

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CADMIO EN PLÁNTULAS DE  
*Theobroma cacao* L. (*cacao*) INOCULADAS CON MICORRIZAS  
ARBUSCULARES

Autor:

JAIRO JOEL JAIME CARVAJAL

Director:

FREDDY ANDRES ESPINOZA CARRASCO

*Milagro, 2022*

## Derechos de autor

**Sr. Dr.**

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **JAIRO JOEL JAIME CARVAJAL** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**, como aporte a la Línea de Investigación **DESARROLLO SOSTENIBLE** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 7 de noviembre del 2022



Firmado electrónicamente por:  
**JAIRO JOEL  
JAIME  
CARVAJAL**

---

Jairo Joel Jaime Carvajal

C.I 1207482108

## Aprobación del Director del Trabajo de Titulación

Yo, **FREDDY ANDRES ESPINOZA CARRASCO** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **JAIRO JOEL JAIME CARVAJAL**, cuyo tema es **EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CADMIO EN PLÁNTULAS DE THEOBROMA CACAO L. (CACAO) INOCULADAS CON MICORRIZAS ARBUSCULARES**, que aporta a la Línea de Investigación **DESARROLLO SOSTENIBLE**, previo a la obtención del Grado **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA** Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 7 de noviembre del 2022



Firmado electrónicamente por:  
**FREDDY ANDRES  
ESPINOZA  
CARRASCO**

---

Msc. Freddy Andrés Espinoza Carrasco  
C.I 0922281670

## Aprobación del tribunal calificador



### VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DIRECCIÓN DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**, presentado por **Q.F. JAIME CARVAJAL JAIRO JOEL**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE CADMIO EN PLÁNTULAS DE THEOBROMA CACAO L. (CACAO) INOCULADAS CON MICORRIZAS ARBUSCULARES ", las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	60.00
DEFENSA ORAL	39.67
<b>PROMEDIO</b>	<b>99.67</b>
<b>EQUIVALENTE</b>	<b>Excelente</b>



Firmado electrónicamente por:  
**JUAN DIEGO  
VALENZUELA  
COBOS**

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO  
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:  
**DENNY WILLIAM  
MORENO CASTRO**

Mgs MORENO CASTRO DENNY WILLIAM  
VOCAL



Firmado electrónicamente por:  
**DELIA DOLORES  
NORIEGA VERDUGO**

Mgr. NORIEGA VERDUGO DELIA DOLORES  
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

## DEDICATORIA

El presente proyecto investigativo está dedicado a Dios, por llenarme día a día de bendiciones y porque me ayudo a superar cualquier dificultad que la vida académica me haya puesto como reto, y permitirme hoy en día ser el profesional en quien me estoy convirtiendo.

Dedico el presente trabajo a mis padres Ernesto y Mercedes que han sido el pilar fundamental en todo lo largo de mi vida hasta ahora, y además por haberme inculcado los valores y las ganas de ser profesional le dedico todo el sacrificio y esfuerzo que hicieron por mí como resultado la persona en que me eh convertido

## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo es en agradecimiento a mis padres por su apoyo constante durante este proceso, además a mi tutor de Tesis Msc Q.F Freddy Espinoza por su orientación durante el trabajo de investigación.

Además, a mi Cotutor Ph. D. Milton Barcos Arias por darme la oportunidad de realizar este estudio dentro de las instalaciones de CIBE.

También a mi amigo Msc Jaime Naranjo por el aporte de sus conocimientos y su predisposición desde el inicio hasta el final de este presente trabajo.

## RESUMEN

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son utilizados por sus beneficios directos en las plantas tanto en su crecimiento, aumento en el peso seco y nutrición, además tienen la facultad de aumentar la tolerancia a metales pesados como el cadmio, el objetivo de este estudio fue evaluar la absorción de cadmio en plántulas de *Theobroma cacao L (cacao)* inoculadas con micorrizas arbusculares, mediante el uso de técnicas espectrofotométricas y parámetros agronómicos durante un periodo de dos meses. Todos los parámetros fueron evaluados mediante un diseño completamente aleatorio con interacción para las plantas de *Theobroma cacao L*, donde se establece cuatro niveles del factor Cd con seis réplicas en cada nivel evaluado para las variables de respuestas con HMA: altura, número de hojas y biomasa, cuantificación de la absorción de Cd, a su vez las diferencias significativas se determinaron por el test de Tukey ( $p < 0.05$ ) usando el programa estadístico InfoStat. Los resultados de la evaluación demostraron que la mayor acumulación de cadmio se obtuvo en el suelo 4.81mg/kg al ser inoculados con 6mg/kg de cadmio, a diferencias de las hojas con un promedio de 3.05mg/kg de cadmio, se obtuvo un porcentaje micorrización de 36 % al nivel de 6 mg/kg, la acumulación de Cd en la biomasa radicular fue mayor a niveles de 6 mg/kg a diferencia de la biomasa aérea, los indicadores de FBC 1.51 y de FT 0.71 demostrando que las plántulas de *Theobroma cacao L* se comportan como una especie fitoestabilizadora en concentraciones entre 2 y 6mg/kg. Estos resultados demuestran que la aplicación de HMA favorece la Fitoestabilización de plántulas de *teobroma cacao L* en condiciones de invernadero.

**Palabras claves:** Micorrizas – Cadmio – Cacao – fitoestabilizador - Invernadero

## ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi are used for their direct benefits in plants both in their growth, increase in dry weight and nutrition, they also have the ability to increase tolerance to heavy metals such as cadmium, the objective of this study was to evaluate cadmium uptake in *Theobroma cacao* L (cocoa) seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizae, using spectrophotometric techniques and agronomic parameters over a period of two months. All parameters were evaluated using a completely randomized design with interaction for *Theobroma cacao* L plants, where four levels of the Cd factor are established with six replications at each level evaluated for the response variables with AMF: height, number of leaves and biomass, quantification of the absorption of Cd, in turn, the significant differences were determined by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) using the statistical program InfoStat. The results of the evaluation showed that the highest accumulation of cadmium was obtained in the soil 4.81mg/kg when inoculated with 6mg/kg of cadmium, unlike the leaves with an average of 3.05mg/kg of cadmium, a mycorrhization percentage of 36 % at the level of 6 mg/kg, the accumulation of Cd in the root biomass was greater at levels of 6 mg/kg, unlike the aerial biomass, the indicators of FBC 1.51 and FT 0.71 demonstrating that the seedlings of *Theobroma cacao* L behave as a phytostabilizing species in concentrations between 2 and 6mg/kg. These results demonstrate that the application of AMF favors the phytostabilization of *theobroma cacao* L seedlings under greenhouse conditions.

**Keywords:** Mycorrhizae – Cadmium – Cocoa – Phytostabilizer – Greenhouse

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
• <i>Antecedentes.</i>	2
<b>CAPITULO I</b>	<b>3</b>
<b>EL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
1.1. <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
1.1.1. <b>Problematización</b>	3
1.1.2. <b>Delimitación del problema</b>	3
1.1.3. <b>Formulación del problema</b>	4
1.2. <b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
1.2.1. <b>Objetivo General</b>	4
1.2.2. <b>Objetivos Específicos</b>	4
1.3 <b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>6</b>
2.1. <b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1.3 <i>Distribución geográfica del cacao</i>	9
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<i>FBC = {elemento total de planta}{elemento en el suelo}</i>	19
<i>FT = elemento en parte aéreaelemento en parte radicular</i>	19
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
Identificar el efecto de varias concentraciones de Cd durante el crecimiento de plántulas de cacao inoculadas con micorrizas arbusculares.	20

<b>Analizar parámetros fisicoquímicos y agronómicos durante la interacción planta-micorriza-suelo en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L (cacao).</b>	<b>22</b>
<b>_____</b>	<b>24</b>
<b>Interpretar los indicadores de bioacumulación y traslocación de Cd en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L (cacao).</b>	<b>25</b>
<b>CAPITULO V</b>	<b>27</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>5.2. RECOMENDACIONES</b>	<b>27</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>32</b>

## INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 2</i> Rampa de temperatura para digestión microondas _____	17
<i>Cuadro 3</i> Condiciones instrumental para la determinación de cadmio _____	18
<i>Cuadro 4</i> Rampa de temperatura del programa de HGA _____	18
<i>Cuadro 5</i> Acumulación de cadmio en plántulas de <i>Theobroma cacao</i> L; Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ) $\pm$ desviación estándar; FBC= Factor de bioacumulación; FT=Factor de traslocación. _	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribución geográfica del <i>theobroma cacao L.</i>	9
<b>Figura 2</b> Absorción de varias concentraciones de cadmio luego de 60 días de experimentación con plántulas de <i>Theobroma cacao L</i> inoculadas con HMA	20
<b>Figura 3</b> Crecimiento de plántulas de <i>Theobroma cacao L</i> luego de 60 días de experimentación	21
<b>Figura 4</b> Número de total de hojas luego de los 60 días de experimentación en plántulas de <i>theobroma cacao L.</i>	22
<b>Figura 5</b> Infección micorrícica de plántulas de <i>Theobroma cacao L</i> con diferentes concentraciones de cadmio	22
<b>Figura 6</b> Estructuras infectadas de las HMA a los 52 días de a los 52 días de experimentación con lente 40x en plántulas de <i>Theobroma cacao L</i>	22
<b>Figura 7</b> Acumulación de Biomás (aérea y radicular) en plantulas de <i>Theobroma cacao L</i> luego de 60 días de experimentación	23
<b>Figura 8</b> Plantas de <i>theobroma cacao L</i> luego de 60 días de experimentación	24
<b>Figura 9</b> Consorcios de micorrizas utilizados en el estudio	32
<b>Figura 10</b> Plántulas de <i>theobroma cacao L.</i> antes y durante la experimentación.	32
<b>Figura 11</b> Curva de calibración para la determinación de cadmio en <i>theobroma cacao L.</i>	33

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es el principal exportador de cacao a nivel mundial registrando un crecimiento en el 2020 de USD \$850 millones, en comparación con el año 2019 que fueron de \$720, En el año 2020, el 70% de la producción mundial de cacao en grano de la especie Theobroma fue producido en África, mientras que un 14% en América Latina; el Ecuador en el 2019 se convirtió en el primer exportador de cacao en grano en América y ocupa el cuarto puesto en el mundo, siendo así el segundo producto de exportación más importantes luego del petróleo para el país (Alcívar et al. 2021).

