

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *NRAMP5* EN LA ABSORCIÓN DE CADMIO DE  
LAS VARIEDADES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) IMC67, FEC2 Y TCS01

JULIÁN ALEJANDRO CORTÉS MONTERO

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
TUNJA  
2024

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *NRAMP5* EN LA ABSORCIÓN DE CADMIO DE  
LAS VARIETADES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) IMC67, FEC2 Y TCS01

JULIÁN ALEJANDRO CORTÉS MONTERO

Trabajo de grado en la modalidad de tesis para optar por el título de Biólogo

Director  
JAIME ALBERTO MARÍN COLORADO  
Ph. D. – Ciencias Biología

Codirector  
DIEGO EDISON GARZÓN OSPINA  
Ph. D. – Ciencias biomédicas y biológicas

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
TUNJA  
2024

*La autoridad científica de la Facultad de Ciencias básicas reside en ella misma, por lo tanto, no responde por las opiniones expresadas en este trabajo de grado.*

*Se autoriza su uso y reproducción indicando el origen.*

**Nota de aceptación:**

Aprobado por el Comité de Currículo en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia para optar al título de Biólogo, actuando como jurados:

ANA CRUZ MORILLO CORONADO

Ph.D Ciencias Agropecuarias

LAURA FERNANDA GONZALEZ MARTÍNEZ

M. Sc. Ciencias Biológicas

Tunja, 7 de marzo de 2025

## DEDICATORIA

*A mi familia: mi madre Yolanda Montero quien siempre me apoyó y apostó incondicionalmente por mi realización personal y este importante proceso.*

*A mis hermanos Paula Andrea Cortés y Julio Cesar Méndez por estar pendientes de mi proceso y brindarme su apoyo.*

*También agradezco a mi abuela y abuelo por compartir su sabiduría conmigo y facilitarme la comprensión sobre las adversidades de la vida y la adopción de la humildad, voluntad y creatividad como herramientas para el crecimiento personal.*

*A mis tíos Freddy Montero y Leonardo Montero por su colaboración e interés en el desarrollo de mis estudios de pregrado.*

*A mis amigos y todos aquellos que participaron en el proceso*

## AGRADECIMIENTOS

- El presente estudio fue financiado por el proyecto de regalías de la gobernación del Huila denominado “*Desarrollo y validación de tecnologías de manejo integrado del cultivo y agroindustria para incrementar la competitividad y sostenibilidad del sistema productivo de cacao en los municipios de Campoalegre, Gigante, Rivera y Algeciras en el Huila*”, y estuvo involucrado específicamente en la actividad No5 del mismo.
- Al director Jaime Alberto Marín y codirector Diego Edison Garzón, quienes brindaron un gran apoyo y pusieron a disposición sus amplios conocimientos para el correcto desarrollo del trabajo.
- A los profesionales de apoyo a investigación María Camila Sierra, Alejandro Valencia, Laura López y Mauricio Rico, por sus orientaciones y capacitación para el trabajo en laboratorio y análisis bioinformáticos.
- A la doctora Leonora Rodríguez Polanco y al Máster Isidro Beltrán por su asesoría y apoyo.

## CONTENIDO

pág.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>2. MARCO DE REFERENCIA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 MARCO CONCEPTUAL</b> .....	17
<b>2.2 MARCO METODOLÓGICO</b> .....	29
<b>2.3 ESTADO DEL ARTE</b> .....	32
<b>2.4 MARCO METODOLÓGICO</b> .....	34
<b>3. PROBLEMA O PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	39
<b>3.2 JUSTIFICACIÓN</b> .....	42
<b>3.3 OBJETIVOS</b> .....	45
<b>3.3.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	45
<b>3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	45
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO</b> .....	46
<b>4.1.1 Área de estudio</b> .....	46
<b>4.1.2 Material vegetal y establecimiento del experimento</b> .....	46
<b>4.1.3 Diseño experimental</b> .....	47
<b>4.2 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN GENÉTICA (DENSITOMETRÍA)</b> .....	48
<b>4.2.1 Muestreo destructivo</b> .....	48
<b>4.2.2 Procesamiento de muestras</b> .....	49
<b>4.2.3 Selección de genes (objetivo y de referencia)</b> .....	50
<b>4.2.4 Extracción de ARN total</b> .....	51
<b>4.2.5 Tratamiento con ADNasa y síntesis de ADNc</b> .....	51
<b>4.2.6 PCR de punto final y electroforesis</b> .....	52
<b>4.2.7 Análisis de datos de expresión genética</b> .....	53
<b>4.2 EVALUACIÓN FISIOLÓGICA</b> .....	54
<b>4.2.1 Muestreo no destructivo</b> .....	54
<b>4.2.2 Análisis de datos fisiológicos</b> .....	55
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1 MANEJO DEL CULTIVO HIDROPÓNICO Y ESTANDARIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS EN LABORATORIO.</b> .....	56

<b>5.1.1 Parámetros fisicoquímicos de la solución hidropónica</b> .....	56
<b>5.1.2 Extracción de ARN</b> .....	57
<b>5.1.3 Estandarización de primers y PCR de punto final</b> .....	58
<b>5.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA</b> .....	60
<b>5.3 RESPUESTA FISIOLÓGICA</b> .....	65
<b>5.4 CONTENIDO DE Cd EN LÁMINA FOLIAR</b> .....	72
<b>5.5 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN Y COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)</b> ´ .....	73
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>80</b>
<b>6.1 MANEJO DEL CULTIVO HIDROPÓNICO Y ESTANDARIZACIÓN DE PROCEDIMIENTOS EN   LABORATORIO</b> .....	80
<b>6.2 EXPRESIÓN DEL GEN <i>NRAMP5</i> EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR CADMIO</b> .....	81
<b>6.3 RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL CACAO AL Cd</b> .....	82
<b>6.5 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES Y CORRELACIÓN DE SPEARMAN</b> .....	84
<b>6.5 IMPLICACIONES PRÁCTICAS DE LOS RESULTADOS EN EL CAMPO DE LAS CIENCIAS   BIOLÓGICAS</b> .....	84
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>86</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>87</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>88</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>101</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. <i>Componentes de solución Hoagland a mitad de fuerza</i> .....	47
Tabla 2. <i>Reactivos para PCR de punto final</i> .....	52
Tabla 3. <i>Concentraciones y relaciones de absorbancias de ARN total, ARN tratado, ADNc y producto PCR</i> .....	58.
Tabla 4. <i>Gradientes de temperatura seleccionados para los genes NRAMP5 y PUB</i> . .....	59.
Tabla 5. <i>Parámetros de configuración del termociclador para PCR de punto final de los genes NRAMP5 Y PUB</i> .....	59.
Tabla 6. <i>Resultados del análisis de varianza paramétrico y no paramétrico para las variables estudiadas, así como los resultados de la comparación de medias</i> .....	71.
Tabla 7. <i>Modelos de regresión no lineal para cada material</i> .....	72.

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Diseño experimental.....	48
Figura 2. <i>Esquemas de la estructura y ubicación del gen NRAMP5 en cacao criollo (Theobroma cacao L.)</i> .....	50
Figura 3. <i>Interfaz del programa Gel Analyzer versión 23.1.1. A</i> .....	54
Figura 4. <i>Gráfico del modelo de regresión polinomial de tercer grado para estimar los tiempos de actividad del compresor</i> . ....	56
Figura 5. <i>Fórmula para determinar la temperatura y tiempo de anillamiento</i> . ....	59
Figura 6. <i>Resultados de PCR de punto final para los genes NRAMP5 y PUB en gel de agarosa al 2%</i> . ....	61
Figura 7. <i>Patrones de expresión de los genes NRAMP5 y PUB para las variedades IMC67, FEC2 y TCS01</i> .....	62
Figura 8. <i>Patrones de expresión relativa en las variedades IMC67, FEC2 y TCS01. A. Gráfico de picos con barras de error de los patrones de expresión relativa. B. Gel de agarosa con el contraste entre NRAMP5 y PUB a las 24 horas y 72 horas</i> . ....	64
Figura 9. <i>Gráfico de dispersión de niveles de expresión VS expresión relativa</i> .....	64

