, cabe señalar que la frecuencia de riego dentro del micro túnel se mantuvo, es decir los aspersores se activaban cada 15 minutos en cada intervalo de hora, regando a las estacas por un espacio de tiempo de 1 minuto. La segunda etapa consistió en sacar las bandejas forestales conteniendo las estaquillas de cacao a las mesas metálicas del vivero, con cobertura de sombra (malla Raschel) del 80 %, manteniéndose la misma frecuencia de riego. Durante el proceso de preaclimatación se hizo en promedio cuatro aplicaciones de fertilizantes foliares (semanal), con el objeto de aumentar la vigorosidad de las plantas. Los productos (ver Tabla 3 y Figura 18) y dosis utilizadas se detallan a continuación:

Tabla 3. Insumos aplicados durante la etapa de pre-aclimatación.

Nombre comercial		Descripción	Dosis utilizada
Quimifol plus	600	Fertilizante foliar: NPK 20-20-20. Micronutrientes: (Fe), (Cu), (Mn), (Zn), (B), (Mo) vitamina B1, sustancias húmicas.	37.5 gr
Quimifol máster	pH	Fertilizante foliar: ácido fosfórico, materiales inertes.	7.5 ml
Sportak		Fungicida sistémico: grupo químico Imidazoles.	15 ml
Silwet		Coadyuvante	15 ml
Enzipron		Bioestimulante: nitrógeno orgánico, carbono orgánico, Ácido fólico	37.5 ml

* La mención de productos comerciales, se hizo con fines informativos y no implica necesariamente una recomendación expresa del autor.

**Figura 18.** Insumos aplicados durante la etapa de preaclimatación.

Luego, las dosis de cada producto fueron diluidos en 15 litros de agua, y posteriormente aplicados a las plántulas de cacao mediante mochila fumigadora de 20 L (Figura 19). Finalmente, la etapa de preaclimatación tuvo una duración aproximada de 20 días.

**Figura 19.** Aplicación de insumos agrícolas las estaquillas de cacao (pre-aclimatación).

Posteriormente, las plantas iniciaron un proceso de aclimatación propiamente dicho en vivero por un tiempo aproximado de 60 días y fuera del microtúnel, donde se observó mayor cantidad de raíces y la formación de las primeras hojas verdaderas. Para ello, las bandejas conteniendo los tubetes fueron trasladadas a otra área del vivero y dispuestas sobre mesas metálicas y en las cuáles recibieron un 50 % de entrada de luz y otro 50 % de sombra. Se continuó con las mismas dosis y frecuencia de aplicación de los fertilizantes foliares aplicados durante la etapa de pre-aclimatación, los mismos que contenían macro y micronutrientes, con la finalidad de aportar al vigor de las plantas.

1. Contaminación de sustrato con $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ para ser dispuestos en bolsas almacigueras.

— Obtención del sustrato (Suelo aluvial)

Para este propósito, se procedió a realizar la colecta del suelo. El lugar de muestreo fue el distrito de Pucacaca, provincia de Picota. Se trató de un suelo aluvial, con plantas de cacao en producción. Para esta actividad, se utilizó palanas y sacos de color negro (Figura 20). Después de haber realizado la colecta del suelo, este pasó por un proceso de tamizado para eliminar rastrojos, ramillas o impurezas. Luego de culminado el tamizado del suelo, este fue esparcido dentro de las camas de cemento con el objeto de evaporar la humedad y mejorar su aireación (Figura 21).



Figura 20. Colecta de suelo agrícola, a) Toma de muestras de suelo, b) Disposición de muestras de suelo en sacos color negro.

Después de haber realizado la colecta del suelo, este pasó por un proceso de tamizado para eliminar rastrojos, ramillas o impurezas. Luego de culminado el tamizado del suelo, este fue esparcido dentro de las camas de cemento con el objeto de evaporar la humedad y mejorar su aireación (Figura 21).



Figura 21. Suelo agrícola, a) Tamizado. b) Esparcido de suelo en camas de cemento.

Seguidamente, se desinfectó el suelo colectado, y para ello, fue sometido a un proceso de solarización (Figura 22) con el objeto de minimizar la presencia de fitopatógenos y plagas agrícolas que pudiesen afectar el desarrollo de las plántulas de cacao. Se utilizó plásticos de color celeste y plástico agrícola para envolver el suelo a plenitud de las horas sol y por espacio de 7 horas al día. Este proceso duró aproximadamente 14 días. Posteriormente, el sustrato fue sometido a varios volteos después de las 48 horas de iniciado la solarización con las medidas asépticas correspondiente con el objeto de no contaminarlo, luego este proceso se repitió diariamente, con la finalidad de homogenizar el proceso de desinfección. Durante el proceso de solarización se registró dos parámetros importantes que condicionan este proceso como son la temperatura y humedad del sustrato mediante el uso de un termohigrómetro (ver Figura 23). Los datos de temperaturas y humedad del sustrato se registran en la Tabla 4.



Figura 22. Solarización de sustrato, a) 1er envolvimiento con plástico agrícola, b) 2do envolvimiento con plástico agrícola transparente, c) Disposición final del sustrato para su solarización, d) Volteo a 48 horas de iniciado el proceso de solarización.



Figura 23. Medición de T° y H° del sustrato con termohigrómetro.

Tabla 4. Temperatura y humedad del sustrato durante 10 días de solarización.

N° Días	Temperatura		Humedad	
	T° mín.	T° máx.	H° mín.	H° máx.
Día 1	33 °C	35°C	45 %	64 %
Día 2	35 °C	39 °C	38 %	50 %
Día 3	32 °C	38 °C	43 %	61 %
Día 4	31 °C	38 °C	39 %	65 %
Día 5	36 °C	37 °C	36 %	42 %
Día 6	36 °C	46 °C	25 %	45 %
Día 7	34 °C	40 °C	30 %	51 %
Día 8	30 °C	34 °C	59 %	64 %
Día 9	35 °C	41 °C	32 %	46 %
Día 10	35 °C	36 °C	36 %	50 %

Culminado el proceso de solarización, se abrió la etapa de contaminación del sustrato con hidrato de cloruro de cadmio, para esta finalidad se calculó la capacidad de campo del mismo. Se pesó en una balanza electrónica 1 Kg de sustrato, que luego fue dispuesto en un recipiente de plástico transparente (Figura 24). Después, con la ayuda de una probeta se fue añadiendo agua destilada de manera gradual, adicionándose en total 100 mL,

hasta homogenizar la mezcla, y tener una textura adecuada (sin exceso de humedad) (Figura 25). Este procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones y con el apoyo del equipo técnico del Laboratorio de suelos, aguas y foliares de la EEA El Porvenir, San Martín. Cabe señalar que, solo se usó este tipo de suelo para tratar de asemejar el criterio de los productores de la zona.



Figura 24. Pesado de suelo agrícola.



Figura 25. Aplicación de agua destilada al suelo agrícola.

Seguidamente, se procedió con la contaminación del sustrato y para este fin, se procedió de la siguiente manera:

Las dosis empleadas en el experimento fueron 0, 6 y 12 ppm de Cd. En ese sentido se procedió a realizar los siguientes cálculos matemáticos (Tabla 5).

Tabla 5. Cálculo de la cantidad de $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ para las dosis de 6 y 12 ppm.

Procedimientos	Valores numéricos y unidades
Peso molecular del $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$	201.32 g/mol
Peso molecular del Cd	112.41 g/mol
Pureza del $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$	$112.41 \cdot 100 / 201.32 = 55.8 \%$
Cantidad de $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ para diluir en 1 L de H_2O .	Para 1 ppm se necesita 1000 mg Cd. $201.31 \text{ g CdCl}_2\text{H}_2\text{O} / 112.41 \text{ g Cd} = 1.79 \text{ g CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ Se necesita 1.79 g $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ para 1 ppm de Cd en un 1 Kg suelo, entonces se disolvió 1.79 g $\text{CdCl}_2\text{H}_2\text{O}$ en un 1 L de H_2O .
Cantidad de sustrato a contaminar (cantidad de sustrato que se necesitó para ambas concentraciones de Cd fue de 120 kg).	<u>Para 6 ppm:</u> 1Kg suelo.....6 ppm 120 Kg suelo.....X $X = 720 \text{ ml Cd}$ <u>Para 12 ppm:</u> 1 Kg suelo.....12 ppm Cd 120 Kg suelo.....X $X = 1440 \text{ ml Cd}$
Capacidad de campo	1 Kg suelo.....100 ml H_2O 120 Kg suelo.....X $X = 12000 \text{ ml} = 12 \text{ L volumen total (Cd + H}_2\text{O)}$
Volumen de H_2O para 6 ppm	$12000 \text{ mL} - 720 \text{ mL Cd} = 11280 \text{ mL H}_2\text{O}$
Volumen de H_2O para 12 ppm	$12000 \text{ mL} - 1440 \text{ mL Cd} = 10560 \text{ mL H}_2\text{O}$
Cálculo de las cantidades de H_2O y Cd para 15 Kg de suelo	<u>H_2O para 6 ppm</u> 120 Kg suelo.....11280 mL H_2O 15 Kg suelo.....X $X = 1410 \text{ mL H}_2\text{O}$ <u>Cd para 6 ppm</u> 120 Kg suelo.....720 mL Cd 15 Kg suelo.....X $X = 90 \text{ mL Cd}$ <u>H_2O para 12 ppm</u> 120 Kg suelo.....10560 mL H_2O 15 Kg suelo.....X $X = 1320 \text{ mL H}_2\text{O}$

Cd para 12 ppm

120 Kg suelo.....1 440 mL Cd

15 Kg suelo.....X

X= 180 mL Cd

Después de culminar los cálculos matemáticos para determinar las dosis, se procedió posteriormente con el pesado del hidrato de cloruro de cadmio en gramos y con el uso de una balanza analítica, para su posterior dilución con agua destilada (ver Figura 26).

Seguidamente, se procedió con la contaminación del sustrato (ver Figura 27), en tal sentido, se pesó 8 veces cantidades ascendentes a 15 kg de suelo, para facilitar la manipulación de la solución y el sustrato, completándose así los 120 kg de suelo en total, luego se construyó 8 rumas de 15 kg sobre una mesa de cemento recubierta por plástico de color negro para proceder a la aplicación de las dosis y de manera manual proceder a la mezcla. Se agregó 1 410 mL de H₂O destilada y 90 mL de Cd para una dosis de 6 ppm, mezclándose el sustrato de manera uniforme hasta acabar la solución, este proceso se repitió hasta completar los 120 kg de suelo. La misma secuencia se hizo con la dosis de 12 ppm.



Figura 26. Elaboración de solución de Cd en ppm, a) Pesado del CdCl₂H₂O, b) Dilución del CdCl₂H₂O en agua destilada.

Una vez formado las rumas, se procedió a añadir las soluciones de Cd, tanto para 6 y 12 ppm. Conforme se adicionó las dosis de Cd, se procedió a mezclar manualmente conservando las condiciones de asepsia y seguridad el sustrato y la solución hasta

uniformizar la mezcla, después se procedió con el reposo del sustrato contaminado con Cd por espacio de 15 días. Durante este periodo fue el sustrato contaminado con Cd fue recubierto con plástico de color negro.



Figura 27. Contaminación de sustrato, a) Formación de rumas, b) Adición de $\text{CdCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, c) Sustrato contaminado con Cd para posterior reposo.

Culminado este proceso, se continuó con el llenado de las bolsas almacigueras con el sustrato contaminado con Cd. Las mismas, tuvieron una capacidad de hasta 3 Kg (Figura 28). En la Tabla 6, se muestra el número de bolsas y la cantidad de sustrato utilizados para los tratamientos estudiados.



Figura 28. Bolsas almacigueras conteniendo sustrato contaminado con Cd.

Tabla 6. Registros del número de bolsas y cantidad (Kg) de sustrato en las dosis de Cd estudiados.

Dosis (ppm)	Sustrato (Kg)	Nº de bolsas
0	120	48
6	120	48
12	120	48
Total	360	144

Seguidamente, las bolsas almacigueras fueron etiquetadas con cinta masking y rotuladas con plumón indeleble color rojo para un mejor monitoreo y dispuestas en bandejas rectangulares de tres colores: 12 ppm (verde), 6 ppm (rojo), y 0 ppm (celeste) (Figura 29).