En el cacao, el Cd se acumula en las semillas, tal como lo demuestran estudios realizados en Venezuela y Perú. La ingesta directa o indirecta (cereales, chocolates, gomas de mascar y confites) de Cd, produce daños al riñón, hígado, pulmón, páncreas, testículos y hueso ocasionando deficiencias renales, osteoporosis, hipertensión arterial, diabetes, enfisema pulmonar y algunos cánceres de próstata, pulmón, vejiga y páncreas (Llatance 2018).

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial para las plantas, cuya presencia puede deberse al uso de fertilizantes fosfatados y como subproducto de la explotación de zinc y cobre; puede ser absorbido y acumulado en raíces, tallos, hojas, frutos y semillas; cuya concentración depende de la edad y especie. Afecta el crecimiento, la fotosíntesis y reduce las concentraciones de nitratos, generando desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto y clorosis (Sandoval et al. 2020)

Para mantener la capacidad productiva de los suelos se debe combinar prácticas de nutrición vegetal como la aplicación de los biofertilizantes líquidos fermentados, estos aportan compuestos orgánicos, minerales y microorganismos favoreciendo a la distribución de los nutrientes facilitando su absorción (Romero-estévez et al. 2019).

A nivel nacional se ha planteado alternativas para disminuir el uso de fertilizantes químicos entre ellas el uso de biofertilizantes, y la utilización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) los cuales han demostrado que puede disminuir la translocación de metales pesados (MP) en diferentes estudios relacionados demostraron que no provoca

contaminación ambiental y aumenta la actividad biológica en las plantas (Bhattacharyya et al. 2020).

- **Antecedentes.**

El cacao es una planta que tiene alta capacidad para extraer, transportar y acumular Cd en sus frutos, por lo cual la probabilidad de encontrar trazas de este metal en el grano aumenta con el establecimiento de cultivos en suelos con disponibilidad de Cd. Por esta razón, la búsqueda de alternativas que mitiguen la toma de Cd por parte de la planta son necesarias para evitar efectos negativos no solo en el mercado de los productos derivados del cultivo sino también en la seguridad alimentaria descartando problemas nocivos en la dieta del consumidor que afecten su salud (Adrian et al. 2019).

En los últimos 15 años, se han incrementado la actividad investigativa dirigida hacia la identificación y extracción de HFMA. El empleo de HFMA representa una alternativa económicamente rentable debido a que su uso puede reducir la aplicación de fertilizantes que ocasionan degradación de las propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo. El uso de HFMA ha tomado cada vez más fuerza, ya que estos intervienen directamente sobre los ciclos biogeoquímicos por medio de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fósforo inorgánico (Grageda-Cabrera, 2017).

El uso de HFMA en suelos enriquecidos con metales como el Cd, es la base para desarrollar estrategias de mitigación que amortigüen el impacto de estos suelos en un agroecosistema, ya que estos hongos pueden haber desarrollado tolerancia al metal y jugar un papel importante en la fitoremediación en sitios contaminados. De esta manera reduce la acumulación de Cd y la fitotoxicidad en sus plantas hospedero (Zambrano et al. 2020).

- **Importancia y actualidad del tema.**

El uso de microorganismos como los HMA, brindan beneficios frente a diferentes tipos de estrés que se generan en las plantas provocados por la salinidad y metales pesados. Mediante mecanismos de fitoextracción la planta absorbe los metales pesados, no obstante, los HMA atrapan a estos elementos en sus estructuras permitiendo un mejor desarrollo de la especie vegetal. Con estos antecedentes se planteó en esta investigación estudiar la absorción del Cd en plantas de *Theobroma cacao* L inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares.

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1.1. Problematización

Las principales fuentes de contaminación por Cd, Ni y Pb dentro del Ecuador están asociadas con causas naturales como erupciones y rocas volcánicas, en este sentido la microbiota benéfica presente en el hábitat puede ser una alternativa para mitigar tales efectos nocivos en estos cultivos, como es el caso de los (HFMA) microorganismos que brindan a las plantas tolerancia a los factores bióticos y abióticos permitiendo tener un desarrollo (Zhang et al. 2018).

La gran demanda de fertilizantes químicos ha provocado contaminaciones no solo del suelo sino también del agua, esta propagación ayuda al efecto invernadero de modo que, para disminuir esta tendencia se deben usar diversas alternativas como son la utilización hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) los cuales han demostrado que puede disminuir la translocación de metales pesados (MP) en diferentes especies vegetales, lo que significa que el uso de estos hongos podrían ser una herramienta biotecnológica para el manejo de sistemas agrícolas con contaminación por metales pesados (Ochoa-Velasco et al. 2016).

#### 1.1.2. Delimitación del problema

La problemática del cadmio presente en los suelos cacaotero es cada vez más abundante debido al uso inadecuado de fertilizaciones químicas, es por ello que la propuesta de utilizar HFMA como un biofactor de fitorremediación estimulante del crecimiento y enriquecedor de nutrientes que brinda protección a las plantas contra enfermedades y resistencia contra sequía, estrés por salinidad y toxicidad por metales pesados es una alternativa viable para reducir estos altos niveles de contaminación, y a su vez obtener productos inocuos que cumplan con los rangos de aceptaciones para ser exportados a los distintos países.

### 1.1.3. Formulación del problema

Las micorrizas arbusculares posibilitan el efecto fitoestabilizador necesario para disminuir la concentración de Cd en cultivo de cacao.

## 1.2.OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo General

Evaluar la absorción de cadmio en plántulas de *Theobroma cacao L* (cacao) inoculadas con micorrizas arbusculares.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar el efecto de varias concentraciones de Cd durante el crecimiento de plántulas de cacao inoculadas con micorrizas arbusculares.
- Analizar parámetros fisicoquímicos y agronómicos durante la interacción planta-micorriza-suelo en plántulas de *Theobroma cacao L* (cacao).
- Interpretar los indicadores de bioacumulación y traslocación de Cd en plántulas de *Theobroma cacao L* (cacao).

## 1.3 JUSTIFICACIÓN

El cacao en Ecuador tiene importancia en el aporte económico, por ser un fruto apetecido a nivel mundial por sus propiedades nutricionales y por ser un producto de calidad. Pero mantener esa calidad tiene un precio y esta es la adición de fertilizantes químicos, que provoca un robustecimiento del cacao, pero genera contaminación ambiental, desgaste del suelo con cambios de pH, disminución de minerales, entre otros.

La FAO (2015) menciona que el uso de fertilización habría aumentado en 200,5 millones de toneladas en el 2019 con un incremento de un 1,8 % por ciento anual y la demanda aumenta cada vez más. Por otro lado, el uso excesivo de fertilizantes ha llevado a la contaminación del suelo por la deposición de nitrógeno y en otros casos daño en los sistemas hídricos, por lo que conduce a la degradación de la tierra y la disminución de su rendimiento.

La FAO también ha implementado métodos para mantener o restablecer la salud del suelo. Promueve la aplicación de métodos de fertilización precisos así, evitando hacer una fertilización generalizada debido a que se generan desperdicios del nitrógeno.

A nivel nacional se ha planteado alternativas para disminuir el uso de fertilizantes químicos entre ellas el uso de biofertilizantes, y la utilización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) los cuales han demostrado que puede disminuir la translocación de metales pesados (MP) en diferentes estudios relacionados demostraron que no provoca contaminación ambiental y aumenta la actividad biológica en las plantas (Bhattacharyya et al. 2020).

En los últimos 15 años, se han incrementado la actividad investigativa dirigida hacia la identificación y extracción de HFMA. El empleo de HFMA representa una alternativa económicamente rentable debido a que su uso puede reducir la aplicación de fertilizantes que ocasionan degradación de las propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo. El uso de HFMA ha tomado cada vez más fuerza, ya que estos intervienen directamente sobre los ciclos biogeoquímicos por medio de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fósforo inorgánico (Grageda-Cabrera, 2017).

El siguiente proyecto de investigación abrirá nuevos caminos para próximos estudios sobre los beneficios del uso de HFMA y su relación con su efecto fitoestabilizador para atenuar la contaminación por metales pesados en suelos agrícolas.

## CAPÍTULO II

### 2.1. MARCO TEÓRICO

El cacao (*Theobroma cacao, L.*) fue el nombrado por Carl von Linne quien catalogó por primera vez el árbol del cual proceden las semillas de cacao. Este cultivo es originario de la zona tropical que comprenda la región amazónica que encierra territorios de Ecuador, Perú, Bolivia, Colombia y Brasil, se piensa que este cultivo fue comercializado y cultivado a lo largo del territorio por los aborígenes del Imperio Inca. Otro suceso es que el cacao se haya desarrollado de manera directa en los lugares actuales de cultivo y existe una tercera ideología, que pudieron ser los monos y las ardillas, quienes transportaron las semillas por los diferentes territorios tropicales, debido a su agradable sabor que presenta el mucilago del caca (Peralta 2019).

En nuestro país en la actualidad se cultiva el cacao fino, de aroma y el CCN-51 o llamado de Ramilla. Desde los años 70, que se encajó el CCN-51, quien supera la producción con relación a las demás variedades de cacao. El cacao CCN-51 es denominado un cacao híbrido, del Trinitario (originario de Trinidad, una isla del Océano Atlántico) por Forastero (nativo de la Amazonia ecuatoriana). También lo conocemos como cacao Don Homero en honor a su creador, Homero Castro Zurita, nacido en Ambato en 1922. Quien en el año de 1965 desarrollo el clon, al que denomino Colección Castro Naranjo (árbol - planta) 51 (CCN-51), que en la actualidad es uno de los cacaos de mayor producción en el país y a nivel mundial. Es un cacao que contiene grandes cantidades de manteca de cacao y muy resistente a plagas y enfermedades (Chávez Cruz, G., Olaya Cum, R. L., & Maza Iñiguez 2018).