Figura 10. Gráficos de dispersión de parámetros fisiológicos .....	<b>65</b>
Figura 11. <i>Verificación de supuestos por pruebas gráficas</i> .....	<b>66</b>
Figura 12. <i>Pruebas gráficas para las variables Conduc. E. y UEAi</i> .....	<b>70</b>
Figura 13. <i>Gráfico de barras del contenido de cadmio en tejido foliar</i> .....	<b>73</b>
Figura 14. <i>Gráfico de correlación de Spearman para variables moleculares, fisiológicas y químicas para las tres variedades de cacao objeto de estudio</i> .....	<b>74</b>
Figura 15. <i>Gráficas descriptivas del PCA. A. Porcentajes de varianza explicados por los componentes, B. Contribución de las variables al modelo, C. PCA con vectores por cada variable y la respectiva agrupación de los datos</i> .....	<b>78</b>

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 0. .....	90
Anexo 2. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 1 .....	91
Anexo 3. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 2 .....	92
Anexo 4. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 3 .....	93
Anexo 5. <i>Control de digestión enzimática con Dnasas. El control positivo corresponde a una muestra de ADN de hoja de cacao con primers del gen RUBISCO.....</i>	94
Anexo 6. <i>Gráficos para la normalización de datos de intensidad de banda para PUB .....</i>	94
Anexo 7. <i>Análisis de varianza Kruskal Wallis y comparación de medias para los niveles de expresión del gen NRAMP5.....</i>	95
Anexo 8. <i>Diferentes pruebas de normalidad para todas las variables objeto de estudio .....</i>	95
Anexo 9. <i>Prueba de igualdad de varianzas F.....</i>	96
Anexo 10. <i>Geles de PCR de punto final de los 4 tiempos evaluados en los materiales IMC67, FEC2 y TCS01.....</i>	96

*Anexo 11. Prueba t y comparación de medias para contenidos de cadmio (ppm) en la lámina foliar de los 3 materiales de cacao..... 98*

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia de genes NRAMP'S es conocida por su función en la captación y transporte de protones metálicos y se encuentra presente en todos los reinos de la naturaleza. Particularmente en plantas, desempeña una función de transporte de cationes fundamentales en la nutrición vegetal como: hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), así como también permite el ingreso de Cadmio divalente ( $\text{Cd}^{2+}$ ), que se encuentra de forma natural y antrópica en los suelos y ejerce un efecto tóxico en la mayoría de los seres vivos (Ullah et al., 2018).

Por otra parte, la especie *Theobroma cacao* L., es una planta perenne que pertenece a la familia de las Malváceas, la cual contiene 12 géneros con 430 especies, en las que también se destacan el algodón (*Gossypium hirsutum*) y la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) por su importancia comercial a nivel internacional (Robles et al., 2022). Además, el grano de cacao y sus derivados se han establecido en el mercado mundial como uno de los *commodities* de mayor acogida y crecimiento en los últimos años, debido a la exquisitez de su sabor y a que ofrece una alimentación saludable, rica en vitaminas, minerales, antioxidantes y calorías (Mendoza-López et al., 2021).

Aunque los subproductos más conocidos del cacao en el mercado son los chocolates y el cocoa en polvo, actualmente también es utilizado para la preparación de licores, productos cosméticos y biodiesel, que se producen con el 80% de biomasa restante del fruto, ya que el chocolate se fabrica únicamente con el Nib del cacao (Peñaloza et al., 2020). Por otra parte, en términos de exportación de grano seco, África encabeza los listados de participación, donde los principales exponentes son los países de Costa de marfil, Ghana, Nigeria y Camerún productores del 70% del cacao a nivel mundial. Adicionalmente, el continente americano cuenta con un 16,6% de participación en el mercado, seguido de Asia y Oceanía con un 7% (Vega et al., 2024).

En Colombia, el 77% del cacao producido se concentra en seis departamentos: Santander con un 42,1% de participación, Antioquia con 8,8%, Arauca con 7,6%, Huila con 6,8%, Tolima con 6,6% y Nariño con 5,5%. Cada departamento cuenta con granos de características organolépticas diferenciales, dadas por el manejo agronómico de los cultivos y los materiales vegetales seleccionados en cada región (Colombia trade, 2020), lo que genera granos de calidades contrastantes (Ruiz, 2023). Adicionalmente, el país cuenta con aproximadamente 65.341 familias productoras de cacao, cuya principal fuente de ingresos es la venta de grano seco (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022) y en muchas regiones, como en el caso de la Sierra Nevada de Santa Marta, constituye una alternativa para la sustitución de cultivos ilegales (Guarín et al., 2024).

Actualmente tanto el cultivo de cacao, como la exportación de grano seco y sus derivados se han encontrado en una situación coyuntural, debido a la entrada en vigor del reglamento 488 de 2014 impuesto por la Unión Europea, el cual buscaba regular los contenidos de cadmio en los alimentos, puesto que se proyectaba un problema de salud pública a corto plazo (García et al., 2021). Al respecto, el cadmio (Cd) es considerado un metal tóxico para la mayoría de los seres vivos, dando lugar en el caso de los humanos, a afectaciones en el sistema respiratorio, necrosis del tejido renal, descalcificación ósea e incluso procesos carcinogénicos (Pérez & Azcona, 2012). Adicionalmente, el cadmio en las plantas genera alteraciones fisiológicas, como lo son disminución en los pigmentos fotosintéticos que afectan la fotosíntesis, el balance hídrico y el metabolismo (Chancay Alcívar et al., 2022).

Por otra parte, el cadmio es un metal que se encuentra de manera natural en los suelos colombianos en formas biodisponibles, debido al carácter ácido de los mismos y el alto porcentaje de arcillas, característicos del territorio nacional (Mendoza-Escalona et al., 2021). Sin embargo, se ha determinado que el principal aporte de cadmio en los suelos colombianos está dado por actividades humanas tales como la minería (refinación de otros metales como el cobre), fertilización con sustancias fosforadas y quema de combustibles fósiles (Chancay et al., 2022).

Adicionalmente, en Colombia, uno de los materiales de cacao más usados como porta injerto es el IMC67 (Iquitos Marañon Collection), que junto con PA121 están avalados por el Consejo Nacional Cacaotero. Sin embargo, actualmente, ambos materiales han demostrado una baja tolerancia a la presencia de cadmio y altos niveles de absorción en los tejidos radiculares, llegando a absorber entre 40 y 50 mg/kg en la raíz y entre 75 y 85 mg/kg en la lámina foliar, las cuales son cantidades alarmantes teniendo en cuenta el límite máximo de consumo establecido por la Unión Europea de 2mg/kg de peso corporal (Fernández, 2022). En contraste, el material FEC2, ha demostrado una mayor tolerancia, llegando a absorber en la raíz un promedio de 3,6 mg/kg (Hoogerwerf, 2020), mientras que el comportamiento del material TCS01 frente al estrés por cadmio (producido por fitomejoradores de AGROSAVIA), aún es desconocido.

De esta manera, tanto instituciones públicas como privadas del país, han demostrado un gran interés en el estudio de la absorción del cadmio y la respuesta tanto fisiológica, como fenológica y genética del cacao, con la finalidad de proponer estrategias de mitigación de la presencia de cadmio en tejidos comestibles del cacao (Álvarez et al., 2021). De estos, unos de los más importantes pueden ser aquellos en donde se analizan los cambios de la expresión de genes específicos, que están involucrados en el proceso de asimilación de cadmio en la planta de cacao. De dichos genes, la familia de *NRAMP*'s o Proteínas de macrófagos asociados a la inmunidad natural, cobran gran relevancia, al estar involucrados en el transporte de cationes divalentes como el hierro, que son muy similares en composición y estructura al cadmio, por lo que este ingresa a la célula vegetal de la

raíz de forma diferencial, debido a la proporción de transcritos presentes en la membrana (Ullah et al., 2018).

En este sentido, el presente estudio se propone evaluar los diferentes niveles de expresión del gen *NRAMP5* en las tres variedades seleccionadas (IMC67, FEC2, TCS01) con la finalidad de evidenciar la respuesta de cada uno de ellas en condiciones de estrés por cadmio. Los resultados permitirán implementar estrategias de mitigación del cadmio en tejidos comestibles de cacao, mediante la sustitución de las variedades más utilizadas en la actualidad como portainjerto por materiales genéticos más tolerantes. Adicionalmente, esta reducción del cadmio presente en el grano seco permitirá alcanzar una mayor competitividad comercial del cacao colombiano en el mercado europeo, cuya demanda es la más alta del mundo (Charry et al., 2022)

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 Marco conceptual

#### Origen histórico y geográfico del cacao (*Theobroma cacao* L.)

La especie *Theobroma cacao* L. fue descrita por primera vez en el siglo XVIII por el botánico Carl Von Lineo, quien adjudicó el género *Theobroma* por su significado en griego “Bebida de los dioses” y el epíteto cacao debido a que así lo nombraba la civilización Olmeca (Kozicka et al., 2018). La planta, es originaria de la cuenca alta del río Amazonas, en donde convergen este y el río Orinoco, junto con sus tributarios; cerca a la actual frontera entre Colombia, Brasil y Ecuador (ICCO, 2018). Desde esta región, la especie fue distribuida hasta llegar a centro América, por medio de dispersores de semillas como las aves y las comunidades indígenas nómadas, que tenían un rango amplio de distribución. De esta manera, empezó a cultivarse al norte de Colombia, pasando por el Darién hasta llegar a territorio mexicano.