Luego se procedió con el trasplante de las plántulas de cacao obtenidas por enraizamiento de estaquillas de los cuatro clones en estudio desde las bandejas forestales a las bolsas almacigueras, por lo que, fue necesario realizar hoyos con la ayuda de los tubetes al sustrato contaminado con Cd contenido en las bolsas almacigueras (Figura 30).



Figura 29. Rotulación de los tratamientos estudiados.



Figura 30. Hoyo realizado al sustrato con el uso de tubete.

Este hecho permitió que las raíces de las plántulas calcen adecuadamente con el sustrato contaminado con Cd dentro de las bolsas almacigueras (Figura 31). Los hoyos tuvieron una profundidad de 10 cm. Este procedimiento se desarrolló cuando las plántulas tenían alrededor de 110 a 120 días de edad, es decir cuando ya emitieron brotes nuevos (raíces y hojas).

Finalmente, luego de realizado el trasplante de todas las plántulas de cacao de los cuatro clones estudiados a las bolsas almacigueras, éstas fueron trasladadas y dispuestas en el vivero del Programa Nacional Café y Cacao de la EEA El Porvenir (Figura 32), donde se continuó con el experimento hasta culminar todas las evaluaciones morfológicas y fisiológicas. Durante este período las plántulas fueron abastecidas únicamente con agua destilada y semanalmente, con el objeto de no contaminarlas, impedir su deshidratación y evitar la contaminación del sustrato que contenía Cd.



Figura 31. Disposición final de los tratamientos, a) Trasplante de plántones, b) Siembra de plántones.



Figura 32. Plántones de cacao distribuidos según tratamientos en vivero.

c) Etapa de laboratorio.

—Determinación de las concentraciones de cadmio en raíces, tallos y hojas en plántulas de cacao obtenidas por enraizamiento de estaquillas.

Después de haber culminado todas las evaluaciones morfológicas, se procedió a determinar las concentraciones de Cd, procediéndose a habilitar las muestras vegetales (Figura 33), por lo que fue necesario sacrificar las plántulas de cacao de los cuatro clones estudiados, luego se colectó mediante el uso de una tijera de podar manual debidamente desinfectada muestras de tejidos vegetales como raíz, tallo y hojas. Además, las partes colectadas (raíz, tallo y hojas) pasaron por un proceso de limpieza. Las muestras de tejidos vegetales fueron colocadas en sobres de papel, los mismos que estuvieron debidamente etiquetadas para su posterior secado en estufa a una temperatura de 75 °C durante 72 horas en el laboratorio y someterlos a un proceso de molienda.

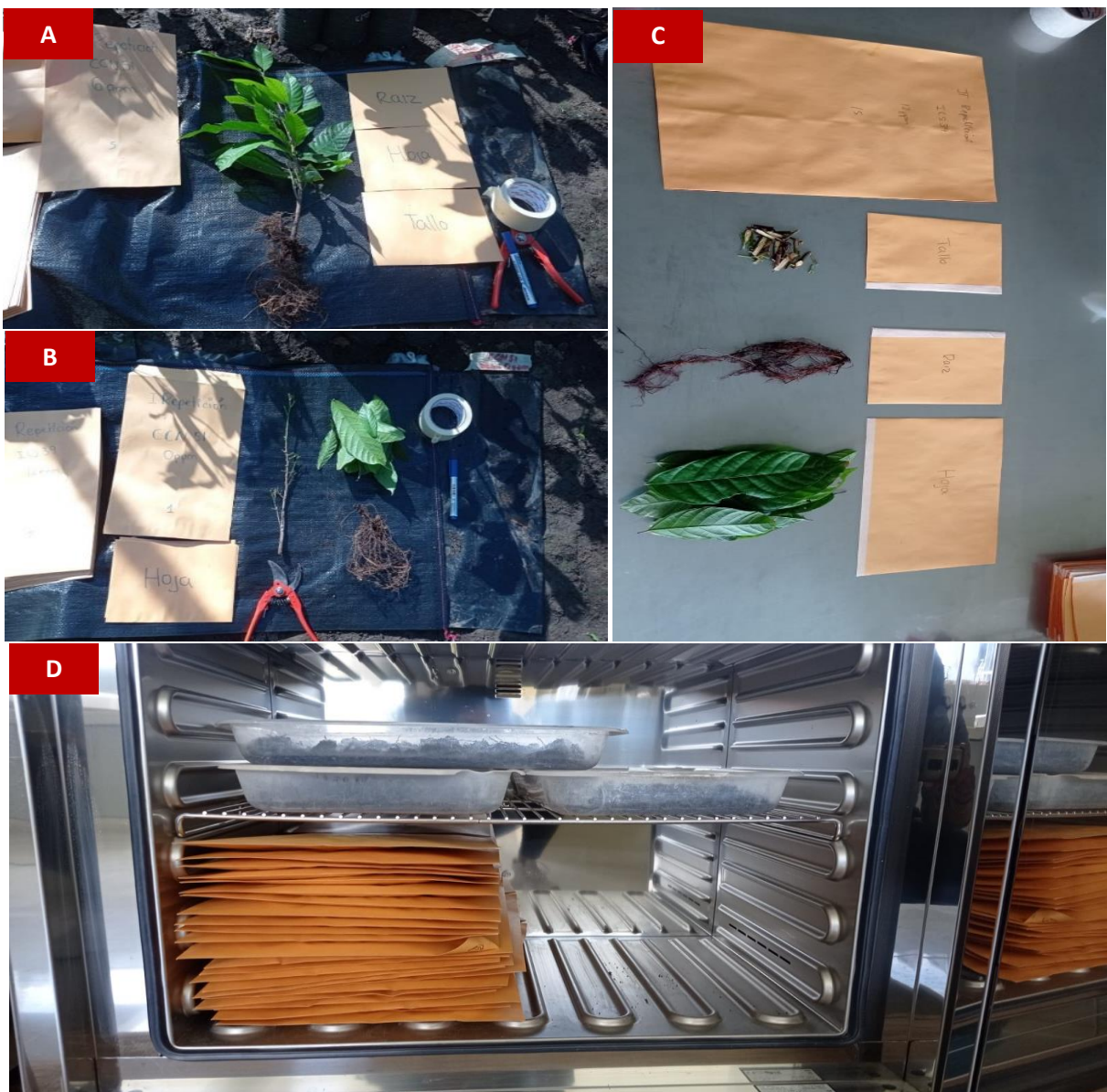


Figura 33. Habilitación de muestras vegetales para análisis en laboratorio, a) Plantones de cacao, b) Segmentación de tejidos vegetales (raíz, tallo y hojas), c) Acomodo de tejidos vegetales en sobres manila, d) Secado de los tratamientos en estufa.

Finalmente, todas las muestras de tejidos vegetales se enviaron al laboratorio de suelos, aguas y foliares de la EEA El Porvenir para su respectivo análisis mediante espectrofotometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP- AES). Se procedió a cuantificar concentración de Cd en raíces, tallos y hojas en los genotipos de cacao estudiados. El análisis de espectrofotometría, se basó en el método de determinación de Metales Totales en Suelos por MP-AES (Cd), teniéndose como referencia a la norma NTP ISO/ IEC 17025, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración. Además, la lectura de Cd se rigió en las metodologías: a) EPA Method 3050B. Revision 2. 1996. Acid Digestion of Sediments, sludges and soils y b) EPA Method 6010D. Revision 5. 2018. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, a continuación, se detalla los procesos de pretratamiento, digestión y lectura de las muestras:

- Pesamos $0.50 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ muestra de tejido vegetal seco y luego lo transferimos al vaso o tubo de digestión.
- Añadimos $5.0 \pm 0,1 \text{ mL}$ de ácido nítrico (1:1), después mezclamos la suspensión y cubrimos con una luna de reloj o tapa del tubo de digestión. Procedimos luego a calentar la muestra a $95 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ y reflujar durante 10 a 15 minutos sin hervir. Después, enfiamos la muestra y agregamos 2.5 mL de HNO_3 concentrado, luego volvimos a tapar y reflujar durante 30 minutos. En caso de generarse humos marrones (oxidación de la muestra por HNO_3) se debe repetir la adición de 2.5 mL de HNO_3 , hasta que la muestra no emita humos marrones (reacción completa con HNO_3). Seguidamente, usando una luna de reloj o tapa de digestión, se dejó que la solución se evapore.
- Después de haber completado el paso anterior agregamos 1 mL de agua y 1.5 ml de H_2O_2 al 30 %, después se cubrió el recipiente con una luna de reloj o tapa del tubo digestión y devolvimos el recipiente cubierto a la plancha de calentamiento o Hotblock para calentarlo y comenzar luego la reacción del peróxido. Se debe tener cuidado para asegurar que no ocurran pérdidas debido a efervescencia excesivamente vigorosa. Después, calentamos hasta que desaparezca la efervescencia y dejamos enfriar el recipiente.
- Seguidamente, se continuó agregando H_2O_2 al 30 % en alícuotas de 1 ml con calentamiento hasta que la efervescencia sea mínima o hasta que la apariencia general de la muestra no cambie. No se debe adicionar más de 10 mL H_2O_2 .
- El siguiente proceso consistió en cubrir la muestra con una luna de reloj o tapa del tubo de digestión y se continuó calentando el digerido de peróxido ácido hasta que el volumen se

haya reducido a aproximadamente 5 ml o también es válido calentarlo a $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin hervir durante dos horas. Finalmente, mantuvimos una cubierta de solución sobre el fondo del recipiente en todo momento.

- Luego se agregó 5 mL HCl concentrado al digerido de muestra y cubrimos con una luna de reloj o tapa de tubo de digestión. Después se colocó la muestra sobre/dentro de la fuente de calor y refluimos a $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Después de enfriar, se diluyó a 50 mL con agua. Luego, las partículas en el digestado fueron eliminados mediante filtración, centrifugación y permitiendo que la muestra se asiente.
- Diluimos luego y se volvió a analizar las muestras que superen el rango lineal de un analito (o especies necesarias para una corrección).
- Para realizar las lecturas una vez listas las muestras digeridas se enciende el equipo Espectrómetro de Emisión Atómica de plasma inducida por microondas MP - AES marca Agilent modelo 4210.
- Luego se ingresó al software del equipo MP Expert versión 1.6.2.12109, donde nos mostró todas las partes del equipo y del control de gases para el funcionamiento del mismo.
- Luego se colocó en el autosample para la curva de calibración, los estándares de Cadmio (Cd), donde se observó la formación de la curva de calibración (Tabla 7) para cada estándar junto con la intensidad que alcanza.

Tabla 7. Estándares de calibración

Tubo	Etiqueta de disolución	Cd 228.802 ppm
1	Blanco	0.0000
2	Estándar 1	0.1000
3	Estándar 2	0.5000
4	Estándar 3	1.0000
5	Estándar 4	2.0000

3.4.2. Determinar el factor de translocación del Cd en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

Cabe señalar que, el FT indica la capacidad que tiene la planta para translocar el metal desde la parte radicular hasta la parte aérea. Para la determinación y cálculo del factor de translocación (FT), las concentraciones obtenidas de Cd mediante espectrofotometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES) en cada órgano de la planta, fueron utilizadas para los cálculos matemáticos, según la fórmula adaptada por (Pachura et al.; 2016):

$$\text{FT} = \frac{\text{Concentración de metal pesado parte aérea (hojas)}}{\text{Concentración de metal pesado parte raíz}}$$

La bioacumulación define la capacidad de la planta para acumular metales pesados, teniendo en cuenta su contenido de sustrato inicial. Cuánto mayor sean los valores que adquiere, mayor es la concentración del elemento se encuentra en la biomasa vegetal en comparación con su contenido de sustrato inicial. En la Tabla 8, se muestra la escala de cuatro grados del FT, la misma que fue considerada para efectos de interpretación en la presente investigación como base para evaluar y analizar la bioacumulación de Cd.

Tabla 8. Escalas de Factor de translocación citado por (Pachura et al.; 2016)

Escala	Descripción
< 0.01	No hay acumulación
0.01 – 0.1	Baja bioacumulación
0.1 – 1.0	Bioacumulación media
> 1.0	Bioacumulación alta

3.4.3. Identificar plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas con menor capacidad de transporte de cadmio.

Según los reportes y análisis de los datos obtenidos por espectrofotometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES) del laboratorio de suelos, aguas y foliares de la EEA El Porvenir, se procedió a identificar los clones que muestren menor afinidad a la translocación del cadmio, seleccionando los genotipos tolerantes y susceptibles a este metal pesado. El reporte de los clones con menor afinidad al Cd fue presentado en el capítulo resultados del presente trabajo de investigación.