Con lo que respecta al manejo agronómico, se cree conveniente que CCN-51 en la etapa de plántula evite la alta radiación debido a las disminuciones en altura y que posiblemente lleve a menores tasas de crecimiento. Este aspecto debe tenerse en cuenta al planificar nuevas plantaciones en regiones con alta radiación durante todo el año. Sin embargo, la capacidad de los mecanismos de fotoprotección asociados al aumento del ciclo de xantofilas que presenta CCN-51 le permite evitar daños drásticos en el aparato fotosintético debido al

exceso de radiación recibido en los estadios juveniles. (Jaimez et al. 2018). Los escenarios de riego y fertilización que se dan en las grandes plantaciones comerciales sin duda ofrecen condiciones menos estresantes, evitando reducciones importantes en los potenciales hídricos que llevan a cierres estomáticos y consecuentemente menor tasas de acumulación, para los pequeños productores que en su mayoría carecen de servicios de riego, esta característica ofrece una gran ventaja frente a otros cultivares más susceptibles (Argüello et al. 2019).

### **2.1.1 Morfología**

El árbol de cacao tiene un crecimiento silvestre, en los bosques de América Central, en la zona situada entre los 26 grados al norte y 26 grados al sur de Ecuador, los árboles cultivados son más pequeños los cuales facilitan su recolección y cultivo, no suele sobrepasar los dos o tres metros de altura. Se encuentran también como árbol cultivado en las zonas tropicales del oeste de África y Asia su tamaño mediano normalmente alcanza una altura entre 6 a 8 metros de altura, puede alcanzar hasta los 20 metros cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa redondeada y con un diámetro de 7 a 9 metros. Su tronco es recto y se puede desarrollar en formas muy variadas según las condiciones ambientales. Con excepción del cacao Nacional de Ecuador y del Amelonado de África, los que en ocasiones alcanzan alturas hasta unos 12 metros. Cultivado con alta luminosidad el tamaño es más reducido que con exceso de sombra (Arévalo-gardini et al. 2017).

Según Romero-estévez et al. (2019) mencionan que los árboles de cacao se cultivan en monocultivos a pleno sol o en sistemas agroforestales y en ambos sistemas el fertilizante y el control de plagas el manejo puede ser convencional u orgánico. En monocultivos los árboles de cacao se cultivan solos, mientras que, en los sistemas agroforestales, la palma, la madera y los árboles frutales se cultivan en combinación con árboles de cacao. Como el tipo de cultivo tiene una fuerte influencia en las condiciones de crecimiento, también puede tener un significativo efecto sobre la absorción de Cd del suelo. Por ejemplo, suelo orgánico El contenido de materia y la disponibilidad de nutrientes pueden diferir mucho entre manejo convencional y orgánico. El manejo puede afectar no solo la disponibilidad de Cd del suelo sino también el contenido total de Cd en el suelo, a través de insumos con la aplicación de fertilizantes minerales, estiércol de corral, residuos orgánicos

A su vez Gramlich et al. (2016) evaluó que la absorción de cadmio por las plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) han despertado la preocupación del público, ya que las altas concentraciones de Cd se han encontrado en frijoles de árboles de cacao cultivados en suelos con solo niveles intermedios de y también en productos finales de cacao. Después de que estudios basados en el mercado encontraron productos de chocolate que contienen concentraciones de Cd más altas que la mayoría de los otros alimentos, con valores medios superiores a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , la Unión Europea (UE) decidió establecer regulaciones para valores críticos de Cd en productos de cacao importado a la UE, que entrará en vigor en 2019

Sandoval et al. (2020) propone que la ausencia o presencia de otras plantas pueden afectar la absorción de Cd por los árboles de cacao, al afectar directamente la cantidad de Cd del suelo disponible para la absorción, así como indirectamente al afectar la capacidad de los árboles de cacao para acumular Cd, si comparamos la competencia por luz, agua y nutrientes. Pocos estudios han investigado los efectos de los factores del suelo sobre la absorción de metales pesados por el cacao y también ninguno de ellos examinó los efectos de la gestión agrícola sobre la disponibilidad de Cd para el cacao.

### 2.1.2 Taxonomía

The International Plant Name Index Index, (2021), describe a la especie *Theobroma*

*cacao* L., de la siguiente forma:

- **Reino:** Plantae
- **Subreino:** Tracheobionta
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Dilleniidae
- **Orden:** Malvales
- **Familia:** Sterculiaceae
- **Subfamilia:** Byttnerioideae



medida que la planta de cacao va creciendo necesita ser sostenida mediante puntales o zunchos y si esta se realiza mediante una integración vertical su producción mejorara, es una práctica cultural de cultivos de cacao en Brasil (Lichtemberg, Gasparotto, Maciel Cordeiro, Vilela Rodrigues & Faria Lichtemberg, 2013).

Para mejorar la producción es necesario que se realice procesos de tratamiento y fertilización, las plantas de cacao necesitan una gran cantidad de nutrientes, la producción en África Occidental y Sudamérica ha disminuido por una inadecuada fertilización del suelo Rojas y Sacristán, al aplicar la urea se debe tomar en cuenta el drenaje, suelo que permitan el crecimiento de las raíces de la mata, aireación, rallo solares, retención de nutrientes y humedad, la tierra para este sembrío de cacao CCN-51 requiere más potasio para su norma desarrollo, aplicando abono foliar de manera intensiva mejora la producción, la utilización de fungicida en algunos caso no puede ser eficaz debido al momento de ser aplicado, condiciones ambientales por lo que se recomienda una combinación de algunos métodos químicos, culturales y biológicos para lograr mejores resultados en el manejo de enfermedades (Chávez Cruz, G., Olaya Cum, R. L., & Maza Iñiguez 2018).

En Ecuador, la mayor producción de CCN-51 se dan entre los meses de octubre a diciembre, independientemente de la cantidad de agua suministrada a la plantación, a su vez la característica del período de maduración de la fruta durante la estación seca influye en una menor incidencia de enfermedades fúngicas como la pudrición helada de la vaina o infecciones de vainas por escoba de bruja, las condiciones ambientales en el período seco aumentan el crecimiento de los frutos en el CCN-51. Los mecanismos fisiológicos que inducen una alta floración durante el período lluvioso tardío/seco temprano son desconocidos y generalmente se ha informado que la mayor cantidad de flores ocurre durante el período lluvioso. Además, una menor cantidad de lluvia conduce a una menor cantidad de insectos polinizadores del cacao lo que influiría en una menor cantidad de frutos, pero esto no es lo que sucede con el CCN 51.

#### **2.1.4 Metales pesados**

Los metales pesados son elementos de alta densidad ( $\geq 5 \text{ g.cm}^{-3}$ ), que pueden ser de baja o alta toxicidad para las plantas dependiendo de su naturaleza. Del mismo modo, en correspondencia con las concentraciones en las que se encuentren en el suelo algunos

pueden cumplir alguna función biológica o pueden ser altamente tóxicos para las plantas y los animales. Cuando se encuentran en concentraciones que superan umbrales específicos pueden causar mal funcionamiento enzimático, estrés oxidativo, reemplazo de nutrientes esenciales, entre otros efectos. Entre los elementos que no cumplen ninguna función biológica y son particularmente tóxicos se encuentran el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) (Gramlich et al. 2016).

En particular el Cd es un elemento no esencial y altamente tóxico en la mayoría de los organismos, con una toxicidad entre 2 a 20 veces más alta que cualquier otro metal pesado debido a su movilidad. Está ubicado en el séptimo lugar en la lista de las 10 sustancias prioritariamente peligrosas entregada por la Agencia Americana para sustancias tóxicas y registro de enfermedades (ATSDR) e incluido en la lista de prioridades de la EPA. Se conoce que el Cd en el cuerpo humano afecta el funcionamiento de varias enzimas. Por ejemplo, se cree que el daño renal que resulta de la proteinuria es resultado del efecto del Cd sobre las enzimas responsables de la reabsorción de proteínas en los túbulos del riñón (Am 2020).

Según Arévalo-gardini et al. 2016 menciona que el efecto en cultivos no es menos importante ya que debido a su similitud química con cationes esenciales, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  puede utilizar sus mismas vías de entrada. Esto genera problemas de deficiencias funcionales y metabólicas, debido a que imita a este tipo de metales que son esenciales para el desarrollo de funciones biológicas diversas. El Cd puede incrementar la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, suprimir la actividad mitótica y la división celular, inhibir el crecimiento, participar en procesos relacionados con la desintegración de la estructura del cloroplasto y la perturbación de la composición de la pared celular, entre otros efectos.

También Huaraca-fernandez, Pérez-sosa, and Pampa-quispe en el 2020 proponen que los metales pesados, en particular el Cd, son depositados en suelos y aguas, debido a procesos pedogénicos y a la actividad antropogénica como producto de desechos agroindustriales, de procesos como la galvanoplastia, manufactura de plásticos, minería, pigmentos para pinturas, aleaciones, baterías, diales para fotografía, fungicidas, compost y fertilizantes fosfatados, entre otros.

La materia orgánica es un componente reactivo importante en suelos capaces de retener cationes metálicos, siendo la aplicación de materia orgánica a suelos contaminados pueden reducir la capacidad de extracción y la biodisponibilidad de Cd, Zn y Pb. En estudios realizados por Llatance en 2018 se muestra que la presencia de 5% y 10% de biochar disminuye las concentraciones extraíbles de Cd, Zn y Pb durante los siguientes 56 días. Según Adrian et al. (2019) informaron que el estiércol de cerdo disminuye significativamente las concentraciones de Cd y Zn en el girasol. Los residuos orgánicos como estiércol de granja, estiércol de aves de corral, estiércol de cerdo, compost, biosólidos, lodo de alcantarillado, desechos domésticos, paja y una amplia gama de enmiendas orgánicas combinadas pueden utilizarse como enmiendas del suelo para reducir la disponibilidad de Cd.