#### Descripción botánica del cacao

La especie *Theobroma cacao* L. pertenece a la familia Malvaceae y subfamilia Sterculioideae, la cual contiene 12 géneros con 430 especies. Se caracterizan por ser árboles de bajo porte, de tallo leñoso y frutos carnosos indehiscentes (Schwarz, 2020). Actualmente se reconocen dos subespecies que son: *Theobroma cacao cacao*, que también es conocido como criollo y *Theobroma cacao sphaerocarpum*, conocido como forastero (Alfonso, 2022).

Adicionalmente, se caracteriza por ser un árbol perenne, semicaducifolio que presenta pubescencias en sus estados inmaduros (plántula). Su corteza es de un color oscuro (tonalidades de café y gris) y su crecimiento se da de forma apical, inicialmente alcanzando 1 o 1.5 metros de altura, en donde forman de 3 a 5 ramas laterales y obteniendo una altura final de 4 a 10 m en su estado maduro (Batista, 2009). Su sistema radicular se compone de una raíz principal que crece hacia abajo, alcanzando los 2 m de profundidad y raíces secundarias que se desprenden de esta y alcanzan los 30 cm de longitud. Dichas estructuras le dan anclaje a la planta, le permiten captar nutrientes y agua, así como recibir estímulos del ambiente (Salvador et al., 2012).

Por otra parte, las hojas de esta especie poseen una forma ovada y asimétrica angostándose en sus extremos, su textura es coriácea, simpley pubescente aleatoriamente en ambas caras. Sus inflorescencias son cimosas y caulinares, cada flor es hermafrodita, pentámera y actinomorfa, recubierta por sépalos de colores verdosos a blancos, lanceolados y que se fusionan con la base de la flor.

Adicionalmente, el color de los pétalos es generalmente blanco o amarillo, con venas violetas y de forma recurva y apiculada (Cáceres, 2023).

El fruto es de tipo baya de gran tamaño, glabro y fusiforme, se caracteriza por poseer colores desde verde a vino tinto, pasando por violeta y amarillo (dependiendo de la variedad), también posee de 20 a 50 almendras de forma ovalada ligeramente aplanadas, las cuales están recubiertas por mucilago azucarado (Dostert et al., 2011).

### Variedades de cacao

Según la ICCO (Organización Internacional del Cacao) el cacao se clasifica en tres variedades, las cuales son:

**Criollo:** Considerado el cacao puro, dominó el mercado internacional hasta el siglo XVIII. Este se originó en la dispersión por el sur de Venezuela, Colombia y Ecuador, hasta llegar a México. Dicha variedad comprende árboles delgados y de porte pequeño, sus frutos también presentan una cubierta más delgada y de pigmentación rojiza. El análisis de sus diferentes ecotipos señala una alta depresión endogámica y por ende una mayor susceptibilidad a enfermedades. Finalmente, su participación en la producción mundial es del 5 al 10 % y es conocido por su baja concentración de taninos, por lo que es el cacao de mayor calidad, reservado para la producción de chocolates finos y de aroma (López et al., 2021).

**Forastero:** Es la variedad más ampliamente distribuida en el mundo y tuvo sus orígenes cuando se distribuyó en la zona baja de la Amazonía, en el norte de los territorios del actual Brasil y Guyanas. Sus frutos son generalmente grandes y gruesos, teniendo un pericarpo de color verde y mesocarpo con altas cantidades de lignina. La representación de cultivares de forastero en la producción mundial es cercana al 80%, por lo que es la variedad más utilizada en el mundo. Sus características organolépticas son de baja calidad por lo que es necesario aumentar los tiempos de tostado para mejorar su sabor, generalmente se mezcla con granos de cacao criollo para darle cuerpo y amplitud (Salazar, 2022).

**Trinitario:** Es el resultado de cruzamientos espontáneos entre las variedades Criollo y forastero, sus plantas son robustas, con frutos de tonalidades verdosas o pigmentados, con diferentes tonalidades de violeta en sus semillas. Representan entre el 10 y el 15% de la producción mundial (Dostert et al., 2011). Al ser un híbrido entre cacao criollo y forastero posee la robustez del tallo y las mazorcas del forastero, pero con parte del fino sabor del cacao criollo (Erazo et al., 2021).

### Requerimientos agronómicos del cultivo

El cacao (*T. cacao*) es una planta de origen tropical en la Amazonía del continente americano, se desarrolla en la sombra de árboles de mayor porte, en suelos con buen drenaje y con abundante materia orgánica. Requiere una temperatura mínima de 16°C, precipitaciones anuales iguales o superiores a los 2000 mm y se distribuye

en un gradiente altitudinal que abarca desde los 0 a los 1000 msnm (Chancay et al., 2022). Dentro de los principales atributos que caracterizan a una parcela de cacao productiva, se encuentran los siguientes:

**Condiciones climatológicas:** El rango de temperatura debe encontrarse entre los 16 y 38°C en la noche y en un día caluroso respectivamente, debido a que, superados estos límites, la planta comienza a tener problemas fisiológicos. Las temporadas de lluvias en el año deben ser recurrentes, puesto que no pueden excederse los 2 meses de sequía, una buena cantidad de lluvia para el cultivo está entre los 1.500 y 2.500 mm anuales. Respecto a la humedad relativa, su valor óptimo deberá ser cercano al 80%, aunque se ha determinado que en humedades del 70% puede desarrollarse bien (Pinzón et al., 2012).

**Condiciones edáficas:** Al ser un cultivo de gran longevidad, se hace necesario realizar un análisis de suelo, que permita identificar si este cumple con los requerimientos mínimos para el desarrollo del cacao. Lo primero que se considera es la dimensión física del suelo, en la cual se evalúa su estructura, obstáculos para el crecimiento de las raíces, profundidad y nivel freático (agua subterránea). Por otra parte, se deberá realizar un análisis químico del suelo, en el cual se determinará la fertilidad y permitirá corregir condiciones como la acidez o deficiencia de nutrientes. En los casos en que se establece el cacaotal en suelos apropiados para cultivos permanentes se requiere: pH de entre 5,6 y 6, de 2,4 a 438 kg/ha de N (dependiendo del estado de desarrollo de la planta), de 0,6 a 48 kg/ha de P, de 2,4 a 633 kg/ha de K, de 2,3 a 373 kg de Ca y de 47 a 129 kg de Mg + elementos menores. Es necesario tener en cuenta que suelos con buen drenaje y agregados arcillosos favorecen los rendimientos del cultivo (CNCh, 2021).

Finalmente, se deben considerar las épocas de cosecha y floración para evitar la aparición y propagación de enfermedades. Una de las más conocidas es la moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, para el cual se han implementado estrategias de control biológico como el uso de inóculos de microorganismos como *Trichoderma* spp. (Pilaloe David et al., 2021).

### El cacao en Colombia

En Colombia, el cacao se cultivó a escala comercial entre los años 1550 y 1810, iniciando las exportaciones en el año 1580 y posicionándose como el segundo rubro de exportación en la época colonial. Los primeros cultivos presentes en el país tuvieron lugar en las vertientes de la cordillera oriental, extendiéndose luego al occidente, donde comenzó una gran expansión, llegando a establecerse en la cuenca del Atrato y el Darién (donde se exportaba cacao a Jamaica) y en la Sierra Nevada de Santa Marta para el año 1693. Posteriormente, a inicios del siglo XVIII, el contexto posindependencia generó alzas en los impuestos, que, en conjunción con un periodo de lluvias prolongado, disminuyó la producción significativamente en todo el país. Sin embargo, a finales del mismo siglo el departamento del Huila ya cantaba con cultivos de cacao en algunos de sus municipios (CNCh, 2021).