3.4.4. Evaluar los efectos del Cd tanto a nivel morfológico como en los pigmentos de clorofila en plántones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

— Análisis de efectos del Cd a nivel morfológico.

Se evaluó como variables morfológicas (Figura 34) la altura o longitud de brotes en centímetros (cm), mediante el uso de una regla metalizada teniendo en cuenta la parte basal hasta la parte apical, además se contó el número de hojas emitidas por las plántulas de cacao. Estas variables fueron evaluadas en intervalos de tiempo de 40 y 168 días después del trasplante (ddt) de las plántulas a las bolsas almacigueras que contenían el sustrato contaminado con Cd. Al final se sacrificó las plántulas de cacao con el objeto de evaluar el número de raíces al culminar el ensayo (168 días después del trasplante ddt).



Figura 34. Evaluaciones morfológicas, a) Evaluación de longitud de brote, b) Conteo del número de hojas, c) Conteo del número de raíces.

— Análisis de efectos del Cd en pigmentos de clorofila.

Se evaluó el contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total en el tejido foliar de las plántulas de cacao obtenidas por enraizamiento de estaquillas. Para esta finalidad, se realizó las siguientes actividades:

- Se procede con la desinfección y esterilizar los materiales de vidrio que fueron utilizados (tubos de ensayo de 15 mL y tubos de centrifuga de 50 mL).
- El proceso de esterilización de los materiales de vidrio, se hizo mediante el uso de una estufa a una temperatura de 50 °C por un periodo de 2 horas.
- El material vegetal (hojas), fue colectado de la parte central de la plántula. Se determinó un plantón por tratamiento.
- La obtención de las muestras (Figura 35), se inició con la colecta de las hojas a través del uso de una tijera de podar previamente desinfectado, después estas son guardadas en sobre de manila, rotulados y correctamente identificados. Además de ello, la figura presenta las siguientes divisiones: a) Hojas colectadas para medición de clorofilas, b) Envases de plástico rotulados donde se dispuso las muestras de hojas, c) Envases de plástico rotulados conteniendo las muestras de hojas, d) Pesado de hojas para análisis de clorofilas, e)

Molienda de las muestras de hojas para análisis de clorofilas, f) Adición de CaCO_3 a la molienda de las muestras de hojas.



Figura 35. Obtención de muestras para análisis de clorofila.

- Posteriormente, las hojas fueron lavadas con agua destilada y cuidadosamente secadas con franelas limpias y luego son dispuestas en recipientes de plásticos limpios que fueron previamente rotulados.
- Seguidamente, en una placa petri, se procedió a pesar 1 gr de hojas frescas y sin nervaduras en una balanza analítica de precisión.
- Luego colocamos las hojas cortadas y pesadas en un mortero de porcelana y procedimos con la molienda de las hojas, macerándolas con 20 mL de etanol al 96 %, posteriormente añadimos a la molienda una pequeña cantidad de carbonato de calcio (CaCO_3), es decir la punta de una espátula.
- Después, se dejó reposar el macerado por 2 minutos para luego transferirlo con el uso de una pipeta graduada a los tubos de la centrífuga (Figura 36).

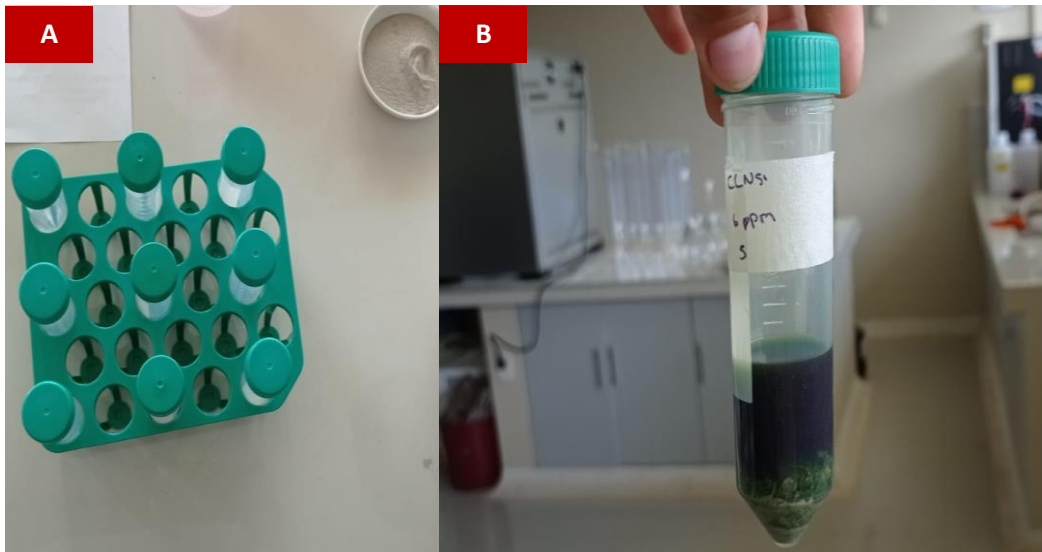


Figura 36. Disposición de muestras antes del centrifugado, a) Tubos de centrifuga, b) Tubo de centrifuga conteniendo macerado de hojas.

- Luego centrifugamos el macerado por 3 minutos a 1000 (RFC) o fuerza G (Figura 37).



Figura 37. Centrifugado de muestras foliares.

- Seguidamente, vertimos 8 mL de etanol de 96 % en los tubos de ensayo y adicionamos 2 mL de la muestra centrifugada, luego se agitó la solución con el objeto de uniformizarla.
- Hecha la dilución se dio inicio a la etapa de lectura de las muestras (Figura 38), para ello transferimos la solución a una cubeta del espectrofotómetro UV visible para la lectura de absorbancia.

- Luego, la absorbancia se leyó a 649, 665 y 654 nm de longitud de onda. Para cada lectura se equilibró el instrumento previamente con un blanco del solvente (etanol 96 %).



Figura 38. Lecturas de muestras foliares, a) Disposición en tubos de ensayo, b) Trasferencia a cubeta del espectrofotómetro UV visible, c) Introducción de cubetas al espectrofotómetro UV visible, d) Lectura de absorbancia mediante espectrofotómetro UV visible.

- Finalmente, la cantidad de clorofila presente en el extracto y tejido correspondiente fue calculada con las siguientes ecuaciones:

$$\text{mg Clor. a / g PF} = [13.7(D_{665}) - 5.76 (D_{649})] * V/1000 * W$$

$$\text{mg Clor. b / g PF} = [25.8(D_{649}) - 7.60 (D_{665})] * V/1000 * W$$

$$\text{mg Clor.a+ b / g PF} = [6.10(D_{665}) + 20.04 (D_{649})] * V/1000 * W$$

$$\text{mg Clor. total / g PF} = D_{654} * 1000 / 39.8 * V/1000 * W$$

Donde:

D: densidad óptica del extracto leído a longitud de onda indicado.

V: volumen final del extracto alcohólico.

W: peso de la muestra del tejido verde.

3.1. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.

Los datos generados fueron procesados en hojas de cálculos Excel, además para el análisis e interpretación de los mismos, se utilizó un análisis de varianza (ANVA), y un test de comparación de medias (Duncan, $P \leq 0,05$), usando el software estadístico R (R versión 4.4.1., R Core Team, 2024). Asimismo, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Finalmente, mediante el software para Sistemas de Análisis de Varianza – SISVAR (Ferreira, 2011).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuantificar la concentración de Cd en plantones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

4.1.1. Concentración de cadmio en raíz, tallos y hojas.

Las concentraciones de Cd en raíces, tallos y hojas se presentan en la Tabla 9 y Figura 39. Además, fueron sometidas a pruebas de verificación de supuestos, normalidad y homocedasticidad, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Posteriormente, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, acompañada del ajuste de Holm para comparaciones múltiples, dado a que los datos no cumplieron con estos supuestos.

Tabla 9. Concentración de Cd en órganos vegetales de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Clon	Dosis (ppm)	Cd Raíz (mg kg ⁻¹)	Cd Tallo (mg kg ⁻¹)	Cd Hojas (mg kg ⁻¹)
CCN 51	0	0.05 ± 0.01 d	0.04 ± 0.01 d	0.08 ± 0.09 d
	6	9.32 ± 11.56 abcd	7.43 ± 6.56 abcd	14.25 ± 15.81 abcd
	12	28.23 ± 9.50 a	27.32 ± 12.97 a	35.15 ± 7.05 a
IMC 67	0	0.20 ± 0.04 cd	0.14 ± 0.03 cd	0.26 ± 0.03 cd
	6	10.31 ± 6.01 abcd	11.74 ± 5.34 abcd	18.65 ± 2.38 abc
	12	11.92 ± 1.47 abc	13.52 ± 5.89 abc	21.13 ± 2.92 abc
ICS 39	0	0.93 ± 1.44 bcd	0.84 ± 1.23 bcd	0.32 ± 0.11 bcd
	6	15.92 ± 8.11 abc	29.74 ± 18.84 a	34.52 ± 13.14 a
	12	17.51 ± 6.86 ab	27.40 ± 11.45 a	28.29 ± 11.80 ab
TSH 565	0	1.29 ± 1.62 bcd	0.42 ± 0.33 bcd	0.52 ± 0.38 bcd
	6	15.99 ± 8.38 abc	21.17 ± 8.67 ab	25.07 ± 13.42 abc
	12	17.88 ± 8.38 ab	23.45 ± 10.56 a	20.84 ± 16.07 abc

Valores promedios (n = 3). Diferencias significativas (p < 0.05) usando Kruskal test. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Nuestros resultados, según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la concentración de Cd en las raíces, evidencian que el tratamiento T₃ (CCN 51 x 12 ppm) reporta la mayor concentración del metal pesado, con un valor promedio de 28.23 mg kg⁻¹, superando estadísticamente a los tratamientos T₁₂ (TSH 565 x 12 ppm) y T₉ (ICS 39 x 12 ppm) quienes concentraron un promedio de 17.88 mg kg⁻¹ y 17.51 mg kg⁻¹ de Cd respectivamente, no existiendo además diferencias estadísticas significativas en ambos tratamientos. Contrariamente, el tratamiento T₁ (CCN 51 x 0 ppm) obtuvo la menor concentración de Cd en

raíces, con un valor promedio de 0.05 mg kg^{-1} . Para la concentración de Cd en los tallos, nuestros resultados sugieren que, los tratamientos T₈ (ICS 39 x 6 ppm), T₉ (ICS 39 x 12 ppm), T₃ (CCN 51 x 12 ppm), T₁₂ (TSH 565 x 12 ppm) y T₁₁ (TSH 565 x 6 ppm) obtuvieron las mayores concentraciones de Cd, con valores promedios de 29.74 mg kg^{-1} , 27.40 mg kg^{-1} , 27.32 mg kg^{-1} , 23.45 mg kg^{-1} y 21.17 mg kg^{-1} respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. En contraste, el tratamiento T₁ (CCN 51 x 0 ppm) mostró los niveles más bajos en la concentración de Cd, con un valor promedio de 0.04 mg kg^{-1} .