El pH es uno de los factores más importantes, que controla la absorción de cadmio, a medida que el pH disminuye, aumenta la absorción del Cd por las plantas teniendo una relación lineal indirecta. Al incrementar el pH en el suelo, el cadmio es removido y adsorbido por los coloides del suelo, restringiendo su movilidad y biodisponibilidad. A su vez Liu et al. (2018) sostuvo que la utilización de enmiendas orgánicas en altas dosis aumentan el pH del suelo y el contenido de materia orgánica, y en consecuencia disminuyen la biodisponibilidad de Cd del suelo.

Según la FAO en 2015 menciona que el Cd puede llegar a tener una vida media en el suelo de 15 a 1100 años y sus concentraciones están influenciadas por el tipo de suelo y la movilidad relativa en función de las características fisicoquímicas del mismo, el clima y la topografía, además del total de suelos cultivables del mundo, el 33% se encuentran degradados por algún tipo de contaminación y de esa cantidad el 15% corresponde a contaminación química entre la que se destaca la contaminación por Cd.

#### **2.1.5 Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA)**

Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares, son mutualistas obligados, que se asocian con más del 90% de las plantas; la característica principal de esta asociación es facilitar la captación de agua y nutrientes. Las plantas son una fuente de carbono para el hongo, mientras los HFMA son los encargados de captar nutrientes de lenta movilidad, principalmente fósforo, por medio de su red hifal (Bano and Ashfaq 2013).

Estos HFMA son microorganismos del suelo que establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas, formando una unión física entre el suelo y las raíces de éstas. Pertenecen al Phylum y sólo pueden germinar, pero no crecer, en ausencia de las raíces de las plantas

Los HFMA generan beneficios directos en las plantas en su crecimiento, aumento en el peso seco y nutrición, además aumentan la tolerancia a metales pesados, patógenos, sequía, altas temperaturas y alteraciones de pH, entre otros, adicionalmente sus estructuras más importantes de los HFMA involucradas en la tolerancia a MP, son los arbuscúlos, las vesículas y las hifas. Estos hongos producen una glicoproteína llamada glomalina y ha mostrado su potencial al momento de establecer enlaces con moléculas de alta toxicidad, aunque la cantidad que se produce solo puede inmovilizar < 1% del Cd total presente en la solución del suelo, sin embargo, podría constituir una barrera eficaz para acumular este elemento (Chávez Cruz, G., Olaya Cum, R. L., & Maza Iñiguez 2018).

Se han empleados varios métodos para mitigar la translocación de Cd presente en la solución del suelo hacia la parte aérea de las plantas, sin embargo, estos métodos no son tan fácil en la práctica por tiempo y altos. Como una alternativa los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), han sido evaluados en diferentes estudios con el fin de que las plantas micorrizadas sean más tolerantes a altas concentraciones de este metal en el suelo de las plantas que no están micorrizadas.

Un rango de factores como son las propiedades inherentes del hongo, la capacidad de captar el metal pesado por las plantas y la absorción desde el suelo son características que pueden influenciar en la captación del metal en el suelo por las plantas micorrizadas.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Obtención del material biológico

##### Material vegetal

Se usaron plántulas injertadas de cacao nacional provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicado en KM. 26 Vía Duran -Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi en la provincia del Guayas.

##### Obtención del preinóculo de HMA

El consorcio de HMA utilizado procede del banco de hongos micorrícicos arbusculares que posee el área de Biorremediación Ambiental del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), el mismo que está conformado por seis géneros de HMA tales como: Acaulospora, Ambispora, Diversispora, Entrophospora, Funeliformis y Glomus.

#### 3.2 Diseño experimental

Se usó un diseño completamente aleatorio con interacción para las plantas de Theobroma cacao L, donde se establece cuatro niveles del factor Cd con seis réplicas en cada nivel evaluado para las variables de respuestas con HMA: altura, número de hojas y biomasa, cuantificación de la absorción de Cd.

$$DCA: \gamma = \mu + \delta + \varepsilon$$

- **D:** Diseño
- **C:** Completamente
- **A:** Aleatorizado
- $\gamma$ : Variable dependiente suelo raíz y hojas
  - $\mu$ : Media
  - $\delta$ : Factor concentración cadmio
  - $\varepsilon$ : aleatoriedad del diseño

**Cuadro 1.** Diseño completamente aleatorizado de planta de *Theobroma cacao L.* para la adsorción de Cd

Contaminante	T1	T2	T3	T4
Cd mg/kg	0	0	0	0
	2	2	2	2
	4	4	4	4
	6	6	6	6

**T1 = Control T2 = Suelo T3= Raíz T4= Hojas**

### 2.3 Condiciones del sistema

Las plantas fueron trasplantadas en un sustrato compuesto por tamo y arena en proporción 1:1, el sustrato contenía una conductividad eléctrica de 0.561 dS m<sup>-1</sup> y pH 6.90. Establecidos los ensayos las plantas fueron regadas con la solución modificada de Steiner y agua durante 2 semanas, la misma contenía: 0, 2, 4, 6 ppm de nitrato de cadmio Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, el sustrato se mantuvo a capacidad de campo con tres aplicaciones a la semana de 70 ml de las soluciones antes mencionadas.

### 3.3 Parámetros a evaluar

#### 3.3.1 Altura y número de hojas

La altura y número de hojas fueron medidos una vez por semana. En el caso de la altura se utilizó una regla de 60 cm, midiendo desde el cuello de la planta hasta la yema terminal; mientras que, el número de hojas se evaluó según la emisión foliar semanal (Alam, M., Juraimi, A. S., Rafii, M. Y., & Abdul Hamid 2019).

#### 3.3.2 Biomasa seca

Las plantas fueron secadas en una estufa marca redline durante 24 horas a 65 °C posteriormente pesadas en una balanza analítica marca santorius; y etiquetadas en fundas plásticas. Obtenido el peso seco constante se trituraron por separado la biomasa aérea y radicular en un molino de cuchillas (Avellán Rivera, Barreto Dolin, and Peralta Tercero 2020).

#### 3.3.3 Tinción de raíces

Las raíces de las plántulas fueron tomadas al final del experimento para evidenciar la presencia o ausencia de hifas, vesículas o arbusculos. Los pasos a seguir consistieron en

seleccionar raíces secundarias y ponerlas en un vaso de vidrio autoclavable sumergidas en hidróxido de potasio al 10% por 10 minutos a 121 °C y a 15 lb de presión. Luego se lavó el hidróxido de potasio con agua de la llave, posteriormente adicionando 1% de ácido clorhídrico y se dejó reposar por 3 minutos, después se retiró el ácido clorhídrico para agregar finalmente azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol y autoclavar por 15 minutos. Una vez autoclavadas las raíces se realizó el montaje en portaobjetos y se observó al microscopio usando el objetivo de 40x.

### **3.3.4 Porcentaje de micorrización**

Realizado el protocolo de tinción y montaje de las raíces en el portaobjeto se observaron los campos de cada raíz para luego determinar el porcentaje de micorrización en cada especie de Cucurbitácea estudiada, según la fórmula propuesta por McGonigle (1990).

### **3.3.5 Determinación de Cd**

Se Pesó aproximadamente de 0.25g de suelo, 0.5g de raíces y 1 g de hojas en una balanza marca Santorius las planta de *Theobroma cacao* L sobre los vasos de microondas milliston connect, se agregó 7 ml de Ácido Nítrico (HNO<sub>3</sub>) 68 – 70% marca Sharlau y 3 ml de Peróxido de Hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% marca Merck, luego se colocaron las muestras en el microondas a una rampa de calentamiento por 10 min hasta alcanzar 180°C y luego permanece constante durante 15 min a 180°C, finalmente 15 minutos de enfriamiento, se procedió a llevar a matraz de 25ml y aforar con agua HPLC y para finalizar se filtró las muestras con jeringas y microfiltros de 22um antes de la lectura mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito. En total se analizaron 96 muestras.

### **3.3.6. Equipos y materiales para análisis de cadmio**

- Espectrofotómetro de absorción atómica con llama (marca perkinelmer)
- Molino De Cuchilla (Retsch GM 200)
- Tamiz

- Mufla
- Balanza analítica de precisión 0,1 mg
- Papel filtro libre de ceniza
- Lámpara de cátodo hueco de Cadmio
- Lámpara de carga
- Crisoles de 15ml
- Espátula
- Matraz aforado de 25ml
- Plato calentador

### 3.3.7 Reactivos

- Acetileno
- Ácido Nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65, d=1,40 g/ml, ppa
- Ácido Clorhídrico
- Solución Estándar de Cadmio de 1000 mg/L
- Agua clase HPLC

### 3.3.8 Instrumentación

Para la digestión ácida se usó un horno digestor microondas marca Milleston connect modelo ethos up, se trabajó con 15 vasos digestores y un método de trampa de temperatura que se muestra en la cuadro 2.

**Cuadro 1** Rampa de temperatura para digestión microondas

ESTADO	TIEMPO	POTENCIA (W)	RAMPA TEMPERATURA °C
1	00:10:00	1800	180
2	00:15:00	1800	180
3	<b>ENFRIAMIENTO: 15 MIN</b>		

Las lecturas de las muestras se las realizo en el equipo de absorción atómica marca perkinelmer modelo AAnalyst 400 acoplado a un horno de grafito modelo 900 de la misma marca, las condiciones de análisis se visualizan en el cuadro 3-4, adicionalmente se realizó diluciones de las muestras de ser necesario, también se analizo un material de referencia certificado marca LGC de valor conocido como medida de aseguramiento de calidad.