De esta manera el cacao actualmente se constituye como una agro-cadena de gran importancia para la economía colombiana puesto que dicho cultivo está presente en 29 de los 32 departamentos, siendo los más representativos: Santander, quienes producen 22.899 toneladas que representan el 36,8% de la participación nacional, Arauca, con 10.520 ton que representan el 16,9%, Antioquia con 5.188 ton y una de participación del 98,3%, Tolima con 3.593 ton y participación del 5,8%, Huila con 3.518 ton y participación del 5,7% y por último, Nariño con 3.372 ton y una participación del 5,4% (FEDECACAO, 2022). La coyuntura presentada por la pandemia global COVID-19, tampoco generó grandes repercusiones en la exportación del cacao, dado que, en el año 2021, se rompió un récord de exportación, llegando a producirse 69.040 toneladas que representaron un crecimiento en el sector del 8,9% respecto al año 2020. De estos, el departamento del Huila se consolidó en el año 2023 como el cuarto productor de mayor fuerza en el país, superando al departamento del Tolima y generando el 6,8% de la producción nacional para ese año. De estos valores el 95% corresponde al trabajo de 2.500 familias pertenecientes a 35 de los 37 municipios del departamento, que ocupan un área de producción de más de 8.000 hectáreas (FIC, 2023).

Sin embargo, desde 2014, la Unión Europea estableció el reglamento 488, que entraría en vigor en el año 2019 y donde se determinó el contenido máximo de cadmio en los subproductos del cacao, teniendo en cuenta el porcentaje de sólidos de cacao en el producto final ( $x < 30\%$  -  $0,1\text{mg}\cdot\text{kg}$ ,  $x < 50\%$  -  $0,3\text{mg}\cdot\text{kg}$ , cocoa -  $0,6\text{mg}\cdot\text{kg}$ ,  $50\% \leq x$  -  $0,8\text{mg}\cdot\text{kg}$ ) (UE, 2014). La implementación de estas regulaciones generó un impacto negativo en las exportaciones colombianas, debido a que países como Holanda, Suiza, Países bajos, Inglaterra, entre otros, consumen el 60% del cacao exportado alrededor del mundo (Chancay Alcívar et al., 2022).

#### Fuentes de cadmio y su proceso de absorción en cacao

En la actualidad se reconocen dos fuentes del Cadmio presente en los suelos colombianos, la primera de ellas es la natural y está dada por: la actividad volcánica (que libera grandes cantidades de  $\text{Cd}^{2+}$  a la atmósfera que luego se precipita a los suelos) y la deposición en los suelos dada por mecanismos de erosión como derrumbes o el curso de afluentes hídricos. Estos últimos, al formar parte integral de una gran porción de los territorios, se encargan de distribuir el Cd llegando a los cultivos (Fernández et al., 2020).

Por otra parte, se encuentran las fuentes antropogénicas, las cuales han demostrado ser el principal aporte de cadmio en Colombia. Estas se dan por incendios forestales, procesos de refinación de otros metales en la minería (como cobre y zinc), aplicación de fertilizantes fosforados y la quema de combustibles fósiles (Chancay Alcívar et al., 2022). Así mismo, la baja rotación de los cultivos o la implementación de monocultivos de alto rendimiento y gran longevidad, aumentan la acidez en el suelo (Castellanos, 2016; Vásquez, 2019), lo que da lugar a la formación de complejos solubles de Cd fácilmente asimilados por las plantas (Mendoza-Escalona et al., 2021).

El cacao es un acumulador moderado de cadmio, y en la actualidad sus mecanismos de asimilación no son claros. Algunos autores sugieren que el mecanismo de translocación se da de manera diferencial respecto a otras especies vegetales, dado que, en la mayoría de éstas, los metales pesados se movilizan gracias a la transpiración, concentrándose primero en el tallo, ramas y hojas, para finalmente moverse a las estructuras reproductivas de la planta. Sin embargo, en cacao, se sugiere que el transporte de cadmio se da unidireccionalmente de la raíz a los tejidos aéreos (Barraza et al., 2019), acumulándose en hojas, brotes y tallos, mientras que el suministro a los frutos se da vía floema desde depósitos ubicados en el cuello del tallo (Barraza et al., 2019). Dichas afirmaciones están sustentadas en estudios de la toma y asimilación de isótopos de  $Cd^{2+}$  en especies de cereales y cacao, ya que se ha demostrado que los más ligeros se unen preferencialmente a las vacuolas en la raíz, mientras que los más pesados migran a los brotes, generalmente por el floema (Wiggenhauser et al., 2021).

El mecanismo en mención supone un problema en cultivos nuevos y viejos, dado que en los primeros el estrés fisiológico por la presencia de cadmio puede generar la muerte de la planta, mientras que en los segundos el metal tiende a acumularse mayoritariamente en tejidos como la hoja y los frutos, generando problemas en la salud de quienes los consumen (Moore et al., 2020).

#### Respuesta fisiológica del cacao frente al estrés por cadmio

El ingreso de cadmio a la planta de cacao se ve favorecido por condiciones edáficas, tales como presencia de ácidos húmicos (que generan enlaces fuertes con el cadmio por medio de grupos carboxílicos y fenólicos), pH ácido (por debajo de 4,5) y la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Mendoza et al., 2021). Por otra parte, las condiciones del desarrollo y fisiología de la planta también influyen en este proceso, como lo son una extensa área del sistema radicular secundario (debido a que la absorción de cadmio se da principalmente por estas raíces), una alta inespecificidad de las proteínas de transporte de iones metálicos y una eficiente difusión, movilizándolo por medio de células parenquimatosas a los haces vasculares (xilema y floema) y finalmente concentrando el  $Cd^{2+}$  en los órganos aéreos de la planta (Sandoval, 2019).

Según Charrupi & Martínez (2017), una baja concentración de cadmio en la planta de cacao induce la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes (peroxidasas III y superóxido dismutasa (SOD)), lo cual reduce drásticamente el estrés oxidativo. No obstante, como las concentraciones de  $Cd^{2+}$  en los suelos latinoamericanos son más altas que en otros lugares del mundo (como algunos países de África), generalmente este exceso causa importantes problemas metabólicos en la planta, como lo son la desorganización de cloroplastos (bajas tasas fotosintéticas), disminución del contenido de clorofilas en las hojas, deformaciones en los núcleos de las células de las raíces, modificaciones en el proceso de transpiración y disminución en el número de semillas. Respecto al material genético, el cadmio detiene el ciclo celular por daños en el ADN nuclear y genera la degradación de la membrana celular, generando cambios en la morfología

de sus flores y embriones, así como modificaciones en el metabolismo del nitrógeno y el azufre (Chancay et al., 2022).

Finalmente, según nuevos postulados teóricos, se ha establecido que el cacao podría estar sujeto a presiones de selección debido al estrés por cadmio, lo cual daría lugar a la síntesis de nuevas proteínas específicas para la absorción y transporte del metal. Estas hipótesis se soportan con estudios que han evaluado la función del cadmio presente en hojas de cacao, como inhibidor de plagas, tales como, las orugas ramoneadoras de hoja *Spodoptera litura* y *Lymantria dispar* (Chouhan et al., 2017; Kazemi et al., 2014).

### Respuesta bioquímica del cacao al estrés por cadmio

Se han desarrollado estudios en fresa (*Fragaria x ananassa Duch*) en donde se evaluó la respuesta bioquímica de la planta frente a diferentes concentraciones de cadmio en suelos enriquecidos (Martínez, 2014). En este estudio se determinó que existía una correlación negativa entre la concentración de cadmio y los contenidos de clorofilas *a* y *b*, presentando una mayor disminución en la clorofila *b*. Se ha determinado que dichas disminuciones se deben a la interacción del cadmio con los sitios sulfidrilo de las enzimas: ácido  $\Delta$ -aminolevulínico deshidratasa, la protoclorofilida reductasa, que generan la inhibición de estas (Parmar et al., 2013).

Por otra parte, se ha reportado una respuesta ante la formación de radicales libres de oxígeno causados por la presencia de cadmio en guisantes (*Pisum sativum*), como lo son la formación de complejos antioxidantes. Algunos de estos son: peróxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y ascorbato peroxidasa (APX), que sufren incrementos o disminuciones en su actividad en función de la concentración de cadmio (Charrupi & Martínez, 2017). De estos, APX cobra gran relevancia al eliminar  $H_2O_2$ , reaccionar con radicales hidroxilos (OH) y reducir  $O_2$ , contando con grandes cantidades producidas en la mitocondria y que pueden exportarse a cualquier organelo de la célula. (Rodríguez, 2007).