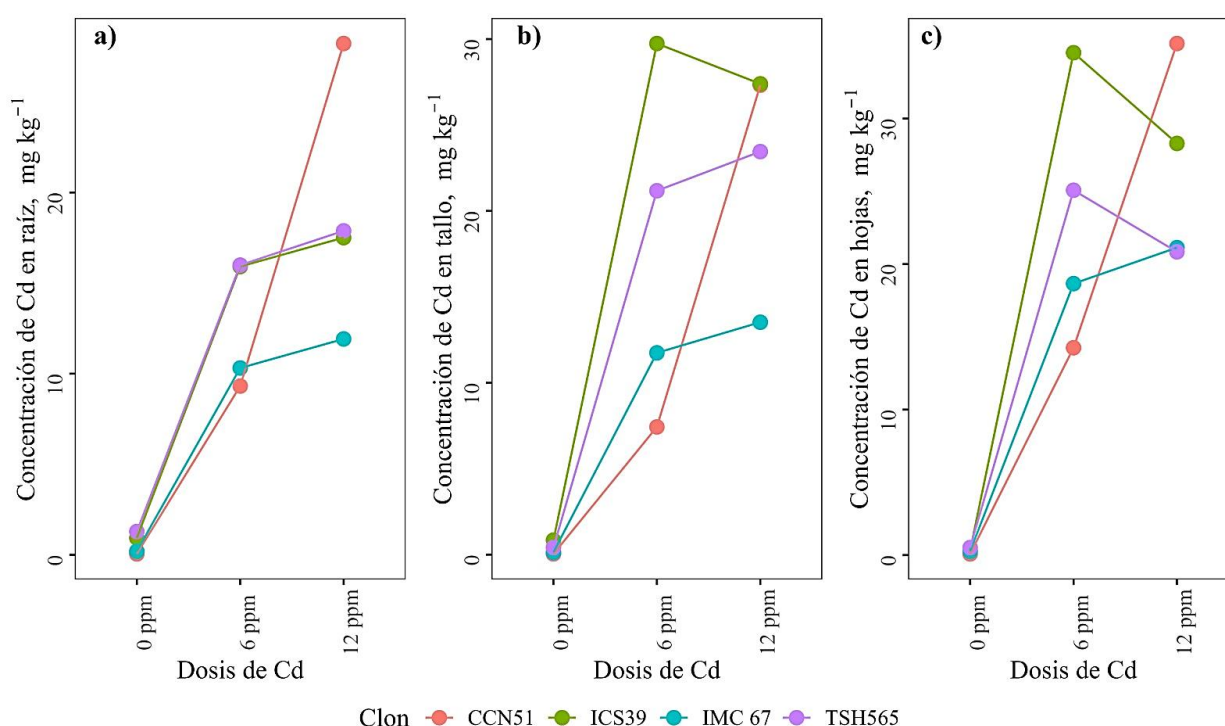


Figura 39. Contenido de Cd en órganos vegetales, a) raíz, b) tallo y c) hojas en los tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Finalmente, la mayor concentración de Cd en hojas, se evidencia en los tratamientos T₃ (CCN 51 x 12 ppm) y T₈ (ICS 39 x 6 ppm) con promedios de 35.15 mg kg^{-1} y 34.52 mg kg^{-1} respectivamente, no existiendo diferencias estadísticas significativa en ambos tratamientos. Por el contrario, el tratamiento T₁ (CCN 51 x 0 ppm) fue el que reportó el menor contenido de Cd en hojas, con un valor promedio de 0.08 mg kg^{-1} .

Estos hallazgos, difieren con los encontrados por Arévalo-Hernández et al.; (2020) quienes realizaron un experimento en vivero con 53 genotipos de cacao silvestres y domesticados, con el objeto de evaluar su respuesta al Cd en términos de crecimiento y acumulación del metal pesado y nutrientes esenciales. En tal sentido, reportan que los clones

ICS 39, CCN 51 y TSH 565 son genotipos de baja concentración de Cd a nivel de brotes (tallos y hojas). Por el contrario, en nuestro estudio se reporta que dichos genotipos acumulan altas concentraciones de Cd, presentando mayor tolerancia al metal, contexto que podría vincularse a la presencia de la proteína TcNRAMP5 responsable de desempeñar un papel en la regulación de la absorción de Cd en plantas de cacao (Ullah et al.; 2018; Moore et al.; 2020). Posiblemente, esta proteína también influyó en el comportamiento fisiológico de los genotipos ICS 39, CCN 51 y TSH 565, al activar niveles de tolerancia al Cd, permitiendo su bioacumulación. Sin embargo, la información sobre la función específica de los genes transportadores en plantas de cacao es todavía limitada, así como los mecanismos reguladores de la translocación del Cd a los demás compartimentos de la planta, según Fernández – Paz et al.; (2021).

Algunas especies o genotipos de plantas pueden tolerar altas concentraciones de metales pesados en el suelo al impedir que estos elementos entren en las raíces o mediante su volatilización a través de las estomas (Peer et al.; 2005; He et al.; 2015), sin embargo, este no es el caso para los genotipos de cacao del presente estudio, porque nuestra investigación advierte que las concentraciones de Cd en las plántulas de cacao estudiadas fueron directamente proporcionales al aumento de las dosis de Cd en el suelo utilizado como sustrato, en tal sentido, estos hallazgos se alinean con otros estudios en las cuales reportan que entre el 50 y el 72 % de la variaciones en las concentraciones de Cd en los granos de cacao se explican por la concentración de Cd disponible en el suelo (Chávez et al.; 2015; Ramtahal et al.; 2015; Gramlich et al.; 2018; Argüello et al.; 2019). Asimismo, la influencia de factores ambientales como temperatura, humedad relativa y horas de sol podrían influir también en los resultados.

Las conclusiones sobre los contenidos de Cd en las diferentes partes de las plantas de cacao varían considerablemente entre los autores, en ese sentido, Barraza et al.; (2017), reportaron los contenidos más alto de Cd en las hojas, en comparación con la cáscara de la mazorca o los granos. Contrariamente, Chávez et al.; (2015), informaron que los contenidos más altos de Cd se encontraron en los frutos y las concentraciones más bajas en las hojas. En un estudio controlado Correa et al.; (2021) observaron concentraciones de Cd más bajas en comparación con nuestros hallazgos, es decir, para una concentración de Cd en el suelo de 10 mg Kg^{-1} reportaron concentraciones foliares que oscilaron entre 13.55 ± 2.46 y $20.52 \pm 2.26 \text{ mg Kg}^{-1}$. Asimismo, Zacariyya et al.; (2022), informaron niveles de Cd de 4.86 mg Kg^{-1} en raíces y 13.53 mg Kg^{-1} en brotes a una concentración de Cd de 8 ppm. Además, Arévalo-Hernández et al. (2020) documentaron una concentración de Cd significativamente menor de $0.43 \pm 0.02 \text{ mg Kg}^{-1}$ en brotes (tallos y hojas) del clon CCN 51 cuando se sometieron a 25 mg Kg^{-1} de contaminación de Cd en el suelo. Finalmente, nuestro estudio registró valores

considerablemente más altos en los genotipos de cacao estudiados cuando se expusieron a 12 ppm de contaminación por Cd, con concentraciones promedio de 18.88 mg Kg⁻¹ en raíces, 22.92 mg Kg⁻¹ en tallos y 26.35 mg Kg⁻¹ en hojas.

4.2. Determinar el factor de translocación (FT) del Cd en plántulas de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas.

El factor de translocación del Cd de los tratamientos estudiados, se presentan en la Tabla 10 y Figura 40. Complementariamente, el factor de translocación fue sometido a pruebas de verificación de supuestos, normalidad y homocedasticidad, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Posteriormente, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, acompañada del ajuste de Holm para comparaciones múltiples, dado a que los datos no cumplieron con estos supuestos.

Tabla 10. Factor de translocación (FT) del Cd de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Clon	Dosis	FT
CCN 51	0 ppm	2.71 ± 2.31 a
	6 ppm	3.27 ± 1.15 a
	12 ppm	2.24 ± 0.20 a
IMC 67	0 ppm	2.08 ± 0.49 a
	6 ppm	3.54 ± 1.88 a
	12 ppm	2.99 ± 1.06 a
ICS 39	0 ppm	3.59 ± 3.09 a
	6 ppm	4.16 ± 0.44 a
	12 ppm	3.18 ± 0.84 a
TSH 565	0 ppm	1.24 ± 0.63 a
	6 ppm	2.98 ± 0.30 a
	12 ppm	2.43 ± 0.49 a

FT = Factor de translocación

Valores promedios (n = 3). Diferencias significativas (p < 0.05) usando Kruskal test. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas.

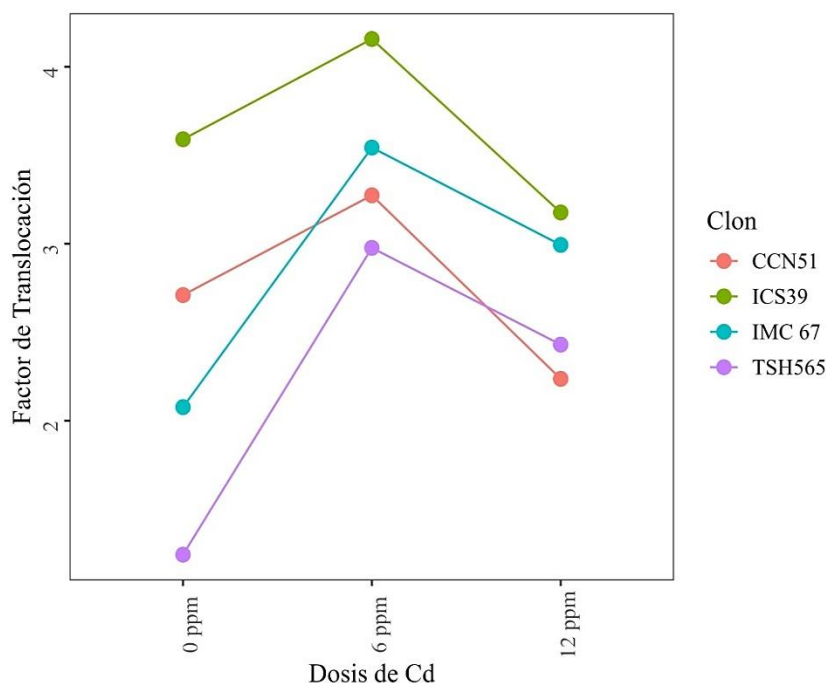


Figura 40. FT de los tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Teniendo en cuenta que el FT expresa la capacidad de los genotipos de cacao seleccionados para transportar Cd desde la raíz a las partes aéreas (De Almeida et al., 2022), podemos advertir que las plántulas estudiadas, particularmente del genotipo ICS 39 (Tabla 10) inoculados a la dosis media de Cd (6 ppm), exhibieron una mayor translocación de Cd desde las raíces a las partes aéreas. Según Mingorance et al.; (2007), un $FT > 1$, indica que los órganos de la planta de cacao están enriquecidos con Cd. En nuestro estudio, según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, no existió diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en relación al FT, sin embargo, el tratamiento T₈ (ICS 39 x 6 ppm), reporta el valor más alto (4.16), en tal sentido, nuestros resultados se alinean a los encontrados por Ortiz-Álvarez et al. (2023), quienes al evaluar la acumulación de Cd en tres progenies de cacao (IMC 67 x PA 121, SCA 6 X PA 121 e IMC 67) reportan un FT superior a 4, indicando que las partes aéreas de estos genotipos de cacao estaban enriquecidos significativamente con Cd. Para Galvis et al.; (2023), los distintos genotipos de cacao, muestran diferentes niveles de eficiencia en la translocación del Cd, como lo fue para el genotipo EET 61, quien mostró un FT alto de Cd en los brotes en comparación con otros genotipos, indicando un mayor movimiento del metal desde las raíces a los brotes en un periodo de tiempo.

4.3. Identificar plantones de *Theobroma cacao* obtenidos mediante enraizamiento de estaquillas con menor capacidad de transporte de cadmio.

En la Tabla 11 se presenta las concentraciones de Cd de los genotipos de cacao estudiados. Después de tener en cuenta los compartimentos de las plantas (raíces, tallos y hojas) como submuestras específicas (efecto aleatorio), los contenidos de Cd de las plantas mostraron diferencias significativas entre los genotipos estudiados.

Tabla 11. Medias marginales del contenido de Cd (mg Kg^{-1}) en diferentes genotipos. R^2_m y R^2_c representan las proporciones de varianza explicadas por el efecto fijo (genotipo) y por el modelo mixto, respectivamente.

Dosis	CCN 51		ICS 39		IMC 67		TSH 565		R^2_m	R^2_c	$F_{3,30}$	P
0 ppm	0.042	± 0.01 b	0.257	± 0.08 a	0.190	± 0.06 a	0.412	± 0.14 a	0.500	0.500	11.60	0.000
6 ppm	10.33	± 4.16 b	26.73	± 4.16 a	13.57	± 4.16 b	20.75	± 4.16 ab	0.257	0.367	4.737	0.008
12 ppm	30.23	± 3.37 a	24.40	± 3.37 ab	15.52	± 3.37 b	20.72	± 3.37 ab	0.253	0.315	4.308	0.012

Con la dosis 0 ppm, los modelos de regresión lineal no lograron ajustarse correctamente a los datos. Sin embargo, nuestros resultados refieren que, en la dosis intermedia de Cd (6 ppm), se observaron mayores contenidos del metal pesado en plántulas del genotipo ICS 39 con una concentración promedio de 26.73 mg Kg^{-1} , en comparación con las progenies de los genotipos IMC 67 y CCN 51 quienes concentraron menor promedio de Cd (13.57 y 10.33 mg Kg^{-1} respectivamente). Por el contrario, en la dosis más alta de Cd (12 ppm), se observaron mayores contenidos del metal en las progenies del genotipo CCN 51, con una concentración promedio de 30.23 mg Kg^{-1} en comparación con las progenies del genotipo IMC 67 quien concentró la menor cantidad de Cd (15.52 mg Kg^{-1}).