**Cuadro 2** Condiciones instrumental para la determinación de cadmio

<b>Longitud de Onda</b>	<b>228.80 nm</b>
<b>Curva</b>	0.25 ug/L
	0.50 ug/L
	1.0 ug/L
	2.0 ug/L
	5.0 ug/L
<b>Combustible</b>	Argón
<b>Modificador de Matriz</b>	0.015 mg Pd + 0.01 mg Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Corrector de Fondo</b>	Encendido

Adicionalmente se estableció para los siguientes 3 niveles de trabajo, detección y cuantificación para la determinación de cadmio en teobroma cacao L:

**Intervalo de Trabajo** 0.1- 1.0 mg/kg

**Límite de Detección:** 0.006 mg/kg

**Límite de Cuantificación:** 0.1 mg/kg

**Cuadro 3** Rampa de temperatura del programa de HGA

<i>Temp °C</i>	<i>Ramp Time</i>	<i>Hold Time</i>	<i>Internal Flow</i>	<i>Gas Type</i>
<b>110</b>	1	30	250	Normal
<b>130</b>	15	20	250	Normal
<b>850</b>	10	20	250	Normal
<b>1650</b>	0	5	0	Normal
<b>2600</b>	1	5	250	Normal

### 3.3.8 Determinación de factores de bioconcentración y de translocación

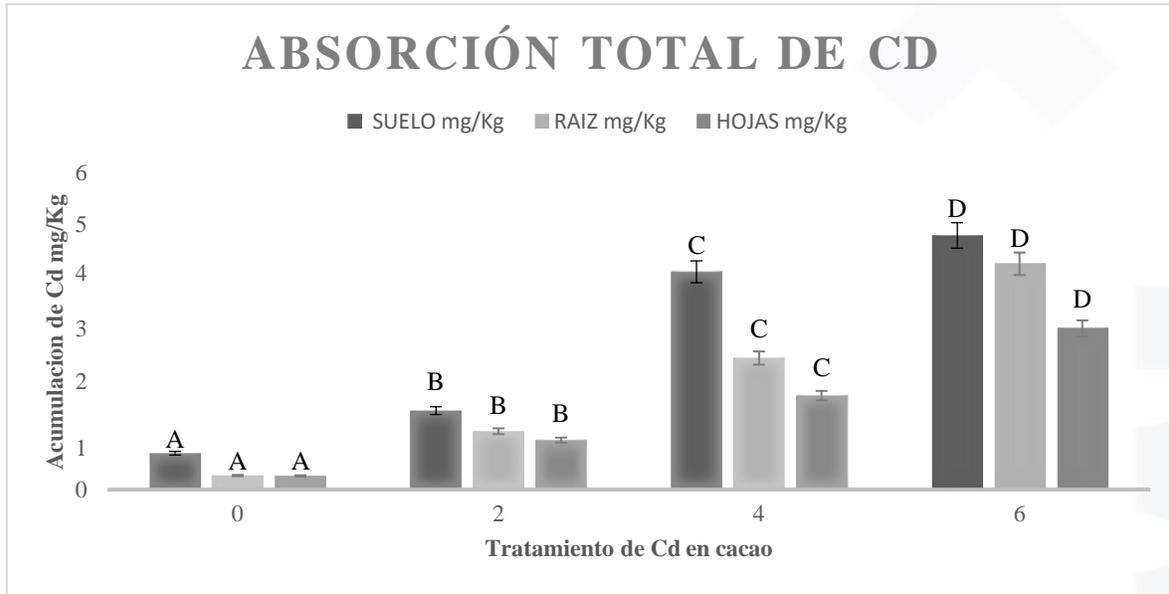
El factor de bioconcentración (FBC) es estimado por la concentración del elemento absorbido en la planta sobre la concentración presente en el suelo, mientras que el factor de translocación (FT) se estima a partir de la concentración del elemento absorbido en la biomasa aérea dividido para la concentración del elemento obtenido en la biomasa radicular, las características de los factores se manifiesta si existen elevada translocación de metales desde la raíz hacia sus hojas y tallos, por lo que la acumulación es eficiente. Mientras que en la raíz no se acumula metales o si lo hace es en bajas cantidades. La planta es considerada como acumuladora. Nula o baja la translocación de metales desde la raíz hacia sus hojas y tallos, por lo que la acumulación es deficiente. Mientras que en la raíz inmoviliza o secuestra el metal. La planta es exclusora. (Ali, Khan, and Sajad 2013).

$$FBC = \frac{\{elemento\ total\ de\ planta\}}{\{elemento\ en\ el\ suelo\}}$$

$$FT = \frac{\{elemento\ en\ parte\ aérea\}}{\{elemento\ en\ parte\ radicular\}}$$

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

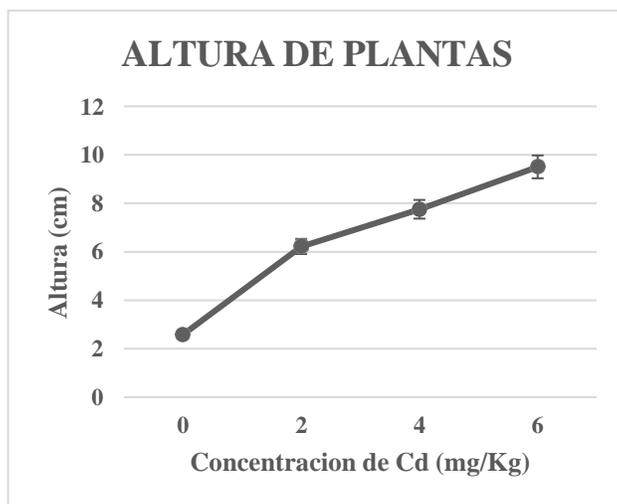
**Identificar el efecto de varias concentraciones de Cd durante el crecimiento de plántulas de cacao inoculadas con micorrizas arbusculares.**



**Figura 2** Absorción de varias concentraciones de cadmio luego de 60 días de experimentación con plántulas de *Theobroma cacao L* inoculadas con HMA

Los resultados de las plantulas de *Theobroma caca L* luego de la inoculación de HMA demuestran que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero a su vez se evidencia que la mayor acumulación de cadmio se obtuvo en el suelo 4.81ppm al ser inoculados con 6ppm de cadmio como se muestra en la Figura 1, a diferencias de las hojas con un promedio de 3.05ppm de cadmio, estos resultados se relacionan con el crecimiento exponencial de las plántulas de *Theobroma cacao L* que se detallan en el Figura 3-4, las raíces se relacionan con el compartimento del suelo como menciona Manousaki and Kalogerakis (2009), a mayor concentración de salinidad los metales como el cadmio ingresan fácilmente a la planta, además se registró una altura máxima de 9.5cm al crecer en concentraciones de 6 mg/Kg, en comparación a nivel mas bajo de cadmio 2ppm, además se evidencia que las hojas tiene un porcentaje de acumulación de cadmio de 45% a diferencia del suelo y las raíces 100% y 62.25% de acumulación de cadmio, teniendo relación con los

datos expresados por Li et al. (2016), evaluaron dos especies de micorrizas (*Rhizophagus intraradices* y *Funneliformis mosseae*) bajo diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1 mM) por tres días en un sistema de cultivo hidropónico con plantas de arroz (*Oriza sativa* L.), y observaron que los hongos micorrícicos disminuyeron significativamente las concentraciones de cadmio en las hojas y raíces de las plantas, siendo el tratamiento inoculado con *F. mosseae* quien realizó una notable disminución del metal a una concentración de 0.025 mM en comparación a *R. intraradices*. (Burleigh, Kristensen, and Bechmann 2003), detallaron que los HMA pueden actuar como amortiguadores de metales aumentando el suministro del metal en concentraciones bajas pero disminuyéndolo cuando está en concentraciones tóxicas para la planta, según Huang et al. (2017), realizaron estudios en *Phragmites australis* inoculado con *R. irregularis* bajo diferentes concentraciones de cadmio, se observó que hubo una fuerte correlación entre el cadmio y el fósforo al mejorar la absorción de fósforo en las hojas y proporcionando una mayor protección a las plantas. A su vez los resultados obtenidos por Enrique and Montoya (2013), quienes midieron la altura a las 12 semanas en el cultivo de café y no encontró diferencias significativas, demuestra que hasta aproximadamente los 90 días las micorrizas no tienen un efecto positivo en la altura de las plantas.



**Figura 3** Crecimiento de plántulas de *Theobroma cacao* L luego de 60 días de experimentación

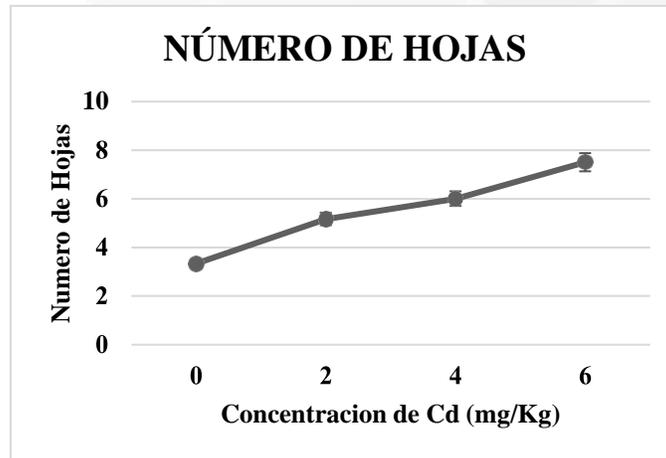


Figura 4 Número de total de hojas luego de los 60 días de experimentación en plántulas de *theobroma cacao L*.

Analizar parámetros fisicoquímicos y agronómicos durante la interacción planta-micorriza-suelo en plántulas de *Theobroma cacao L* (cacao).