Adicionalmente, en experimentos realizados en pimiento (*Capsicum annuum*) y brócoli (*Brássica oleracea*) se determinó que en soluciones hidropónicas la presencia de Selenio (Se) inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) al formar complejos con el cadmio sin llegar a generar toxicidad en los tejidos foliares y radiculares, proponiéndolo como un suplemento de gran importancia para suelos contaminados con el metal (Pérez-Millan et al., 2021).

Finalmente, se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de cadmio en los contenidos de pigmentos fotosintéticos en 4 accesiones de cacao (IMC67, PA121, IMC67\*PA121 y PA121\*IMC67) las cuales son actualmente las más ampliamente distribuidas en el mercado como portainjertos. En los resultados se reportó un aumento significativo de los contenidos de clorofila *a* (Chl *a*) y *b* (Chl *b*) para el portainjerto IMC67 (42% - 32%) y PA121\*IMC67 (28% - 30% respectivamente) respecto al control. Dicho fenómeno puede estar dado por las

diferencias en las tasas de síntesis de pigmentos en tejidos foliares jóvenes y viejos, dados por el efecto tóxico del cadmio (Fernández, 2022).

### Mecanismos de tolerancia del cacao a toxicidad por $cd^{2+}$

Según Gonzales & Zapata, (2008), las plantas poseen tres mecanismos generales de tolerancia a metales pesados, los cuales se clasifican según sus asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos, procesos fisiológicos propios de la planta y reacciones químicas que neutralizan las moléculas extrañas que ingresan a ellas. El primero de ellos denominado “mecanismo externo de tolerancia” ha sido evaluado en cacao, mediante la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), los cuales, demostraron reducir considerablemente las concentraciones de cadmio en los suelos, además de mejorar el tamaño del fruto, la cantidad de almendras y generar un aumento en el peso de éstas últimas (Sisalima et al., 2023). Dichos resultados concuerdan con el experimento realizado por Coninx et al., (2017), en la provincia de Zamora Chinchipe – Ecuador, donde describieron que los HMA presentan un mecanismo de respuesta intracelular en el que producen tioles no proteicos que se unen al cadmio y lo desplazan a compartimentos intracelulares de la planta.

Por otra parte, el segundo mecanismo, se denomina “mecanismo interno de tolerancia”, el cual se fundamenta en la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, secretados en los exudados de las raíces. Dichos compuestos permiten la solubilización, quelación, precipitación y oxidorreducción de elementos esenciales y no esenciales, como el cadmio. Sin embargo, aunque son numerosos los estudios que mencionan esta respuesta de tolerancia al cadmio en diferentes especies de plantas, incluyendo inferencias sobre dichos mecanismos en la planta de cacao, se desconocen estudios que los evalúen directamente (Patiño & Julca, 2021).

Finalmente, se encuentra el mecanismo de “quelación de metales en el citosol”, que es llevado a cabo por diferentes ligandos como ácidos orgánicos y polipéptidos. En plantas, se ha identificado que las fitoquelatinas cumplen la función de secuestrar iones de cadmio, eliminando así su movilidad al interior de los haces vasculares (Davodpour et al., 2019). Del mismo modo, se han realizado ensayos con el objetivo de disminuir las concentraciones de cadmio en el cotiledón del cacao mediante la aplicación de agentes quelantes sintéticos, en los cuales se determinó que el mayor aporte de cadmio a la semilla se da en el proceso de fermentación y secado poscosecha, por lo que una mejor estrategia para disminuir las concentraciones de este metal está dada por la remoción del mucílago posterior a la recolección de la mazorca (Cedeño, 2020).

### Perfil genético del cacao:

El cacao es una planta perenne diploide ( $2n=2x=20$ ), con dos subespecies reconocidas de las que se originaron variedades clonales de mayor rendimiento

agronómico, como las que se conocen actualmente (Atiencia-Córdova, 2024). Un claro ejemplo de estos procesos de mejoramiento genético es la diferencia entre los genomas de la variedad criolla y el clon T. cacao Martina 1-6, puesto que el primero tiene un tamaño aproximado de 430 Mpb mientras que el segundo un tamaño mayor a 445 Mpb. Del genoma de la variedad criolla se destaca la presencia de 28.798 genes, que transcriben 682 familias proteicas, las cuales cumplen funciones como: resistencia a enfermedades, síntesis de pigmentos, compuestos elicitors, entre otras (Ricaño Rodríguez et al., 2018).

Para la variedad Forastera, distribuida ampliamente en centroamérica, se reconocen poblaciones al sureste de México que contienen 12 alelos únicos agrupados, que se diferencian bastante de los fenotipos domesticados. Estudios más recientes de genética poblacional y diferenciación geográfica, indican que existen diez variedades (Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana) así como un subgrupo de 20 ecotipos de cacao mexicanos (Motamayor et al., 2008). El genoma del cacao, en su versión más actualizada del 2018 (99% de cobertura), dando lugar a numerosos ensayos in silico de gran importancia para ampliar el conocimiento de la genética en la especie (Ricaño-Rodríguez et al., 2019).

#### Variedad IMC 67

Es originario de Iquitos – Perú, de pedigrí forastero del Alto Amazonas, es muy resistente a enfermedades y su porte es robusto y vigoroso. Normalmente es utilizado como porta injerto en los diferentes clones puesto que su productividad, calidad de grano y compatibilidad (Autoincompatible), lo hacen poco competitivo en el mercado actual. Normalmente se desarrolla en un gradiente altitudinal y climático flexible, pudiendo cultivarse en alturas que van desde los 0 a los 1.200 msnm a temperaturas que abarcan desde los 20°C a los 35°C (ECOYUMA, 2024). La selección de esta variedad en el presente estudio estuvo dada por su importancia como el portainjerto más utilizado en centro y sur américa, además, se ha demostrado que posee un alto potencial de absorción de cadmio y la proporción de este en los tejidos comestibles también varía dependiendo de la copa, llegando a identificarse hasta 33 ppm de cadmio en tejido radicular, en suelos contaminados con 7,49 ppm, 2 meses después de añadido el metal pesado (Fernández, 2022)

#### Variedad FEC 2

Originario de “El Carmen” departamento de Santander – Colombia, su pedigrí es de híbrido trinitario por lo que sus características organolépticas son de calidad intermedia. Posee una resistencia moderada a enfermedades (susceptible a moniliasis del cacao) y genera rendimientos de 1,64 kg por árbol, que representa un incremento del 69,87% respecto a la productividad del material IMC67. Su óptimo de desarrollo se alcanza en alturas superiores a los 600 msnm e inferiores a los 1.200, con un promedio de temperatura de 26°C y humedad relativa entre el 70% y 80% (ECOYUMA, 2024). Por otra parte, este material fue seleccionado por su alta tolerancia al cadmio reportada en un estudio desarrollado por la universidad de Gent

en Bélgica, en donde se evaluó el rol del genotipo en la absorción de cadmio en cacao colombiano y se determinó que FEC2 absorbe en promedio 2,73 ppm de Cd (Hoogerwerf, 2020)

### Variedad TCS 01

Theobroma Corpoica la Suiza o TCS01, es un material producido por fitomejoradores del centro de investigación La Suiza de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Su pedigrí es una mezcla de materiales híbridos de tipo criollo, que generan una alta resistencia a la moniliasis del cacao (83%) y su rendimiento anual promedio es de 3,3 kg. Su desarrollo óptimo se consigue en alturas que rondan los 600 y 1200 msnm, con una temperatura media de 26°C y humedades relativas que se encuentren entre el 70% y 80% (AGROSAVIA, 2024). La información respecto a la absorción de esta variedad es desconocida, al tratarse de un material producido en el centro de investigación La Suiza (AGROSAVIA, 2024).

### Genes involucrados en la absorción, translocación y acumulación de cadmio en cacao

En la actualidad, la mayor cantidad de información disponible sobre los mecanismos de absorción, transporte y acumulación de cadmio en la planta de cacao se debe a homologías con especies modelo como *A. thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, entre otras. Dentro de los resultados más relevantes, se encuentra la identificación de ocho familias de genes (Rodríguez et al., 2020) asociadas a estos mecanismos fisiológicos en diferentes especies de plantas, de las cuales se destacan los siguientes:

ZAT -1: Fue descubierto en *A. thaliana* y codifica una proteína de transporte de zinc y cadmio, su función también está relacionada con el secuestro de cadmio en las vacuolas celulares (reconocimiento de metales pesados).

OPT3: Descrito en *A. thaliana* y *Arachis hypogaea*, codifica para una proteína intermembrana que transporta hierro y cadmio al citosol. También facilita la movilización de la xilema al floema.