En tal sentido, ante los resultados obtenidos en la presente investigación, advertimos que el genotipo IMC 67, fue el clon de cacao quien transportó (acumuló) la menor cantidad de Cd cuando fue expuesto tanto a la dosis media (6 ppm) como el alta (12 ppm) en comparación a los otros genotipos estudiados. En tal sentido, nuestros resultados se alinean con los encontrados por Ortiz-Álvarez et al.; (2023), quienes reportan una reducción en la acumulación de Cd en los tres órganos de las plantas (raíz, tallo y hoja) del genotipo IMC 67, por lo que evidenciaron una disminución del 29.03% en la acumulación total del Cd en la planta. De manera similar, Lewis et al.; (2018) clasificaron al genotipo IMC 67, como una especie de cacao de baja acumulación de Cd debido a múltiples factores regulatorios durante el transporte del Cd desde el suelo hacia las raíces, brotes y semillas del cacao, mediados posiblemente por la presencia de proteínas transportadoras. Para Moore et al.; (2020), la expresión de proteínas

transportadoras específicas también podría explicar las variaciones en la captación y acumulación del Cd en diferentes genotipos de cacao.

Por el contrario, nuestros hallazgos difieren con los encontrados por Arévalo-Hernández et al. (2020), quienes en un estudio controlado documentaron que los clones CCN 51, TSH 565 e ICS 39 son genotipos de baja acumulación de Cd (concentración media de $1.38 \pm 0.22 \text{ mg Kg}^{-1}$) y que podrían ser potencialmente útiles para reducir la absorción de Cd al utilizarlos como portainjertos. Sin embargo, en nuestro estudio los clones CCN 51, ICS 39 y TSH 565 fueron los genotipos que más concentraron Cd con promedios de 30.23, 24.40 y 20.72 mg Kg^{-1} respectivamente.

4.4. Evaluar los efectos del Cd tanto a nivel morfológico como en los pigmentos de clorofila en plántulas de *Theobroma cacao* obtenidos por enraizamiento de estaquillas

4.4.1. Análisis de efectos del cadmio a nivel morfológico.

Las variables consideradas para evaluar los efectos morfológicos en el presente estudio fueron la longitud de brotes y el número de hojas evaluados a los 40 y 168 ddt. Asimismo, se evaluó el número de raíces a los 168 ddt.

4.4.1.1 Longitud de brote evaluado a los 40 y 168 ddt.

Los resultados del análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud de brote expresados en la Tabla 12, muestran que no existe un efecto significativo para la interacción entre los diferentes clones de cacao y las concentraciones de Cd, según la prueba F ($p < 0,05$) durante las evaluaciones realizadas a los 40 ddt de las plántulas de cacao a las bolsas almacigueras que contenían el sustrato contaminado con Cd. Además, el coeficiente de variabilidad fue de 25.02 %. Asimismo, para la misma variable evaluado a los 168 ddt, se advierte un efecto significativo de la interacción entre los diferentes clones de cacao con las concentraciones de Cd. El coeficiente de variabilidad fue 20.42 %.

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable Longitud de brote (cm) evaluada a los 40 y 168 ddt.

FV	GL	CM Longitud de brote (40 ddt)		CM Longitud de brote (168 ddt)	
Clon	3	4.330	*	48.593	*
Dosis	2	3.491	*	13.828	NS
Clon*Dosis	6	1.898	NS	35.855	*
Error	24	0.929		11.503	
CV (%)		25.02		20.42	

*- Significativo al 5 %, - NS No significativo, según la prueba de F.

El análisis del efecto principal para los clones respecto a la variable longitud de brote evaluado a los 40 ddt, se presenta en la Tabla 13. Se destacan diferencias estadísticas significativas entre los clones. El clon TSH 565 exhibió el mayor promedio de longitud de brote, alcanzando un valor de 4.60 cm, seguido por el clon IMC 67, con un promedio de 4.24 cm. En contraste, el clon CCN 51 mostró el menor promedio con 3.06 cm, según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 13. Efecto principal para clones respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.

Clones	Medias Longitud de brote (cm)	Grupos
TSH 565	4.60 \pm 1.37	a
IMC 67	4.24 \pm 1.28	ab
ICS 39	3.51 \pm 0.76	bc
CCN 51	3.06 \pm 0.99	c

Letras minúsculas diferentes en la columna difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

Asimismo, el mismo análisis para las dosis respecto a la variable longitud de brote evaluado a los 40 ddt, se presenta en la Tabla 14. En tal sentido, se advierten diferencias estadísticas significativas entre las dosis de Cd, donde la dosis 6 ppm estimuló mayor longitud de brote con un promedio de 4.18 cm. En contraste, la dosis donde no se aplicó Cd (0 ppm), la longitud de brote generó un valor promedio de 3.23 cm, según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 14. Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.

Dosis	Medias Longitud de brote (cm)	Grupos
0 ppm	3.23 \pm 0.84	b
6 ppm	4.18 \pm 0.87	a
12 ppm	4.15 \pm 1.66	a

Letras minúsculas diferentes en la columna difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

La longitud de brote evaluado a los 168 ddt, se presenta en la Tabla 15, donde advertimos diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados (clon x dosis). Según la prueba de Duncan, los tratamientos T₈ (ICS 39 x 6 ppm) y T₁₂ (TSH 565 x 12 ppm), generaron los mayores promedios de longitud de brote con 21.88 y

20.75 cm respectivamente. En contraste el tratamiento T₁ (CCN 51 x 0 ppm) evidenció el menor promedio respecto a la longitud de brote (11.46 cm).

Tabla 15. Longitud de brote (cm) en los diferentes tratamientos (clon x dosis), evaluados a los 168 ddt.

Clon	Dosis	Longitud de brote, (cm) 168 ddt
CCN51	0 ppm	11.46 ± 2.31 c
	6 ppm	17.25 ± 0.99 abc
	12 ppm	16.58 ± 1.66 abc
IMC 67	0 ppm	12.49 ± 3.24 c
	6 ppm	15.04 ± 3.45 bc
	12 ppm	15.04 ± 1.82 bc
ICS39	0 ppm	20.13 ± 2.67 ab
	6 ppm	21.88 ± 2.17 a
	12 ppm	12.48 ± 6.30 c
TSH565	0 ppm	19.09 ± 2.53 ab
	6 ppm	17.13 ± 2.74 abc
	12 ppm	20.75 ± 6.14 ab

Valores promedios (n = 3). Diferencias significativas (p < 0.05) usando Duncan test. Letras diferentes indican diferencias significativas.

De acuerdo con el análisis de correlación entre los clones estudiados y las dosis de Cd, para la longitud de brotes evaluado a los 168 ddt, se verificó que los tratamientos (clon x dosis), provocaron tendencia lineal significativa (p < 0,05) en el clon ICS 39, excepto para los clones CCN 51, IMC 67 y TSH 565, donde la longitud de brote evidenció una tendencia lineal no significativa (Figura 41).

De este modo, la dosis de Cd de hasta 12 ppm, generó mayores promedios de longitud de brote en los clones TSH 565 y CCN 51, con valores de 20.75 y 16.58 cm respectivamente. En contraste, el clon ICS 39 obtuvo el menor promedio de longitud de brote con un valor de 12.48 cm. Respecto a la dosis 6 ppm, el clon ICS 369 reporta la mayor longitud de brote, con un promedio de 21.88 cm, seguido del clon CCN 51, con un valor de 17.25 cm. Contrariamente, el clon IMC 67, advierte la menor longitud de brote, con un valor de 15.04 cm.

Finalmente, donde no se aplicó ninguna dosis de Cd (0 ppm), los clones ICS 39 y TS 565 no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto a la longitud de brote, con promedios de 20.13 y 19.09 cm respectivamente. Sin embargo, fueron superiores a los clones IMC 67 y CCN 51, quienes reportan los promedios más bajos respecto a la variable longitud de brote, con valores de 12.49 y 11.46 cm respectivamente.

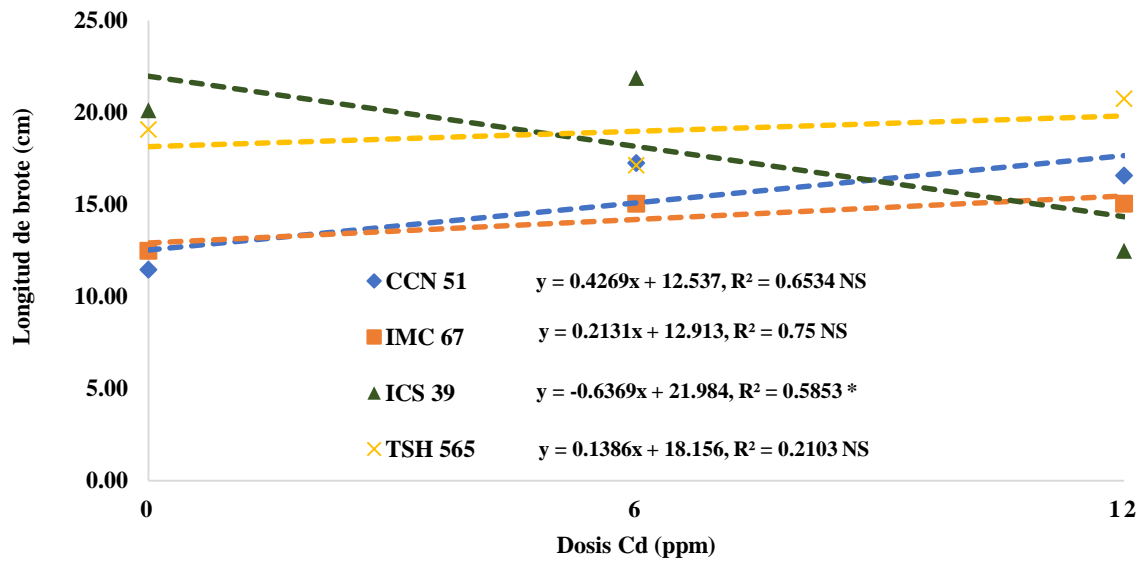


Figura 41. Longitud de brote en los clones de cacao CCN 51, IMC 67, ICS 39 y TSH 565 por efecto de tres dosis de Cd (0, 6 y 12 ppm), evaluado a los 168 ddt.

Algunas especies o genotipos de plantas pueden tolerar altas concentraciones de metales pesados en el suelo al impedir que estos elementos entren en las raíces o mediante su volatilización a través de las estomas (Peer et al.; 2005; He et al.; 2015). Según nuestros resultados obtenidos, el Cd a una dosis de 12 ppm afectó negativamente la longitud de los brotes del clon ICS 39 evaluado a los 168 ddt, es decir, se evidenció una disminución progresiva en la longitud de los brotes conforme la concentración de Cd aumentaba, observándose un efecto adverso con el aumento de las dosis de Cd. Estos resultados son consistentes con los reportados por Fernández–Paz et al.; (2021), quienes documentaron una disminución significativa en la biomasa, la longitud de los brotes y el área foliar, cinco meses después del establecimiento de progenies de cacao de los genotipos IMC 67 y PA 121 en un sustrato de invernadero que contenía $7.49 \text{ mg Cd Kg}^{-1}$. Por el contrario, las respuestas a la longitud de los brotes de los otros clones estudiados fueron positivas o no significativas, como fue el caso de los clones TSH 565 y CCN 51 al ser sometidos a la dosis de 12 ppm mostraron mayor desarrollo de brotes. Estos hallazgos también concuerdan con los obtenidos por Gramlich et al.; (2017) aún en condiciones de campo, quienes al realizar estudios en sistemas de cultivo de cacao asociados al manejo orgánico y convencional en agroforestería o monocultivo; reportaron que, si bien no encontraron diferencias significativas para Cd y Zn en hojas y granos, el clon TSH 565 absorbió más Cd en relación con ICS 1 bajo un sistema de

monocultivo. El impacto del Cd en el crecimiento del cacao está condicionado por factores como las propiedades del suelo y la tolerancia genética de las plantas. Correa et al.; (2021) señalaron que el contenido de potasio en el suelo puede favorecer la acumulación de biomasa vegetal incluso en presencia de Cd. Nuestros resultados sugieren que los genotipos CCN 51, IMC 67 y TSH 565, continuaron su desarrollo de manera positiva, especialmente cuando se inocularon con la dosis más alta de Cd, por lo que este comportamiento podría atribuirse al tipo de sustrato utilizado en el presente estudio (suelos aluviales), que se caracterizan por presentar niveles adecuados de nutrientes claves (nitrógeno, fósforo y potasio) (Ilinskiy et al.; 2024) para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Finalmente, para la longitud de los brotes evaluada a los 40 ddt, no se evidenció interacción entre los clones estudiados y las dosis de Cd, según los resultados del análisis de varianza (Tabla 12).