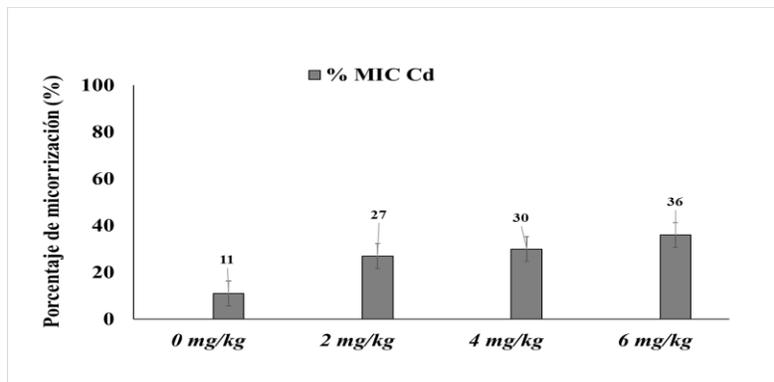


Figura 5 Infección micorrízica de plántulas de *Theobroma cacao L* con diferentes concentraciones de cadmio

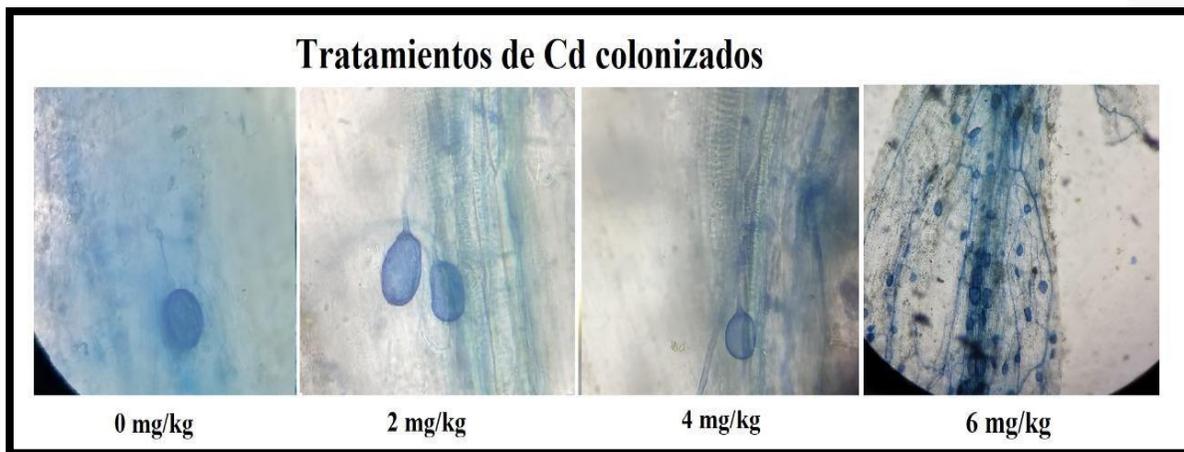
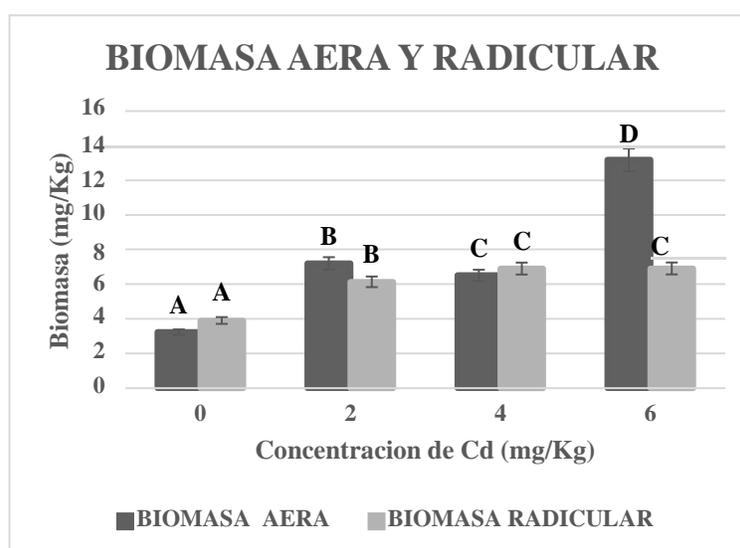


Figura 6 Estructuras infectadas de las HMA a los 52 días de a los 52 días de experimentación con lente 40x en plántulas de *Theobroma cacao L*

Luego de los 60 días de experimentación se obtuvo un porcentaje del 36 % al nivel de 6 mg/kg, a diferencias de Adrian et al. (2019) estudio la adición de diferentes dosis de Cd (0, 6, 12, 18 y 24 mg/kg) obteniendo valores de micorrización de 59.3% luego de 120 días después del trasplante, estos datos se relacionan con la teoría de Ortiz-Cano et al. (2009), mencionando que los porcentajes de colonización aumentaban a medida que pasaba el tiempo, igualmente Scharnagl, Sanchez, and Wettberg (2018) realizo estudios en *Galactia smallii* observado un incremento en la micorrización y esporulación de consorcios de HMA a medida que aumenta el contaminante. (Beltrán-nambo and Trujillo 2013) mencionan que los porcentajes fueron aumentando a lo largo del experimento, presentándose una colonización del 100% a los 52 días y mostraron que la colonización micorrícica fue más rápida en las plantas en que se aplica ron concentraciones mayores de cromo.



**Figura 7** Acumulación de Biomasa (aérea y radicular) en plantulas de *Theobroma cacao* L luego de 60 días de experimentación

La acumulación de Cd en la biomasa radicular fue mayor a niveles de 6 mg/kg a diferencia de la biomasa aérea, mostraron un patrón similar a los datos descrito en la absorción de cadmio en la figura 1. Además, se encontraron diferencia estadística significativas entre los tratamientos en comparación al control luego de aplicar el test de Tukey ( $p < 0.05$ ), resultados similares se localizaron en plantas de *Lonicera japonica* inoculadas con *G. versiforme* y *R. intraradices* bajo diferentes niveles de Cd (0, 10 y 20 mg/kg) indicaron que la biomasa de las plantas (hojas y raíz) fue más alta en los tratamientos inoculados con los HMA en comparación al testigo independientemente de la dosis evaluada (Jiang et al. 2016), también

Enrique and Montoya (2013) utilizaron dosis de 150 g Mycoral® obteniendo mejor porcentaje de materia seca en la raíz, pero la dosis de 75 g Mycoral® obtuvo mejor porcentaje de materia seca en tallo con hojas luego de 12 semanas de experimentación, (Beltrán-nambo and Trujillo 2013) sugiere que el efecto protector de los HMA ante la presencia de Cr fue notable en 1000 y 3000 mg/Kg, pero no así en 6000 mg/Kg, ya que en esta condición no hubo diferencia significativa entre las plantas inoculadas con HMA y las no inoculadas, la gran mayoría de los metales pesados son también almacenados en las estructuras micorrízicas presentes en las raíces de las plantas y en las esporas (Gaur y Aldohle- ya, 2004). Estos pueden ser secuestrados en las vacuolas o ser quelados por medio de agentes quelantes secretados (glomalina) que se unen a los metales en el suelo. Los HMA también impiden la entrada de los metales pesados a través de la unión de éstos a los componentes de la pared y la membrana plasmática, que funciona como una barrera viva y selectiva en plantas y hongos (Göhre y Paszkowski, 2008). Wright et al. (1998) y González-Chávez et al. (2004) demostraron que la glicoproteína glomalina (extraída de hifas de HMA de suelos contaminados) secuestra metales como Cu, Cd y Zn, lo que reafirma que los HMA estabilizan a los metales del suelo y reducen su disponibilidad, disminuyendo el riesgo de toxicidad para otros microorganismos y plantas vecinas.



**Figura 8** Plantas de theobroma cacao L luego de 60 días de experimentación

**Interpretar los indicadores de bioacumulación y traslocación de Cd en plántulas de *Theobroma cacao* L (cacao).**

**Cuadro 4** Acumulación de cadmio en plántulas de *Theobroma cacao* L; Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ )  $\pm$  desviación estándar; FBC= Factor de bioacumulación; FT=Factor de traslocación.

TRATAMIENTOS (mg/Kg)	CADMIO EN LOS DISTINTOS ORGANOS DE PLANTULAS DE <i>THEOBROMA CACAO</i> L.			FACTORES	
	SUELO mg/Kg	RAIZ mg/Kg	HOJAS mg/Kg	FBC	FT
<b>0</b>	0.69 $\pm$ 5.83 A	0.26 $\pm$ 6.16 A	0.24 $\pm$ 3.76 A	0.73 $\pm$ 5.36 A	0.96 $\pm$ 8.51 A
<b>2</b>	1.48 $\pm$ 9.07 B	1.12 $\pm$ 6.54 B	0.93 $\pm$ 4.40 B	1.39 $\pm$ 7 B	0.83 $\pm$ 9.07 AB
<b>4</b>	4.11 $\pm$ 1.51 C	2.45 $\pm$ 7.76 C	1.73 $\pm$ 4.60 C	1.02 $\pm$ 5.17 C	0.71 $\pm$ 9.15 C
<b>6</b>	4.79 $\pm$ 2.08 D	4.24 $\pm$ 1.94 D	3.02 $\pm$ 2.12 D	1.51 $\pm$ 2.82 D	0.71 $\pm$ 2.07 D

Según Preet et al. (2017) las especies de plantas con  $FBC > 1$  y  $FT < 1$  tienen el potencial de acumular altas concentraciones del metal en sus raíces y pueden ser utilizadas para fines de fitoestabilización, en el caso de nuestro estudio se obtuvo promedios de FBC 1.51 y de FT 0.71 demostrando que las plántulas de *Theobroma cacao* L se comportan como una especie fitoestabilizadora en concentraciones entre 2 y 6mg/kg, al igual que Daniel and Pfuño (2022), mostraron resultados similares de FBC y FT en los tratamientos (sin incluir al control) de 1.69 y 0.62 cuando fueron inoculados con dosis de 10 y 25 mg/kg de cadmio usando girasol (*Helianthus annuus* L. var. Sunbright), el control mostro un valor de FT de 0.96 al siendo cercano a 1, el cual demostraría que escasas concentraciones de cadmio ayuda a la traslocación hacia las zonas áreas de las plántulas de cacao, en el estudio de Huaraca-fernandez, Pérez-sosa, and Pampa-quispe (2020) demuestran que el Cd es fácilmente transferible en este patrón FT debido a que se hallaron valores superiores a 1 tanto en el tallo como en las hojas, sin embargo, los tratamiento inoculados con R. intraradices y HMA-nativos presentaron valores menores a 1 a la concentración de 24 mg/kg en las hojas, siendo un indicativo que la mayor concentración del metal queda en el tallo de la planta, en esta

etapa fenológica de la planta. A su vez estudios realizados por Núñez Moreno (2022) en plantas de *Tradescantia pallida* presentó un FBC de Pb en la parte aérea de 0,5 con FT de 0,53, los cuales son menores a 1, lo que da como resultado que la planta utilizó una técnica de fitoestabilización para inmovilizar Pb en la raíz, también en plantas *Tradescantia pallida* presentó un FBC de Cd en la raíz de 22,1 con FT de 0,2 mlos cuales son mayores a 1 y menores a 1, respectivamente; lo que da como resultado que la planta utilizó una técnica de fitoestabilización para inmovilizar Cd en la raíz de la misma manera en plantas *Lolium perenne* presentó un FBC de Pb en raíz de 4 con FT de 0,5; los cuales son mayores a 1 y menores a 1, respectivamente; lo que da como resultado que la planta utilizó una técnica de fitoestabilización para inmovilizar Pb en la raíz. La planta *Lolium perenne* presentó un FBC de Cd en la parte aérea de 8,56 con FT de 1,8, los cuales son mayores a 1, lo que da como resultado que la planta utilizó una técnica de fitoextracción para absorber Cd en sus hojas y diferencias de estudios realizados en plantas de maíz sembrada en el suelo de Muqui presentó un FBC de Cd en la parte aérea de 0,05 con FT de 0,07, los cuales son menores a 1, lo que da como resultado que la planta utilizó una técnica de fitoestabilización para inmovilizar Cd en la raíz, estos resultados demuestras que la presencia de HMA en diferentes tipos material vegetal actúan convenientemente sobre el estudio de fitoestabilizacion y biorremediación en suelos contaminados por metales pesados.

## CAPITULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

- Se identifico que luego de aplicar distintas concentraciones de cadmio en plántulas de teobroma cacao L este causo un efecto de acumular cantidades progresivas de Cd en los órganos al aumentar la contaminación de Cd en el suelo, sin mostrar efectos negativos en la producción de biomasa y altura de planta.
- Con lo que respecta a parámetros agronómicos y fisicoquímicos se evidencio que las plantas de teobroma cacao L acumulan Cd en mayor cantidad en su biomasa radicular mostrando así su efecto fitoestabilizador que brinda la inoculación de HMA
- Los indicadores de FBC 1.51 y de FT 0.71 demostrando que las plántulas de *Theobroma cacao L* se comportan como una especie fitoestabilizadora en concentraciones entre 2 y 6mg/kg

### 5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de expresión génica en plantas de *Teobroma cacao L* micorrizadas a altas concentraciones de cadmio
- Identificar los mecanismos moleculares de *Teobroma cacao L* para identificar los niveles de tolerancia de cadmio

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrian, Urley, Pérez Moncada, Margarita Ramírez Gómez, Diana Paola, Serralde Ordoñez, Andrea María, Peñaranda Rolón, et al. 2019. “Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares ( HFMA ) Como Estrategia Para Reducir La Absorción de Cadmio En Plantas de Cacao ( Theobroma Cacao ) Arbuscular Mycorrhizal Fungi ( AMF ) as a Strategy to Reduce the Absorption of Cadmium in Cocoa ( Theobroma C,” 121–30.
- Alam, M., Juraimi, A. S., Rafii, M. Y., & Abdul Hamid, A. 2019. “Retracted: Effect of Salinity on Biomass Yield and Physiological and Stem-Root Anatomical Characteristics of Purslane (Portulaca Oleracea L.) Accessions.” *BioMed Research International* 2019: 9458681. <https://doi.org/10.1155/2019/9458681>.
- Alcívar, Kevin, Jessica Quezada, Salomón Barrezuela, Héctor Carvaja, and Victor Garzón. 2021. “Análisis Económico de La Exportación Del Cacao En El Ecuador Durante El Periodo 2014 – 2019.” *Polo Del Conocimiento* 6 (3): 2430–44. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i3.2522>.
- Ali, Hazrat, Ezzat Khan, and Muhammad Anwar Sajad. 2013. “Phytoremediation of Heavy Metals-Concepts and Applications.” *Chemosphere* 91 (7): 869–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- Am, Centro. 2020. “Determinación de Niveles de Cadmio En Almendras de Cacao ( Theobroma Cacao ), En Centro América y República Dominicana.” *Centro América y República Dominicana*, 1–21.
- Arévalo-gardini, Enrique, Cesar O Arévalo-hernández, Virupax C Baligar, and Zhenli L He. 2017. “Heavy Metal Accumulation in Leaves and Beans of Cacao ( Theobroma Cacao L .) in Major Cacao Growing Regions in Peru Science of the Total Environment Heavy Metal Accumulation in Leaves and Beans of Cacao ( Theobroma Cacao L .) in Major Cacao Growing Region,” no. December. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>.
- Arévalo-gardini, Enrique, Meyier E Obando-cerpa, Luis B Zúñiga-cernades, and Cesar O Arévalo-hernández. 2016. “METALES PESADOS EN SUELOS DE PLANTACIONES DE CACAO ( Theobroma Cacao L .) EN TRES REGIONES DEL PERÚ HEAVY METALS IN SOILS OF COCOA PLANTATIONS ( Theobroma Cacao L .) IN THREE REGIONS OF PERU” 15 (2).
- Argüello, David, Eduardo Chavez, Florian Laurysen, Ruth Vanderschueren, Erik Smolders, and Daniela Montalvo. 2019. “Soil Properties and Agronomic Factors Affecting Cadmium Concentrations in Cacao Beans: A Nationwide Survey in Ecuador.” *Science of the Total Environment* 649: 120–27. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>.
- Avellán Rivera, Arturo Roberto , Enrique Barreto Dolin, and Efraín De Jesús Peralta Tercero. 2020. “Carbono En Biomasa Aérea, Sistema Agroforestal de Theobroma Cacao L. Laboratorio Natural, Los Laureles 2018.” *Revista Universitaria Del Caribe* 24(01): 98–106. <https://doi.org/10.5377/ruc.v24i01.9914>.
- Bano, Syeda Asma, and Darima Ashfaq. 2013. “Role of Mycorrhiza to Reduce Heavy Metal Stress” 5 (12): 16–20.

- Beltrán-nambo, M A, and M Martínez Trujillo. 2013. “Efecto Protector de Los Hongos Micorrízicos Arbusculares En Plantas de Jitomate ( *Solanum Lycopersicum* ) Expuestas a Cr ( VI ) Protective e Ect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plants of Tomato ( *Solanum Lycopersicum* ) Exposed to Cr ( VI)” 9457 (Vi): 127–34.
- Burleigh, Stephen H, Brian K Kristensen, and Iben Ellegaard Bechmann. 2003. “A Plasma Membrane Zinc Transporter from *Medicago Truncatula* Is Up-Regulated in Roots by Zn Fertilization , yet down-Regulated by Arbuscular Mycorrhizal Colonization,” 1077–88.
- Chávez Cruz, G., Olaya Cum, R. L., & Maza Iñiguez, J. V. 2018. “COST OF PRODUCTION OF CLONAL CACAO CCN-51 IN THE PARISH BELLA- MARIA, ECUADOR.” *Revista Científica de La Universidad de Cienfuegos*, 179–85.
- Daniel, Johel, and Laura Pfuño. 2022. “Fitorremediación En Suelos Contaminados Con Cd Usando Girasol ( *Helianthus Annuus* L . Var . Sunbright ) Phytoremediation of Cadmium Contaminated Soils Using Resumen Introducción Materiales y Métodos.” *Acta Agronómica*, 163–70.
- Enrique, Jorge, and Matamoros Montoya. 2013. “Efecto de Altas Dosis de Mycoral ® En Las Variedades de Café Catimor 51/75 y Caturra En Siembra Directa En Bolsa, Zamorano, Honduras.”
- Gramlich, A, S Tandy, C Andres, J Chincheros Paniagua, L Armengot, M Schneider, and R Schulin. 2016. “Science of the Total Environment Cadmium Uptake by Cocoa Trees in Agroforestry and Monoculture Systems under Conventional and Organic Management.” *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>.
- Huang, Xiaochen, Shih-hsin Ho, Shishu Zhu, Fang Ma, Jieting Wu, and Jixian Yang. 2017. “Adaptive Response of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis to Accumulation of Elements and Translocation in *Phragmites Australis* Affected by Cadmium Stress.” *Journal of Environmental Management* 197: 448–55. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.014>.
- Huaraca-fernandez, Jhon N, Lourdes Pérez-sosa, and Leonor S Bustinza-cabala Noé B Pampa-quispe. 2020. “Enmiendas Orgánicas En La Inmovilización de Cadmio En Suelos Agrícolas Contaminados: Una Revisión Organic Amendments in the Immobilization of Cadmium in Contaminated Agricultural Soils : A Review” 31 (4): 139–52.
- Index, T. I. (s.f.). *Species Plantarum* 2: 782. 1753. Recuperado el 2 de septiembre de 2022, de <https://www.ipni.org/?q=cacao>
- Jaimez, Ramon Eduardo, Freddy Amores Puyutaxi, Alfonso Vasco, Rey Gastón Loor, Omar Tarqui, Grisnel Quijano, Juan Carlos Jimenez, and Wilmer Tezara. 2018. “Respuestas Fotosintéticas de Cacao Cultivado Sin Sombra a Alta y Baja Radiación En Áreas de Baja Demanda Evaporativa.” *Acta Biologica Colombiana* 23 (1): 95–103. <https://doi.org/10.15446/abc.v23n1.64962>.
- Jiang, Qiu-yun, Feng Zhuo, Shi-hui Long, Hai-di Zhao, Dan-jing Yang, and Zhi-hong Ye.