HMA3: Descrita en *O. sativa*, *A. thaliana*, *Arabidopsis halleri* y *Sedum plumbizincicola*, codifica para una proteína de la vacuola que transporta cadmio y zinc en tejidos de la raíz, así como impide la translocación del cadmio a los brotes y cotiledones en formación.

HMA4 – HMA2: Descritos en *A. thaliana*, *A. halleri* y *O. sativa*, son transportadores de zinc y de cadmio vía xilema, así como también se encargan de translocar cadmio desde las raíces al tallo.

ABCC1, 2 y 3: Descrito en *A. thaliana*, es una bomba de conjugados para glutatión S. Dicha proteína permite el transporte de cadmio en forma conjugada.

NRAMP 1: Descrito en *A. thaliana* y *O. sativa*, codifica una proteína mediadora en el proceso de secuestro y acumulación de cadmio en la raíz. Su función principal es la del transporte de hierro por medio de vacuolas y se encuentra en la membrana celular (Brenz et al, 2017).

NRAMP 3 y 4: Descritos en *A. thaliana* y *Noccaea caerulea*, codifican proteínas redundantes para el transporte vacuolar de hierro, cadmio y manganeso.

NRAMP 5: Descrito en *A. thaliana*, *A. hypogaea*, *Z. mays*, *Brassica juncea*, entre otras especies, es un transportador de hierro y cadmio en la membrana celular de la raíz, el tallo, las hojas y estructuras reproductivas.

ZIP 2 y 3: Descritos en *A. thaliana* y *O. sativa*, se encarga de mediar la absorción de cobre, cadmio y zinc.

DTX1: Descrito en *A. thaliana*, se encarga del proceso de detoxificación del cadmio, trasladándolo del citosol al apoplasto (Rodríguez et al., 2020).

De dichos genes se destacan AtNRAMP1 (NRAMP1 en *A. thaliana*) que se correspondía con TcNRAMP5 (NRAMP5 en *T. cacao*) y OsNRAMP5 (NRAMP5 en *O. sativa*) con TcNRAMP6, ambos con un porcentaje de identidad superior al 90%. Así mismo, se identificó que AtZIP3 y OsZIP5, se correspondían con TcZIP5 y TcZIP1 respectivamente, con un porcentaje de identidad mayor al 50% (Pacheco et al., 2023). Algunas de estas familias, han sido utilizadas para el análisis de la expresión genética en condiciones de estrés por cadmio, de las cuales la familia de NRAMP's, o proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural, han demostrado desempeñar una función fundamental en la absorción y movilización de Cd en la planta de cacao (Rodríguez et al., 2020).

#### Familia NRAMPs (Proteínas de macrófagos asociadas a la resistencia natural)

Son una familia de genes presentes en todos los reinos de la naturaleza, cuya función es absorber y transportar iones metálicos ( $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  y  $Al^{+3}$ ). En el caso del cacao, este requiere de  $Mn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  para su adecuada nutrición, por lo que el  $Cd^{+2}$ , al ser un catión divalente como los micronutrientes mencionados, es capaz de interactuar con las proteínas Nramps, quienes lo absorberán por la raíz y lo translocarán a diferentes tejidos de la planta (Ullah et al., 2018). En la familia de NRAMP's 1, 2, 3, 4, 5 y 6, cada gen codifica una proteína de entre 510 a 557 aminoácidos, con puntos isoeléctricos que oscilan entre 4,98 y 8.29. De estos, NRAMP 1 y 5 se encuentran en el cromosoma 8 del cacao y se expresan predominantemente en la raíz en presencia de cadmio. Del gen NRAMP5 en cacao, se ha estudiado su origen evolutivo mediante análisis de homologías con especies ancestrales como *A. thaliana*, identificando un evento de duplicación en tándem que dio lugar a un proceso de subfuncionalización (la información genética extra, está asociada con nuevos dominios del gen que complementan la función ancestral del mismo) (Ullah et al., 2018).

Actualmente, gracias a ensayos de homologías para predecir la estructura y función de los genes, se determinó que la familia NRAMP's, está encargada de la absorción, transporte y acumulación de cadmio en la planta de cacao. De esta familia se destaca el gen NRAMP5, el cual codifica para una proteína integral de la membrana celular de la raíz, cuya función es absorber iones metálicos del suelo por transporte activo (Ullah et al., 2018). Dicha proteína, permite el ingreso de cadmio a la planta por su similitud con nutrientes metálicos menores, generando alteraciones en la homeostasis celular y el metabolismo. Lo anterior se debe a que la planta de cacao no cuenta con mecanismos eficientes de quelación y secuestro, que le permitan neutralizar los efectos del metal en su ingreso y desplazamiento por los haces vasculares (Fernández, 2022).

Por otra parte, un estudio realizado en la escuela de agricultura, política y desarrollo de la universidad de Reading en Reino Unido, evaluó la expresión del gen NRAMP 5, concluyendo que no existe una relación clara entre la presencia de Cd<sup>2+</sup> y un aumento en la expresión, siendo el tratamiento carente de hierro, el que reportó mayores niveles de expresión del gen (15 veces mayor). Sin embargo, pese a que no pudo establecerse una relación clara, se realizó un análisis de expresión heteróloga en levaduras, buscando simplificar la respuesta de expresión en la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual, se confirmó la enorme sensibilidad del gen NRAMP 5 de cacao al cadmio, ya que presentó un 70% de inhibición en el crecimiento de las colonias en altas concentraciones de este (Ullah et al., 2018).

Gen NRAMP1: Se encuentra en el cromosoma 8 del cacao y codifica una proteína integral de membrana que permite el paso de iones metálicos a la célula. Su tamaño es de 5.681 pb que codifican un péptido de 558 aminoácidos, se conoce como una isoforma del gen NRAMP5 por su alto porcentaje de similitud en su secuencia proteica (92%) y afinidad estructural (13 exones y 12 intrones) (Phytozome, 2024).

Gen NRAMP5: En cacao, se estableció una secuencia predictiva para el gen el transportador de metales NRAMP5, la cual posee un tamaño de 5.366 pares de bases, que codifican un péptido de 557 aminoácidos (NCBI, 2023). Respecto a la estructura del gen, este posee 13 exones y 12 intrones con 10 dominios transmembrana y se encuentra en el cromosoma 8 del cacao, muy cerca del gen NRAMP1. Dicho gen se expresa diferencialmente en los tejidos de la planta, llegando a encontrarse mayoritariamente en tejidos de la raíz y en menor medida en botones florales (Sasaki, 2012).

Adicionalmente, se determinó por medio de secuenciaciones de ADN genómico del cacao, la presencia de una variante más corta del gen NRAMP5, que codificaba una proteína de 510 aminoácidos, debida a deleciones parciales en los exones 10 y 12, así como una deleción completa del exón 11. Al evaluar la absorción de este material, se identificó una nula afinidad de la proteína con los iones metálicos, lo que indica la gran importancia de la región carboxilo terminal en la función de ésta (Ullah et al., 2018).

Gen NRAMP2: Se encuentra en el cromosoma 1 del cacao, estructuralmente posee de 3 a 4 exones y se expresa en una mayor proporción en tejidos de la raíz y botones florales. Se estima que su función en cacao está relacionada con la movilización de cationes metálicos en lugar de su absorción (Ullah et al., 2018)

Gen NRAMP3: Se encuentra en el cromosoma 1 del cacao, posee un tamaño de 1.530 pares de bases que codifican un péptido de 510 aminoácidos (InterPro, 2024; NCBI, 2016). Posee de 3 a 4 exones y se expresa uniformemente en raíz, tallo, hojas, botones florales, fruto y semillas, es decir, presenta una expresión constitutiva en la planta. En ensayos de sensibilidad a cationes metálicos esenciales y no esenciales se determinó que NRAMP3 se sobre expresa en raíz en deficiencia de hierro y manganeso de forma independiente, mientras que, en presencia de cadmio, sus niveles de expresión permanecen estables. Esto indica que la función de la proteína es transportar cationes metálicos de manera selectiva. Además, en estudios recientes, se ha determinado que dicha proteína está encargada de la movilización de Fe<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> al aparato de Golgi para el crecimiento de las raíces en *A. thaliana* (Gao et al., 2018), lo que, junto con los resultados de la investigación de Ullah y colaboradores (2018), indica que la función de este gen en cacao está asociada a la movilización de cadmio en lugar de su absorción.