4.4.1.2 Número de hojas evaluado a los 40 y 168 ddt.

Los resultados del análisis de varianza (ANVA) para la variable número de hojas expresados en la Tabla 16, muestran que no existe un efecto significativo para la interacción entre los diferentes clones de cacao y las concentraciones de Cd, según la prueba F ($p < 0,05$) durante las evaluaciones realizadas a los 40 ddt de las plántulas de cacao a las bolsas almacigueras que contenían el sustrato contaminado con Cd. Además, el coeficiente de variabilidad fue de 32.72 %. Asimismo, para la misma variable evaluado a los 168 ddt, también se advierte que no existe un efecto significativo de la interacción entre los diferentes clones de cacao con las concentraciones de Cd. El coeficiente de variabilidad fue 17.08 %.

Tabla 16. ANVA para la variable Número de hojas evaluado a los 40 ddt y 168 ddt.

FV	GL	CM Número de hojas (40 ddt)	CM Número de hojas (168 ddt)
Clon	3	0.506 NS	38.012 **
Dosis	2	1.130 NS	6.210 NS
Clon*Dosis	6	0.677 NS	6.284 NS
Error	24	0.368	5.773
CV (%)		32.72	17.08

** - Significativo al 1 y 5 %, -NS, no significativo, según la prueba de F.

El análisis del efecto principal para los clones en relación con la variable número de hojas evaluado a los 40 ddt, se presenta en la Tabla 17. No se destacan diferencias estadísticas significativas entre los clones, los mismos que, mostraron igual

comportamiento respecto a esta variable, según los resultados obtenidos de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 17. Efecto principal para clones respecto a la variable número de hojas, evaluada a los 40 ddt

Clones	Medias Número de hojas		Grupos
TSH 565	2.19	± 0.80	a
CNN 51	1.83	± 0.79	a
ICS 39	1.72	± 0.48	a
IMC 67	1.67	± 0.64	a

Letras minúsculas iguales en la columna no difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

Asimismo, el mismo análisis para las dosis respecto a la variable número de hojas evaluado a los 40 ddt, se presenta en la Tabla 18. En tal sentido, no se advierten diferencias estadísticas significativas en la longitud de brotes por efecto de las dosis de Cd, según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla 18. Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 40 ddt.

Dosis	Medias Número de hojas		Grupos
0 ppm	1.52	± 0.61	a
6 ppm	2.13	± 0.43	a
12 ppm	1.92	± 0.87	a

Letras minúsculas diferentes en la columna difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

El análisis del efecto principal para los clones en relación con la variable número de hojas evaluado a los 168 ddt se presenta en la Tabla 19. Se destacan diferencias estadísticas significativas entre los clones, es decir el clon CCN 51 exhibió el mayor promedio de número de hojas, alcanzando un valor de 16, seguido por el clon TSH 565, con un promedio de 14 hojas. En contraste, el clon IMC 67 mostró el menor promedio con un valor de 12 hojas, según los resultados obtenidos de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 19. Efecto principal para clones respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 168 ddt.

Clones	Medias Número de hojas		Grupos
CCN 51	16.81	±1.72	a
TSH 565	14.44	±2.81	b
ICS 39	12.83	±2.64	b
IMC 67	12.19	±2.41	b

Letras minúsculas diferentes en la columna difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

El mismo análisis para las dosis respecto a la variable número de hojas evaluado a los 168 ddt, se presenta en la Tabla 20. En tal sentido, no se advierten diferencias estadísticas significativas en la longitud de brotes por efecto de las dosis de Cd, según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 20. Efecto principal para dosis respecto a la variable longitud de brote, evaluada a los 168 ddt.

Dosis	Medias Número de hojas		Grupos
0 ppm	14.67	±3.07	a
6 ppm	13.27	±2.73	a
12 ppm	14.27	±3.08	a

Letras minúsculas diferentes en la columna difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad.

Según el análisis de varianza, para la variable número de hojas evaluada tanto a los 40 y 168 ddt (Tabla 16), no se reporta una interacción significativa entre las dosis de Cd y los clones estudiados. Además, al hacer un análisis de efecto principal para los clones respecto al número de hojas evaluada a los 40 ddt se observa que no hubo diferencias estadísticas significativas. La misma tendencia se advierte en relación a las dosis, donde al hacer un análisis de efecto principal, se descarta diferencias estadísticas significativas. Adicionalmente, se hizo el mismo análisis para la variable número de hojas evaluada a los 168 ddt en los clones estudiados, donde se observó que el clon CCN 51 mostró el mayor número de hojas, con un promedio de 16, seguido del TSH 565, con 14 hojas en promedio. En contraste, el clon IMC 67 obtuvo el menor promedio (12 hojas). El mismo análisis respecto a las dosis, evidenció que no existió significancia en el número de hojas. En tal sentido, nuestros resultados sugieren que los clones estudiados mostraron un buen desempeño fisiológico respecto a las dosis de Cd, favoreciendo el desarrollo de hojas, por lo que, las plantas de cacao exhiben una

notable resistencia a la exposición al Cd, atribuidos a varios factores como los fisiológicos y genéticos, en ese sentido, algunos genotipos de cacao demuestran una alta tolerancia al Cd, incluso bajo una concentración significativa (Galvis et al.; 2023). Castro et al.; (2015), estudiaron plántulas de cacao obtenidas por autofecundación del genotipo Catongo – Catongo y un híbrido resultante del cruce de los genotipos CCN51 × SCA6, que fueron sometidas a diferentes dosis de Cd (2, 4, 8, 16 y 32 mg Kg⁻¹), reportando que el Cd causó cambios morfológicos, bioquímicos, moleculares y ultraestructurales en ambas progenies. Sin embargo, Zakariyya et al.; (2022) encontraron que las concentraciones de Cd de hasta 8 mg Kg⁻¹ no afectan negativamente el crecimiento del cacao.

4.4.1.3 Número de raíces evaluado a los 168 ddt.

Para la evaluación del número de raíces se consideró las raíces primarias y secundarias, así como los pelos absorbentes. Los resultados del análisis de varianza (ANVA) para la variable Número de raíces, expresados en la Tabla 21, muestran que existe un efecto altamente significativo para la interacción entre los diferentes clones de cacao y las concentraciones de Cd, según la prueba F ($p \leq 0,05$) durante las evaluaciones realizadas a los 168 ddt de las plántulas de cacao a las bolsas almacigueras que contenían el sustrato contaminado con Cd. Además, el coeficiente de variabilidad fue de 19.65 %.

Tabla 21. Análisis de varianza para la variable Número de raíces evaluada a los 168 ddt.

FV	GL	CM Números de Raíces (168 ddt)
Clon	3	19.296 *
Dosis	2	95.583 **
Clon*Dosis	6	23.880 **
Error	24	6.361
CV (%)		19.65

**, -Significativo a 1 y 5 %, *- Significativo al 5 %, según la prueba de F.

El número de raíces evaluado a los 168 ddt, se presenta en la Tabla 22, donde advertimos diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados (clon x dosis). Según la prueba de Duncan, los tratamientos T₃ (CCN 51 x 12 ppm) y T₇ (ICS 39 x 0 ppm), generaron la mayor cantidad de raíces con valores de 19 y 17 respectivamente. En contraste, el tratamiento T₂ (CCN 51 x 6 ppm) evidenció el menor

promedio, con 8 raíces. De acuerdo al análisis de correlación, de manera general se verificó que los cuatro clones de cacao y las tres dosis de Cd en ppm estudiados, provocaron tendencia lineal significativa ($p < 0,05$), para la variable número de raíces en los clones CCN 51 e IMC 67, en tanto que, los clones ICS 39 y TSH 565, mostraron tendencia lineal no significativa para la misma variable (Figura 42). De este modo, la dosis de hasta 12 ppm de Cd, estimuló el mayor número de raíces en el clon CCN 51, con un valor promedio de 19, seguido del clon IMC 67 e ICS 39, ambos clones con un promedio de 15 raíces. Contrariamente, el clon TSH 565 produjo el menor promedio de raíces con un valor de 13. Respecto a la dosis 6 ppm, los clones que evidencian mayor número de raíces fueron el ICS 39 y el TSH 565 con valores de 12 y 11 respectivamente. En contraste el clon CCN 51 obtuvo 8 raíces, representando el menor promedio. Finalmente, donde no se aplicó ninguna dosis de Cd (0 ppm), los clones ICS 39 y TSH 565 presentaron la mayor cantidad de raíces, con promedios de 17 y 11 respectivamente. En contraste, el clon CCN 51 a la misma dosis de Cd, obtuvo 9 raíces, representando el menor promedio, resultados que posiblemente fueron influidos también por las propiedades físicas y químicas del suelo.

Tabla 22. Número de raíces en los diferentes tratamientos (clon x dosis), evaluado a los 168 ddt.

Clon	Dosis	Número de raíces 168 ddt
CCN51	0 ppm	9.33 ± 2.31 ef
	6 ppm	8.33 ± 3.21 f
	12 ppm	19.67 ± 1.53 a
IMC 67	0 ppm	9.67 ± 2.89 ef
	6 ppm	10.67 ± 1.15 def
	12 ppm	15.33 ± 4.04 abcd
ICS39	0 ppm	17.00 ± 3.61 ab
	6 ppm	12.33 ± 1.15 bcdef
	12 ppm	15.67 ± 2.08 abc
TSH565	0 ppm	11.67 ± 2.08 cdef
	6 ppm	11.00 ± 2.65 cdef
	12 ppm	13.33 ± 1.53 bcde

Valores promedios ($n = 3$). Diferencias significativas ($p < 0.05$) usando Duncan test. Letras diferentes indican diferencias significativas.

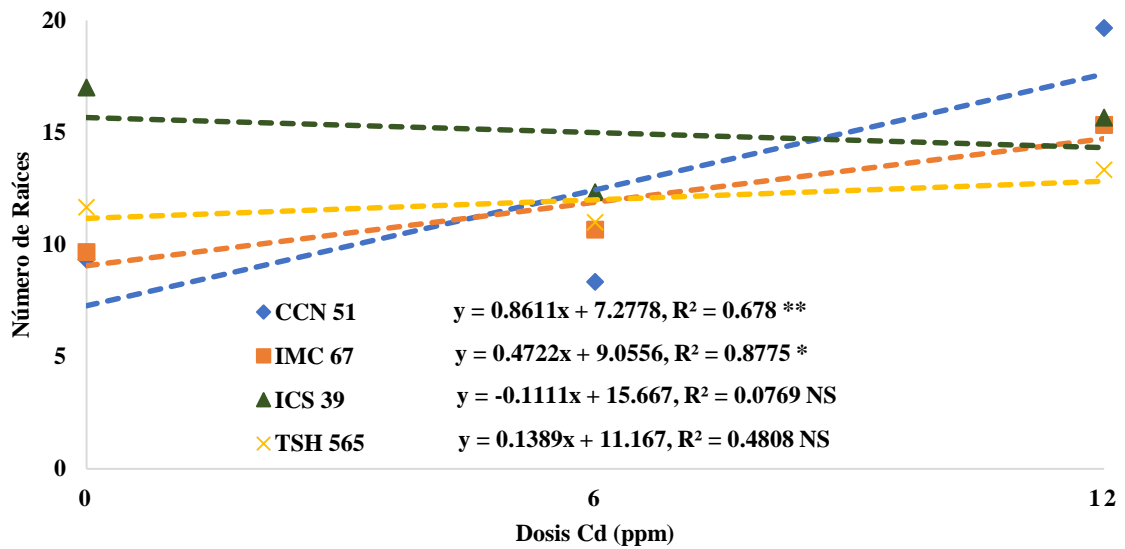


Figura 42. Número de raíces en los clones de cacao CCN 51, IMC 67, ICS 39 y TSH 565 por efecto de tres dosis de Cd (0, 6 y 12 ppm), evaluado a los 168 ddt.