2016. "Can Arbuscular Mycorrhizal Fungi Reduce Cd Uptake and Alleviate Cd Toxicity of *Lonicera Japonica* Grown in Cd-Added Soils?" *Nature Publishing Group*, no. December 2015: 2–10. <https://doi.org/10.1038/srep21805>.
- Li, Hui, Na Luo, Li Jun, Hai Ming, Yan Wen, and Quan Ying. 2016. "Science of the Total Environment Do Arbuscular Mycorrhizal Fungi Affect Cadmium Uptake Kinetics , Subcellular Distribution and Chemical Forms in Rice?" *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.124>.
- Liu, Lianwen, Wei Li, Weiping Song, and Mingxin Guo. 2018. "Science of the Total Environment Remediation Techniques for Heavy Metal-Contaminated Soils : Principles and Applicability." *Science of the Total Environment* 633: 206–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>.
- Llatance, Wilber Oc. 2018. "Bioacumulación de Cadmio En El Cacao ( *Theobroma Cacao* ) En La Comunidad Nativa de Pakun , Perú" 33 (1): 63–75.
- Manousaki, Eleni, and Nicolas Kalogerakis. 2009. "Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean Saltbush ( *Atriplex Halimus L .* ): Metal Uptake in Relation to Salinity," 844–54. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0224-3>.
- Núñez Moreno, María Soledad. 2022. "Aplicación de Técnicas de Fitorremediación En Suelos Contaminados Con Plomo y Cadmio." *ConcienciaDigital* 5 (1.3): 6–25. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v5i1.3.2089>.
- Ortiz-Cano, H. G.; Trejo-Calzada, R.; Valdez-Cepeda, R. D.; Arreola-Ávila, J. G.; Flores-Hernández, A.; López-Ariza, B. 2009. "Y CADMIO EN SUELOS CONTAMINADOS USANDO QUELITE ( *Amaranthus Hybridus L .* ) Y MICORRIZAS." *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA* 15 (2): 161–68.
- Peralta, Sergio Pino. 2019. "Una Mirada Al Escenario Agro Socioeconómico de Los Cacaoteros En La Cordillera Oriental Del Ecuador Econ . MSc . Bienvenido Alcívar Rodríguez Docente Facultad de Ciencias Económicas , Universidad de Guayaquil Guayaquil - Ecuador," no. December.
- Preet, Gagan, Singh Sidhu, Harminder Pal Singh, and Daizy R Batish. 2017. "Phytoremediation of Lead by a Wild , Non-Edible Pb Accumulator *Coronopus Didymus* ( L . ) Brassicaceae" 6514 (October). <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1374331>.
- Romero-estévez, David, Gabriela S Yáñez-jácome, Karina Simbaña-farinango, and Hugo Navarrete. 2019. "Content and the Relationship between Cadmium , Nickel , and Lead Concentrations in Ecuadorian Cocoa Beans from Nine Provinces." *Food Control* 106 (May): 106750. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106750>.
- Sandoval, Felipe, Urley Perez, Alia Rodriguez, and Esperanza Torres. 2020. "DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES ASOCIADOS A CACAO ( *Theobroma Cacao L .* ) High Cadmium Concentration Resulted in Low Arbuscular Mycorrhizal Fungi Community Diversity Associated to Cocoa ( *Theobroma Cacao L .* )," no. August. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n3.78746>.
- Scharnagl, Klara, Vanessa Sanchez, and Eric Von Wettberg. 2018. "The Impact of Salinity on Mycorrhizal Colonization of a Rare Legume , *Galactia Smallii* , in South Florida

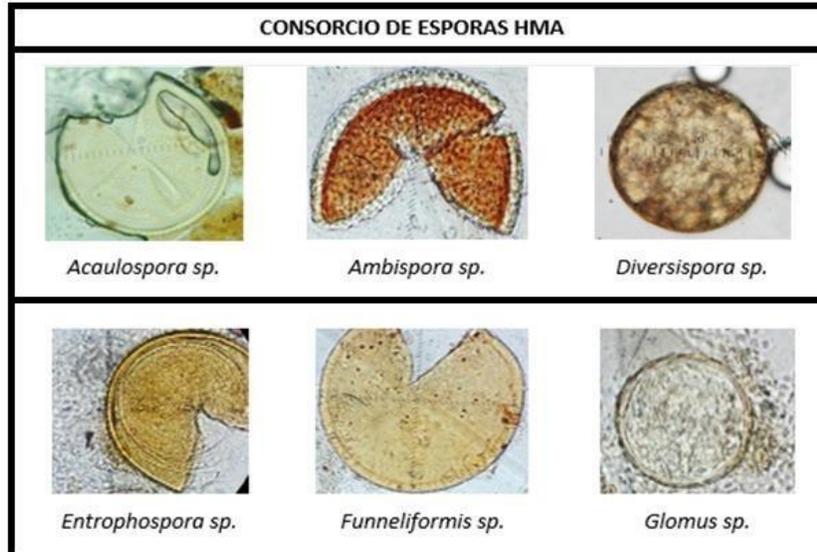
Pine Rocklands.” *BMC Research Notes*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3105-8>.

Zambrano, Gómez, Sebastián Emilio, Abarca Arroyo, and Xavier Andres. 2020. “Efecto de La Inoculación de Micorrizas Benéficas Mycoral® En Patrones de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) En La Etapa de Desarrollo Vegetativo.”

Zhang, Qiang, Xinpeng Gao, Yanyun Ren, Xinhua Ding, Jiajia Qiu, Ning Li, Fanchang Zeng, and Zhaohui Chu. 2018. “Improvement of Verticillium Wilt Resistance by Applying Arbuscular Mycorrhizal Fungi to a Cotton Variety with High Symbiotic Efficiency under Field Conditions.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010241>.

# ANEXOS

## ANEXOS DE FIGURAS



*Figura 10* Consorcios de micorrizas utilizados en el estudio



*Figura 9* Plántulas de *theobroma cacao L.* antes y durante la experimentación.

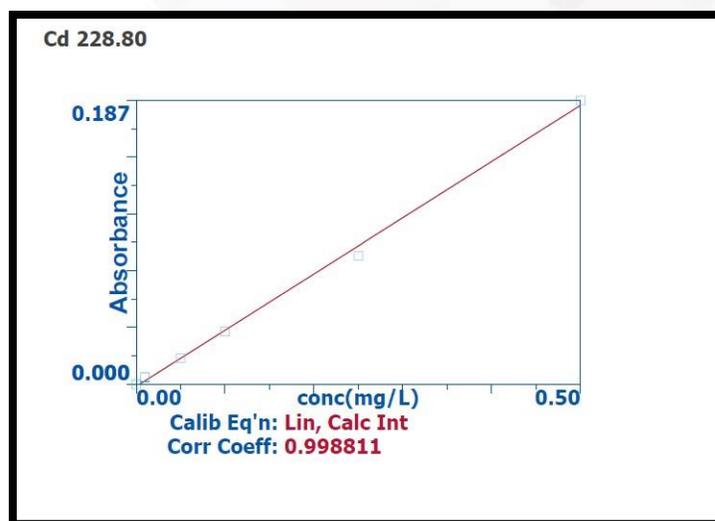


Figura 11 Curva de calibración para la determinación de cadmio en theobroma cacao L.

### Datos estadísticos de parámetros agronómicos.

#### Análisis de la varianza

#### BIOMASA AERA

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
BIOMASA AERA	24	0.99	0.99	4.51	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo
	309.54	3	103.18	894.44	<0.0001	
CONCENTRACION mg/Kg	309.54	3	103.18	894.44	<0.0001	
Error	2.31	20	0.12			
Total	311.84	23				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.54885

Error: 0.1154 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg Medias n E.E.

0	3.23	6	0.14	A
4	6.52	6	0.14	B
2	7.21	6	0.14	C
6	13.19	6	0.14	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### BIOMASA RADICULAR

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
BIOMASA RADICULAR	24	0.99	0.99	1.96	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	36.39	3	12.13	887.61	<0.0001
CONCENTRACION mg/Kg	36.39	3	12.13	887.61	<0.0001
Error	0.27	20	0.01		
Total	36.66	23			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.18890**

Error: 0.0137 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg	Medias	n	E.E.	
0	3.90	6	0.05	A
2	6.14	6	0.05	B
4	6.90	6	0.05	C
6	6.91	6	0.05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )**NUMERO DE HOJAS**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
NUMERO DE HOJAS	24	0.85	0.83	12.64	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54.33	3	18.11	37.47	<0.0001
CONCENTRACION mg/Kg	54.33	3	18.11	37.47	<0.0001
Error	9.67	20	0.48		
Total	64.00	23			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.12346**

Error: 0.4833 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg	Medias	n	E.E.	
0	3.33	6	0.28	A
2	5.17	6	0.28	B
4	6.00	6	0.28	B
6	7.50	6	0.28	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )**ALTURA**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
ALTURA	24	0.93	0.92	11.73	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	155.89	3	51.96	89.04	<0.0001
CONCENTRACION mg/Kg	155.89	3	51.96	89.04	<0.0001
Error	11.67	20	0.58		
Total	167.57	23			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.23448**

Error: 0.5836 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg	Medias	n	E.E.	
0	2.58	6	0.31	A
2	6.22	6	0.31	B
4	7.75	6	0.31	C
6	9.50	6	0.31	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Datos estadísticos determinación de cadmio

### Análisis de la varianza

#### SUELO mg/Kg

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
SUELO mg/Kg	24	1.00	1.00	3.32	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	71.29	3	23.76	2809.05	<0.0001
CONCENTRACION mg/Kg	71.29	3	23.76	2809.05	<0.0001
Error	0.17	20	0.01		
Total	71.46	23			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.14863**

Error: 0.0085 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg	Medias	n	E.E.	
0	0.69	6	0.04	A
2	1.48	6	0.04	B
4	4.11	6	0.04	C
6	4.79	6	0.04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### RAIZ mg/Kg

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
RAIZ mg/Kg	24	1.00	0.99	5.52	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54.16	3	18.05	1459.63	<0.0001
CONCENTRACION mg/Kg	54.16	3	18.05	1459.63	<0.0001
Error	0.25	20	0.01		
Total	54.41	23			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17973**

Error: 0.0124 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg	Medias	n	E.E.	
0	0.26	6	0.05	A
2	1.12	6	0.05	B
4	2.45	6	0.05	C

6 4.24 6 0.05 D  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### HOJAS mg/Kg

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
 HOJAS mg/Kg 24 1.00 1.00 3.78

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valorModelo
			25.53	3	8.51	2728.40 <0.0001
CONCENTRACION mg/Kg		25.53	3	8.51	2728.40	<0.0001
			0.06	20	3.1E-03	Error
Total			25.59	23		

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.09025

Error: 0.0031 gl: 20

CONCENTRACION mg/Kg Medias n E.E.

0	0.24	6	0.02	A
2	0.93	6	0.02	B
4	1.73	6	0.02	C
6	3.02	6	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