Gen NRAMP6: Se encuentra en el cromosoma 6 del cacao y posee un tamaño de 1.629 pares de bases que codifican un péptido de 543 aminoácidos (InterPro, 2024; NCBI, 2016). Se expresa predominantemente en raíz y botones florales y codifica una proteína de transporte específico de Mn<sup>2+</sup>, aunque se ha demostrado que posee una alta sensibilidad a la absorción de cadmio.

#### Gen de referencia: *Poliubiquitina (PUB)*

La poliubiquitina es un gen que codifica una enzima en las células eucariotas que se encarga del marcaje de otras proteínas cuyo destino será la degradación, debido a errores en el proceso de traducción y síntesis, que dan lugar a plegamientos erráticos de estas (Apolinar et al., 2024). Su estructura está conformada por 76 residuos, con una cola C-terminal conformada por 7 residuos de lisina que desempeñan la función principal del marcaje de proteínas (Kimura & Tanaka, 2010). Este gen fue seleccionado debido a su alta estabilidad ante diferentes estímulos (niveles de expresión constantes) y su similitud con el amplicón del gen NRAMP5, por lo que los parámetros de corrida en el termociclador fueron iguales (Pinheiro et al., 2011).

#### Gen de referencia: *Proteína Ribosomal L35 (RPL135)*

La proteína ribosomal L35, se encuentra en la estructura de los ribosomas, en donde se sintetizan las proteínas tanto en células eucariotas como en algunas procariontes como las bacterias (Helm, 2021). Dicha proteína forma parte del sitio activo del ribosoma, específicamente en la subunidad mayor de ARN ribosomal, compuesta por aproximadamente 45 proteínas adicionales en células eucariotas. Su función principal, además de permitir la correcta síntesis de proteínas (unida al sitio peptidil

(P) – unión de aminoácidos), es mantener la integridad estructural del ribosoma (Sánchez Mora et al., 2024).

## 2.2 Marco metodológico

### Selección de materiales

Actualmente en Colombia los portainjertos que más se utilizan en el establecimiento de cultivos de cacao son los materiales peruano IMC67 (Iquitos Maraño Collection) y PA121 (Fernández, 2022), los cuales se caracterizan por absorber grandes cantidades de cadmio del suelo (entre 50 y 120 ppm) y acumularlo en tejidos como las hojas y frutos (Fernández et al., 2021). Por otra parte, el material FEC2 es conocido por su alta tolerancia a la presencia, llegando a reportar valores promedio de 3,6 ppm de cadmio en tejido foliar y fruto (Hoogerwerf, 2020).

### Selección de variables

Moleculares: Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica con la finalidad de identificar los valores cuantificables que puede tomar la expresión genética mediante el análisis de bandas en PCR de punto final. Se determinó que las diferencias en la intensidad de la banda (saturación por cantidad de píxeles) se corresponden directamente con la cantidad de ARN mensajero sintetizado y presente en la célula (Montero, 2016; Stephens-Camacho et al., 2022).

Fisiológicas: Según Fernández (2022), concentraciones altas de cadmio dan lugar a una importante reducción en la conductancia estomática, la transpiración y fijación de carbono en el ciclo de Calvin, por lo tanto, el proceso de fotosíntesis también se ve reducido ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ). Gracias a esta información, se seleccionaron los parámetros de fotosíntesis neta ( $P_N$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ) y transpiración ( $E$ ).

Bioquímicas: Según Rodríguez et al. (2024), la prolina es un aminoácido que es utilizado como marcador químico ante el estrés en plantas. Su función, es la de conferir protección celular mediante la neutralización de especies reactivas de oxígeno y células redox, así como aumentar la turgencia en las membranas celulares ante factores como el estrés hídrico y térmico (Wiebek et al., 2020). Por otra parte, teniendo en cuenta que el cadmio genera radicales libres de oxígeno debido a su composición química y carga eléctrica, se estima que esta respuesta ante el estrés por cadmio sea apreciable.

### Selección de gen objetivo y de referencia

En la revisión de literatura, se encontró un artículo en el que se realizó un experimento donde se analizaba la expresión de la familia de genes *NRAMP's* (Ullah

et al., 2018) bajo condiciones de estrés por cadmio en el material PA121. De los 6 genes pertenecientes a esta familia, se destaca el *NRAMP 5* cuya función está directamente relacionada con el transporte de cationes divalentes metálicos, debido a que la proteína es poco específica y permite el ingreso de cadmio por su parecido con elementos nutritivos menores como el hierro, zinc y manganeso.

Por otra parte, los genes basales Poliubiquitina (*PUB*) y Proteína Ribosomal L135 (*RPL135*) se seleccionaron teniendo en cuenta su estabilidad, eficiencia de reacción y tipo de tejido. Para el caso de *PUB* su estabilidad fue de 0,3, mientras que para *RPL135* fue de 0,45, convirtiéndolos en el segundo y cuarto más estables, entre los más de 10 genes evaluados (Pinheiro et al., 2011).

### Selección de método para análisis de expresión

Generalmente los resultados de base para el análisis de expresión de un gen objeto de estudio, se realizan por medio de métodos de cuantificación relativa como la PCR en tiempo real. En este caso, se optó por ejecutar un procedimiento de PCR convencional de punto final, para determinar diferencias en las intensidades de las bandas en los perfiles de bandeado de cada material. La metodología de análisis se conoce como análisis densitométrico, el cual se lleva a cabo por medio de programas de análisis de imágenes como Image J y Gel Analyzer, los cuales permiten determinar por medio de picos de información (agrupación de píxeles) la intensidad de banda inherente a cada producto de PCR. Adicionalmente, estos programas permiten establecer a los marcadores de peso molecular como referencia para calcular el tamaño del amplicón y por ende corroborar si el producto PCR corresponde a ADN complementario, ADN genómico o a errores en la reacción como lo son los dímeros (Garboza et al., 2011).

### Diseño del sistema hidropónico

Para reducir los factores de ruido y optimizar el proceso de absorción de cadmio, se estableció un montaje hidropónico según las recomendaciones de Ullah y colaboradores (2018), ubicando las plantas de forma aleatoria y agregando cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) en lugar de nitrato de cadmio [ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ] propuesto por los autores, debido a que este compuesto debido a su estructura requiere de una mayor cantidad de tiempo para ser absorbido (lenta liberación). Así mismo, según Bolaño & Coronado, (2023) un monitoreo constante de las variables fisicoquímicas de la solución como el oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, pH, entre otras, favorece la absorción de los nutrientes y cadmio.

Por otra parte, para mantener la seguridad del equipo de trabajo al manipular los tejidos contaminados con cadmio, la metodología propuesta por Nguyen y colaboradores (2016), permitió quelar la mayor proporción de cadmio en la superficie que pudiera entrar en contacto con la piel.

### Selección del protocolo de extracción de ARN total

Se tomó como referencia el estudio realizado por (Gallego et al., 2018) en el cual se evaluó la producción de flavonoides en células de cacao, para lo que requerían obtener muestras de ARN total de alta calidad (concentración y pureza). En dicho experimento combinaron dos metodologías de extracción, tanto la PureLink Plant RNA Reagent de la casa comercial ThermoFisher Scientific y RNeasy Plus Universal Mini Kit de Qiagen, que les permitieron tener altas purzas en las muestras y concentraciones adecuadas, sin embargo, teniendo en cuenta que en el momento se contaba únicamente con el kit de ThermoFisher Scientific, se realizaron pruebas independientes en las que al efectuar algunos ajustes de optimización, se pudieron obtener muestras de gran calidad de ARN total.

### Selección del kit para tratamiento con DNAsas y síntesis de ADNc

El kit iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis kit (Biorad) es ampliamente utilizado en análisis de expresión genética por medio de PCR en tiempo real, debido a la eficiencia de sus enzimas (ADNasa y Retrotranscriptasa) y que contiene los dos pasos necesarios para un correcto análisis de expresión (digestión enzimática y síntesis de cADN). Dicho protocolo ha sido usado desde inicios de la década pasada, en donde se realizaron análisis de patogenicidad de biofilms de *Staphylococcus epidermidis* y la optimización tanto del procedimiento de extracción de ARN total como la síntesis de ADNc y posterior Rtg-PCR (França et al., 2012). Por otra parte, artículos más recientes revelan que dicho protocolo también permite comparar la eficiencia de la ADNasa al sintetizar ADNc sin la digestión enzimática previa, determinando diferencias significativas en la expresión (mayor en muestras no digeridas) y una baja interferencia en la calidad e integridad del ARN por dicho tratamiento(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022).