Nuestros hallazgos reportan un aumento en el número de raíces con el aumento de las concentraciones de Cd (12 ppm) con relación a los clones CCN 51 e IMC 67. Tal aumento en el número de raíces con el incremento de las dosis de Cd se alinea a los hallazgos de Kahle (1993), quien señaló que la respuesta típica al daño radicular inducidos por metales pesados es un sistema de raíz pivotante más ramificado, denso y compacto. Galvis et al. (2023) informaron que algunos cultivares tienen la capacidad de acumular Cd en las raíces, optimizando su absorción y promoviendo el desarrollo de las plantas. Sin embargo, los niveles excesivos de Cd plantean riesgos tanto para la salud de las plantas como para la del consumidor, lo que resalta la necesidad de un manejo cuidadoso de este metal en los suelos agrícolas, que dependerá también de la CIC, pH y otras propiedades del suelo.

4.4.2. Análisis de efectos del cadmio en pigmentos de clorofila.

Las variables consideradas para evaluar los efectos del Cd a nivel de pigmentos en los genotipos de cacao en el presente estudio fueron las concentraciones de clorofilas. Las concentraciones de Clorofila a, clorofila b y clorofila total se presentan en la Tabla 23 y Figura 43. Las mismas fueron sometidas a pruebas de verificación de supuestos, normalidad y homocedasticidad, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Posteriormente, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, acompañada del ajuste de Holm para comparaciones múltiples, dado a que los datos no cumplieron con estos supuestos.

Tabla 23. Concentración de Clorofila a, Clorofila b y clorofila total de los diferentes tratamientos (clon x dosis), según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Clon	Dosis (ppm)	Clorofila a, (nm)	Clorofila b, (nm)	Clorofila total, (nm)
CCN 51	0	2.18 ± 0.26 a	1.13 ± 0.44 a	3.51 ± 0.74 a
	6	2.24 ± 0.18 a	1.29 ± 0.57 a	3.83 ± 0.83 a
	12	2.48 ± 0.04 a	2.07 ± 0.33 a	4.99 ± 0.42 a
IMC 67	0	2.65 ± 0.59 a	1.30 ± 0.08 a	3.85 ± 0.18 a
	6	2.40 ± 0.10 a	1.65 ± 0.55 a	4.45 ± 0.83 a
	12	2.20 ± 0.22 a	1.10 ± 0.78 a	3.62 ± 1.14 a
ICS 39	0	2.32 ± 0.01 a	1.94 ± 1.27 a	4.52 ± 1.32 a
	6	2.24 ± 0.31 a	1.29 ± 0.41 a	3.76 ± 0.83 a
	12	2.44 ± 0.13 a	1.51 ± 0.26 a	4.29 ± 0.48 a
TSH 565	0	2.30 ± 0.09 a	1.13 ± 0.24 a	3.68 ± 0.31 a
	6	2.00 ± 0.32 a	0.95 ± 0.21 a	3.13 ± 0.60 a
	12	2.11 ± 0.30 a	1.06 ± 0.43 a	3.40 ± 0.90 a

Valores promedios (n = 3). Diferencias significativas (p < 0.05) usando Kruskal test. Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas.

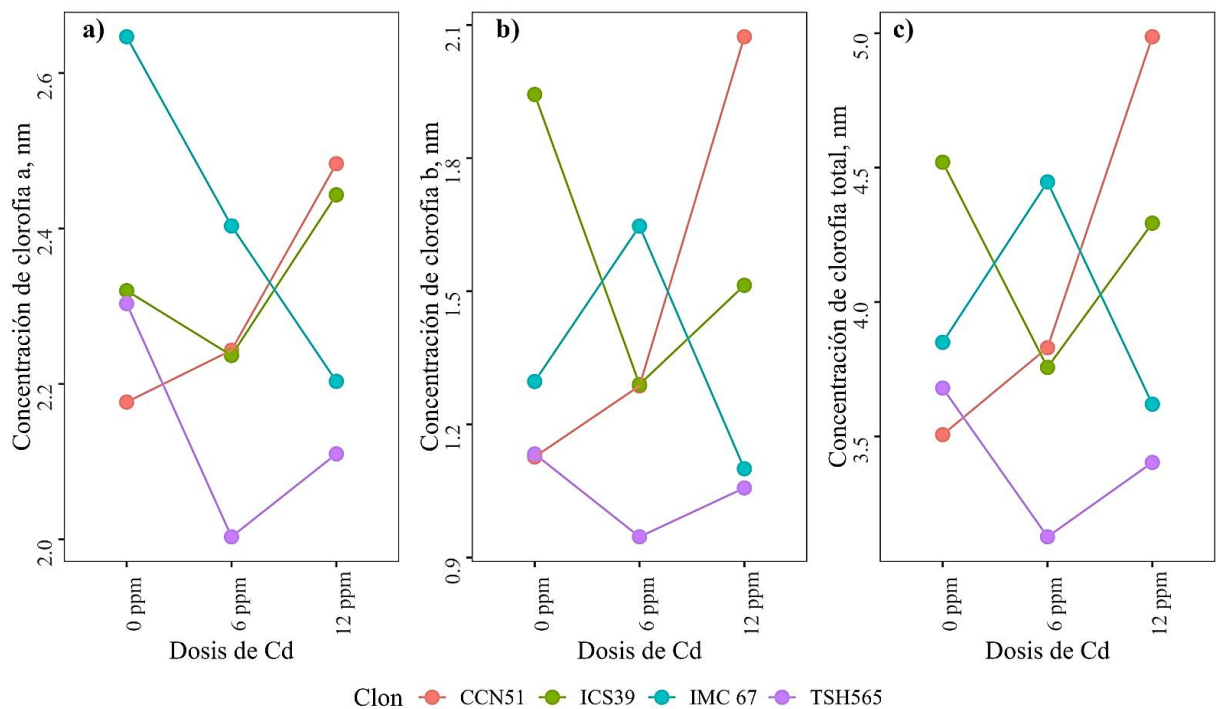


Figura 43. Concentración de clorofilas, a) Clorofila a, b) Clorofila b y c) Clorofila total de los diferentes tratamientos estudiados (clon x dosis), según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Según los resultados obtenidos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el presente estudio para la concentración de clorofila a, se evidencia que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados. Similar comportamiento, se evidenció en relación a las concentraciones de clorofila b y clorofila total, donde tampoco existió diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos estudiados. Sin embargo, advertimos que el clon CCN 51 mostró una respuesta positiva en el contenido de clorofila en concentraciones de Cd de hasta 12 mg kg^{-1} , en tal sentido, nuestros resultados sugieren que, el genotipo CCN-51 demuestra un grado de tolerancia al Cd. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Fernández-Paz et al.; (2021) en progenies de IMC 67 y PA 121 x IMC 67, bajo condiciones de invernadero y expuestos a una concentración de Cd de $7,49 \text{ mg kg}^{-1}$, donde reportaron alteraciones significativas en el contenido de pigmentos cloroplásticos en plántulas no injertadas tras cinco meses de crecimiento en suelo enriquecido con Cd. En particular, observaron un incremento significativo de clorofila a, con aumentos porcentuales del 41,6 % y 21,8 % en las progenies de IMC 67 y PA 121 x IMC 67, respectivamente. Resultados similares se reportaron para la clorofila b, con aumentos del 32 % en IMC 67 y 29 % en PA 121 x IMC 67.

La toxicidad por Cd puede afectar el rendimiento fotosintético de las plantas mediante la reducción del contenido de clorofila (Sandalio et al.; 2001). Sin embargo, los resultados sugieren que el clon CCN 51 presenta ciertos niveles de tolerancia al Cd, evidenciado por el aumento en el contenido de pigmentos cloroplásticos (clorofila b) y la aparente ausencia de daños significativos en el fotosistema II (PSII), coincidiendo con las observaciones de Fernández-Paz et al.; (2021) en progenies no injertadas de IMC 67.

V. CONCLUSIONES

1. Todos los genotipos de cacao examinados concentraron cantidades significativas de cadmio (Cd) en sus hojas (26.35 mg Kg^{-1}), brotes (22.92 mg Kg^{-1}) y raíces (18.88 mg Kg^{-1}), estas concentraciones de Cd, superaron a las informadas por otros estudios, lo que indica una notable acumulación en las plantas de cacao, principalmente en hojas, en nuestras condiciones experimentales. Entre los genotipos, el CCN 51 absorbió las mayores cantidades de Cd. Sin embargo, debido a los altos contenidos de Cd en todos los genotipos, no es posible recomendar ninguno de ellos como adecuado para el cultivo en suelos con niveles elevados de Cd, ya que todas las plantas analizadas demostraron una absorción sustancial de Cd.
2. El genotipo ICS 39 inoculado a la dosis media de Cd (6 ppm) presentó el factor de traslocación (FT) más alto, con un valor promedio de 4.16
3. El genotipo IMC 67, fue el clon de cacao quien transportó (acumuló) la menor cantidad de Cd cuando fue expuesto tanto a la dosis media (6 ppm) como a la dosis más alta (12 ppm) en comparación a los otros genotipos estudiados.
4. A nivel morfológico, el impacto del Cd respecto al crecimiento de las plantas resultó ser específico del genotipo y variable. En las dosis de 6 y 12 ppm de Cd, los genotipos CCN 51, IMC 67 y TSH 565 mostraron un aumento en la longitud de los brotes, mientras que el genotipo ICS 39 mostró una disminución en el crecimiento. Asimismo, como se esperaba, el número de raíces en las plantas aumentó con dosis más altas de Cd, lo que representa una respuesta típica de las plantas al estrés metálico, potencialmente como un mecanismo compensatorio para una mejor absorción de nutrientes y agua en condiciones de estrés.
5. Finalmente, a nivel de pigmentos de clorofila, algunos genotipos de cacao, como el clon CCN 51, no solo pueden tolerar niveles más altos de Cd, sino que podrían beneficiarse potencialmente de ellos, debido a un aumento en el contenido de clorofila. En contraste, ICS 39 parece ser más sensible al Cd, experimentando un crecimiento reducido bajo concentraciones más altas de Cd.

VI. PROPUESTAS A FUTURO

1. Se sugiere evaluar las interacciones entre el Cd y otros factores estresantes ambientales, como la sequía o las deficiencias de nutrientes, para predecir mejor la resiliencia de las plantaciones de cacao en suelos contaminados con metales.
2. Asimismo, se sugiere profundizar los estudios vinculados a los efectos de Cd sobre las plantas de cacao tanto en aspectos morfológicos como fisiológicos (clorofilas y carotenoides).
3. Se necesitan estudios a largo plazo que monitoreen los efectos de la exposición al Cd en el rendimiento del cacao, la calidad del grano y la eficiencia fotosintética a lo largo de múltiples temporadas de crecimiento para comprender el alcance completo del impacto de la contaminación por Cd en el cultivo del cacao.
4. Incluir en investigaciones a futuro un análisis de proteínas especializadas (NRAMP, ZIP, etc) vinculadas en la regulación del Cd de los genotipos de cacao.

VII. REFERENCIAS

- Almeida, A.-A. F., Gomes, L. M. C., Souza, V. L., Valle, R.R., 2013. Morphophysiological, Biochemical, Ultrastructural and Molecular Responses of Cadmium Toxicity in Plants. In: Mirza, Hasanuzzaman, Masayuki, Fujita (Eds.), Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, pp. 36–76.
- Almeida, A.-A. F., Mielke, M. S., Gomes, F.P., Gomes, L. M. C., Mangabeira, P.A.O., Valle, R.R., 2010. Handbook of Phytoremediation, Phytoremediation of Cd. In: Ivan A., Golubev (Ed.), Pb and Cr by Woody Plants, 1. Nova Science Publishers, Environmental Science. Engineering and Technology, pp.529–550.
- Alverson W. S., B. A. Whitlock, R. Nyfeller, C. Bayer and D. A. Baum (1999). Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. American Journal of Botany 86:1474-1486, <http://dx.doi.org/10.2307/2656928>.
- Alloway B.J. 2013. Heavy metals in Soils: Trace Metals and Metallloids in Soils and their Bioavailability, 3 ed. Springer.
- Arévalo-Hernández, C. O., Arévalo-Gardini, E., Barraza, F., Farfán, A., He, Z., & Baligar, V. (2020). Growth and nutritional responses of wild and domesticated cacao genotypes to soil Cd stress. Science of the Total Environment. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144021>
- Arduini, I., Masoni, A., Mariotti, M., Ercoli, L., 2004. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. Environ. Exp.Bot.52, 89–100.
- Arguello, O; Mejía L; Palencia C. (2000). Origen y descripción botánica. Tecnología para el mejoramiento de sistemas de producción de cacao, Corpoica, Bucaramanga, Colombia. p 10 – 12.
- 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>
- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J. y otros (2000). Agricultura orgánica en el trópico y subtrópico. En: Guía de 18 cultivos. 1ra Edición. Alemania. 24p.
- 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*, 29, 950–963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>.
- Barraza, F., Maurice, L., Uzu, G., Becerra, S., López, F., Ochoa-Herrera, V., Ruales, J., Schreck, E., 2018. Distribution, contents and health risk assessment of metal (loid)s in small-scale farms in the Ecuadorian Amazon: an insight into impacts of oil activities. *Sci. Total Environ.* 622–623, 106–120. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.11.246>.
- Benáková, M., Ahmadi, H., Dudoaiová, Z., Tylová, E., Clemens, S., T...ma, J., 2017. Efectos del Cd y Zn sobre las propiedades fisiológicas y anatómicas de cultivos hidropónicos. *Brassica napus* plantas. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 20705–20716. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9697-7>.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 21–34.
- Benito, S. J. 1992. *Tecnificación del cacao en la Selva Alta Peruana*. Fundación para el Desarrollo del Agro. Lima – Perú. 155 p.
- Boza, E.J., Motamayor, J.C., Amores, F.M., Cedeño-Amador, S., Tondo, C.L., Livingstone, D.S., Schnell, R.J., Gutiérrez, O.A. (2014). Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139, 219–229.
- Castro, A.V., Almedia, 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 174–186.
- Capparelli, M.V., Moulatlet, G.M., de Abessa, D.M.S., Lucas-Solis, O., Rosero, B., Galarza, E., Tuba, D., Carpintero, N., Ochoa-Herrera, V., Cipriani-Avila, I., 2020. An integrative approach to identify the impacts of multiple metal contamination sources on the Eastern Andean foothills of the Ecuadorian Amazonia. *Sci. Total Environ.* 709, 136088 <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.136088>.
- Chávez, 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. *Sci. Total Environ.* 533, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>.
- Correa, J.E., Ramírez, R., Ruiz, O. and Leiva, E.I., 2021. Effect of soil characteristics on cadmium absorption and plant growth of *Theobroma cacao* L. seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5437-5445.

- De Almeida, N.M.; Furtado De Almeida, A.-A.; De Almeida, N.S.; Do Nascimento, L.J.; De Carvalho Neto, C.H.; Pirovani, C.P.; Ahnert, D.; Baligar, V.C. Scion-Rootstock Interaction and Tolerance to Cadmium Toxicity in Juvenile *Theobroma cacao* Plants. *Sci. Hortic.* 2022, 300, 111086.
- Durán, F. 2010. Cultivo y explotación del cacao. Editorial Grupo Latino Editores S.A.S. Colombia. 424 p.
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., Schulin, R., 2019. Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>.
- European Commission, 2014. Commission Regulation (EU) N° 488/2014 amending regulation (EC) N° 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Off. J. Eur. Unión* 138, 75.
- Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico. Guía para productores ecuatorianos. Manual N°54. Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador. 360 p.
- Fernández-Paz J, Cortés AJ, Hernández-Varela CA, Mejía-de-Tafur MS, Rodríguez-Medina C and Baligar VC, 2021. Rootstock-Mediated Genetic Variance in Cadmium Uptake by Juvenile Cacao (*Theobroma cacao* L.) Genotypes, and Its Effect on Growth and Physiology. *Front. Plant Sci.* 12:777842. doi: 10.3389/fpls.2021.777842
- Ferreira, D. 2011. Sisvar: un sistema informático de análisis estadístico. *Ciencia y Agrotecnología (UFLA)*, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Food Safety and Standards Authority of India (2015). Manual of methods of Analysis of foods metals. Ministry of health and family welfare. New Delhi-India.
- 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. *Environ. Exp. Bot.* 83,33–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>.
- Galvis, D. A., Yeirme, Yaneth, Jaimes-Suárez., Jairo, Rojas, Molina., Rosalba, Ruiz., C., León-Moreno., Fabricio, E., L., Carvalho. (2023). 7. Unveiling Cacao Rootstock-Genotypes with Potential Use in the Mitigation of Cadmium Bioaccumulation. *Plants*, doi: 10.3390/plants12162941
- García, L. y Dorronsoro. C. 2005. Contaminación por metales pesados. En: *Tecnología de suelos*. Departamento de Edafología y Química Agrícola, Universidad de Granada, Granada, España.

- Guarín, D., Martín – López, J., Libokhova, Z., Benavides, J., Maximova, S., J., Guiltinan, M., Spargo J., Da Silva M., Fernández A., Drohan, P., 2024. Acumulación de cadmio en suelos, hojarasca y hojas en fincas de cacao en la Sierra Nevada Norte de Santa Marta, Colombia. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2024.e00762>
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., González, V., Schulin, R., 2018. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Sci. Total Environ.* 612, 370–378.
- Guan, L., Murphy, A. S., Peer, W. A., Gan, L., Li, Y., & Cheng, Z. M. (Max). 2015. Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(5), 506–521. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1090831>
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P.J., Baligar, V.C., 2015. Soil biogeochemistry, plant physiology and phytoremediation of cadmium contaminated soils. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*. 134: pp. 135–225. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005> (ISSN 0065-2113).
- IICA. 2017. *Manual Técnico del Cultivo de Cacao – Prácticas Latinoamericanas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 143 p.
- Ilinskiy A.V., Evsenkin K.N., Pavlov A.A. Flood sediments as a source of replenishment of alluvial soils with plant nutrition elements. *Agricultural Science Euro-North-East*. 2024;25(4):645–654.
- Jiménez Tobón, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción más Limpia*, 10(1), 89 –104.
- Johnson, J., Bonilla, J., y Agüero, L. (2008). *Manual de manejo y producción del cacaotero*. León, Nicaragua.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*, third ed. CRC Press, Boca Raton, USA <http://dx.doi.org/10.1080/15320383.2011.609202>.
- Kahle, H. (1993). Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, 33(1), 99-119.
- Kim, Y., Yang, Y., Lee, Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol Plant*, 116(3):368-372.
- Laegreid, M.; Bockman, O. C.; Kaarstad, E. O. *Agriculture fertilizers and environment*. Wallingford: CAB, 1999. 294 p.
- Lewis, C., Lennon, A.M., Eudoxie, G., Umaharan, P., 2018. Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Sci. Total Environ.* 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.05.365>.
- Lichtenthaler, HK and AR Wellburn (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591 –

592.

- Lima, J.; Pacheco, R.; Rosa, I.; Silva, R.; Aguilar, M.; Valle, R. 2001. Recomendaciones para la siembra de plántulas de cacao propagadas por estaquillas. Ed. Marques, J. CEPLAC/CEPEC. Ihéus – Bahia, Brasil. 34 p.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2010). Catálogo de cultivares de cacao del Perú. Primera Edición 2010. Comisión Nacional para el desarrollo y vida sin drogas. Recuperado el 25 de octubre de 2024, https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/cultivares_cacao.pdf.
- MIDAGRI. 2020. Observatorio de Commodities: Cacao. Boletín de publicación trimestral. Dirección General de Políticas Agrarias. Lima, Perú.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). (2023). Cacao: Observatorio de Productos básicos. Recuperado el 09 de octubre de 2024, <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5264502/%20Commodities%20Cacao%20ene-mar%202023.pdf?v=1697059698>.
- Mingorance, M.D.; Valdés, B.; Oliva, S.R. Strategies of Heavy Metal Uptake by Plants Growing under Industrial Emissions. *Environ. Int.* 2007, 33, 514–520.
- Mortvedt, J.J., Beaton, J.D., 1995. In: Tiesen, H.(Ed.), *Phosphorus in the Global Environment: Transfer, Cycles and Management*. Wiley, New York, pp. 93–106. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9837\(199705\)22:5<515::AID-ESP71643.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9837(199705)22:5<515::AID-ESP71643.0.CO;2-Y).
- Moore, R. E., Ullah, I., de Oliveira, V. H., Hammond, S. J., Strekopytov, S., Tibbett, M., et al. (2020). Cadmium isotope fractionation reveals genetic variation in Cd uptake and translocation by *Theobroma cacao* and role of natural resistance-associated macrophage protein 5 and heavy metal ATPase-family transporters. *Horticult. Res.* 7, 1–11. doi: 10.1038/s41438-020-0292-6
- Ortiz-Álvarez, A.; Magnitskiy, S.; Silva-Arero, EA; Rodríguez- Medina, C.; Argout, X.; Castaño-Marín, A.M. Acumulación de Cadmio en Plantas de Cacao (*teobroma cacao*L.) bajo estrés por sequía. *Agronomía* 2023, 13, 2490. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102490>
- Pachura, P., A. O. Kubicka, and B. S. Grabowska. 2016. Assessment of the availability of heavy metals to plants based on the translocation index and the bioaccumulation factor. *Desalin. Water Treat.* 57: 1469 – 1477.

- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S., 2005. Phytoremediation and hyper accumulator plants. In: Tamás, M.J., Martinoia, E. (Eds.), *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification; From Microbes to Man-Topics in Current Genetics*. Springer, New York, USA (509 p).
- Perea, V.A., Martínez, G.N., Aranzazu, H.F., & Cadena, C.T. (2013). Características de calidad del cacao de Colombia, Catálogo de 26 Cultivares. Universidad Industrial de Santander, Federación Nacional de Cacaoteros.
- Pereira de Araújo, R., Furtado, de Almeida, A. A., Pereira, L. S., Mangabeira, P. A., Souza, J. O., et al. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 144, 148–157. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.006
- Pérez Moncada, A.U., Gómez Ramírez, M., Ordoñez Serralde, D.P., Peñaranda Rolón, M. A., Wilches Ortiz, A.W., Ramírez, L., Rengifo Estrada, A.G., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as a strategy to reduce the absorption of cadmium in cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *Terra Latinoam*. <https://doi.org/10.28940/tl.v37i2.479>.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, S., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D. & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6):1008 –1018.
- Prieto, M. J., González, R. C., Román, G. A. y Prieto, G. F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29 - 44.
- Puri S, A Khara (1992) Influence of maturity and physiological status of woody cuttings: Limits and promises to ensure successful cloning. *Indian For.* 118:560-572.
- Ramtahal, G., Chang Yen, I., Ahmad, N., Bekele, I., Bekele, F., Maharaj, K., Wilson, L., & Harrynanan, L. (2015). Prediction of soil cadmium bioavailability to cacao (*Theobroma cacao* L.) using single-step extraction procedures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(20), 2585–2594. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1089262>.
- Rascio N. & Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyper accumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180: 169 – 181.
- Reilly, C. 2002. *Metal contamination of food. Its significance for food quality and human health*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK.
- Sánchez, M. 2003. Determinación de metales pesados en suelos de Medina del Campo (Valladolid): Contenidos extraíbles, niveles de fondo y de referencia. Universidad de Valladolid, España.

- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., & Del Rio, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2115–2126. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>.
- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment, pp. 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Ullah, I., Wang, Y., Eide, D.J., Dunwell, J.M., 2018. Evolution, and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from *Theobroma cacao* and their role in cadmium accumulation. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y>.
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J.L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., Smolders, E., 2021. Mitigating the level of cadmium in cacao products: reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Sci. Total Environ.* 781, 146779 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>.
- Zakariyya, F., Santoso, T.I., & Abdoellah, S. (2022). Absorption of Cadmium and its Effect on the Growth of Halfsib Family of Three Cocoa Clones Seedling. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 38(3), 171-178.
- Zhao, F.J., Hamon, R.E., Lombi, E., McLaughlin, M.J. y McGrath, S.P. (2002). Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 53(368):535-543.
- Zug, K.L.M., Huamaní Yupanqui, H.A., Meyberg, F., Cierjacks, J.S., Cierjacks, A., 2019. Cadmium accumulation in Peruvian cacao (*Theobroma cacao* L.) and opportunities for mitigation. *Water Air Soil Pollut.* 230 <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>.

ANEXOS



Figura 44. Supervisión del asesor en campo



Figura 45. Crecimiento morfológico de los plantones de cacao, a) 40 ddt, b) 1618 ddt