### Selección de método para diseño de primers

Se utilizó el programa PRIMER 3 input, sugerido por (Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023), para análisis de detección en PCR en tiempo real para el virus de la diarrea epidémica porcina. Dicho programa resultó ser útil al permitir modificar algunos parámetros como los son: tamaño del primer (18 – 20 pb), porcentaje de G/C (>45%) y temperatura de anelling (50°C, 60°C). Dichos parámetros se ajustaron teniendo en cuenta lo sugerido por De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018) pero adaptado a las necesidades del proyecto y considerando los resultados obtenidos en la estandarización de el gen objetivo *NRAMP5* y los genes de referencia (*PUB*, *RPL135*).

Adicionalmente, el esquema de la secuencia completa del gen, en donde se señala la ubicación de los primers, amplicones y demás secuencias de interés (exones de

interés, regiones intrónicas, regiones de empalme) se realizó por medio del programa Benchling.

### 2.3 Estado del arte

Actualmente, se cuenta con diversos estudios que evalúan la respuesta del cacao ante diferentes estímulos ambientales. La mayoría de estos se enfocan en condiciones limitantes de los rendimientos o que están involucrados en la calidad del producto final (grano seco) y sus derivados. Uno de los estudios más relevantes del campo fue publicado por Morillo y colaboradores (2023) Morillo y colaboradores (2023) Morillo y colaboradores (2023) Morillo y colaboradores (2023), en el cual evalúan la expresión del gen *LIS* involucrado en conferir las características aromáticas en materiales acriollados de Ecuador.

Sin embargo, la calidad del grano seco de cacao y sus derivados no está dada únicamente por su sabor y aroma, sino que también su inocuidad para el consumo humano juega un papel fundamental. Debido a esto, desde principios de los años 2000, se han realizado diferentes estudios con el objeto de determinar el efecto fisiológico del cadmio en especies vegetales de interés agronómico. Uno de los primeros, desarrollado en Oberkochen – Alemania, con el pino escocés (*Pinus sylvestris*), determinó que este, en concentraciones de 5 a 50  $\mu\text{M}$ , presentaba una reducción del 20 a 90% del crecimiento de las raíces en las primeras 12 horas de exposición al cadmio (Schützendübel et al., 2001). Por otra parte, estudios realizados en trigo (*Triticum aestivum* L.) en el Reino Unido, han demostrado que la aplicación de cal en el suelo (tradicionalmente utilizada para control de plagas y estabilización del pH del suelo), influye en un aumento en la absorción de cadmio por deficiencias de zinc en el suelo (Chaudri et al., 1995). Partiendo de esta información base sobre el trigo, se realizaron estudios sobre la acumulación de cadmio en sus tejidos comestibles, con 8 materiales provenientes de países como Alemania, Francia, Rusia, entre otros. En este se determinó que en un suelo con valores de pH entre 4,9 y 6,2 con concentraciones medias de Zinc, puede disminuir hasta cuatro veces la concentración del metal en los tejidos de la planta, respecto a otra producida en suelos ácidos carentes de elementos menores (Rebeki et al., 2016).

Debido a una calamidad sanitaria ocurrida en Japón en el año 1912, donde más de 200 personas sufrieron síntomas de intoxicación por cadmio al consumir arroz contaminado (las plantaciones eran regadas con agua del río Jinzu, que se encontraba contaminado con Cd por la actividad de empresas mineras), se restringió la producción arrocería en la región y se invirtieron recursos para la investigación clínica y agronómica del proceso de asimilación del cadmio, en las plantas y los efectos del consumo de tejidos contaminados en humanos. Algunas de las especies seleccionadas para dichas investigaciones fueron el trigo, el maíz y el arroz, siendo este último uno de los más estudiados por su importancia económica en el continente asiático (Jiménez, 2015). De los estudios realizados se encuentran los siguientes:

- Silenciamiento génico: un knockout del gen *NRAMP5* con la finalidad de evaluar porcentajes de absorción de cadmio y micronutrientes, así como ver los efectos en la fisiología de la planta (Tang et al., 2017).
- Análisis de expresión genética: diferentes soluciones de micronutrientes tales como  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , Fe, así como suplementación con  $Cd^{2+}$ , para evaluar proporciones de expresión en comparación con genes basales (Chen et al., 2018).
- Análisis insilico: contando con las librerías de anteriores secuenciaciones, se realizaron comparaciones (homologías) para determinar estructuralmente dominios de los genes y sus posibles funciones (Sui et al., 2018).

De los resultados obtenidos, se pudo concluir que el arroz, reportó la mayor capacidad de absorción y secuestro de cadmio, mientras que el trigo mostró la absorción más baja, pero la mayor translocación de la raíz a las hojas (Sui et al., 2018).

Adicionalmente, al detectar la función putativa del gen *NRAMP5* como transportador de cationes metálicos inespecíficos, que permite el ingreso de cadmio a las células vegetales, se realizaron estudios para determinar su ubicación celular y subcelular, así como su expresión diferencial en cada tejido de la planta. Dentro de los resultados más destacables se encontró que la mayor expresión del gen se da en tejidos radiculares y que dentro de estos, la proteína transportadora se ubica en la membrana celular (Sasaki et al., 2012).(Sasaki et al., 2012).(Sasaki et al., 2012).(Sasaki et al., 2012).

Posteriormente, se invirtieron esfuerzos en el desarrollo de estrategias para mitigar la absorción de cadmio en cacao mediante estudios de su respuesta fisiológica y genética. Uno de los más recientes (Fernández, 2022)(Fernández, 2022)(Fernández, 2022)(Fernández, 2022), concluyó que la absorción de cadmio en portainjertos de los materiales IMC67 y PA121 modifican el mecanismo fotosintético al generarse una sustitución de magnesio (cofactor de *RUBISCO*) por cadmio. Así mismo, se reportó que ante concentraciones superiores a las  $10 \mu M$  de Cd, existe una correlación negativa fuerte entre la concentración de cadmio y el uso eficiente del agua, lo que sugiere un mecanismo de respuesta fisiológico (menor apertura de estomas – menor asimilación de carbono), que conlleva a una reducción en las tasas fotosintéticas y a una reducción en la absorción de cadmio (Azzi et al., 2015).(Azzi et al., 2015).(Azzi et al., 2015).(Azzi et al., 2015).

Por otra parte, se realizaron estudios de desarrollo de líneas de cacao editadas genéticamente para tolerar el cadmio y restringir su acumulación en sus tejidos. Dentro de los análisis de homología desarrollados, se encontraron grandes similitudes entre la secuencia del gen *NRAMP5* para las especies *A. thaliana*, *O. sativa* y *T. cacao*; dado que en las dos primeras el gen se encuentra estrechamente relacionado con la absorción radicular de Cd, fue seleccionado como gen candidato para edición genética por la metodología CRISPR -CAS9 (Marín, 2020).(Marín, 2020).(Marín, 2020).(Marín, 2020).En este estudio también se destaca la selección

del exón 5 para realizar un knock out, y por consecuencia la pérdida completa de la función de la proteína.

Posteriormente, Ullah y colaboradores (2018), además de diseñar un árbol filogenético de diferentes especies pertenecientes a todos los reinos de la naturaleza (partiendo de homologías en la familia de genes NRAMPs), también realizaron un análisis comparativo en la expresión de genes de la familia NRAMPs, en cacao, arroz y *A. thaliana.*, mediante homologías encontradas en las especies. De esto concluyeron que los genes NRAMP1 y 5 se encontraban en raíz, botones florales y fruto, siendo el primero de estos, el tejido con mayor proporción de expresión génica. Por su parte, el gen NRAMP 6, se encontraba en bajas cantidades en raíz y botones florales de forma similar a los dos primeros genes. Finalmente, NRAMP 2 y 3 se expresaron uniformemente en todos los tejidos de la planta.

Adicionalmente, en el mismo estudio, se realizaron análisis de expresión genética bajo diferentes condiciones de estrés, como lo fueron la ausencia de elementos menores de forma independiente y la solución Hoagland enriquecida con Cd. Dentro de los resultados más relevantes se determinó un proceso de regulación genética en ausencia del catión hierro ( $Fe^{2+}$ ) mucho mayor en relación con la ausencia de los demás elementos menores como el Manganeso y Zinc. Sin embargo, la solución enriquecida con cadmio y sin elementos menores presentó niveles normales de expresión (Ullah et al., 2018).

Así mismo, se evaluaron los comportamientos de levaduras (*S. cerevisiae*) transfectadas con la versión normal *TcNRAMP5* y la versión corta *TcNRAMP5s* del gen, frente a diferentes concentraciones de Cd, identificando una alta sensibilidad de las colonias transfectadas con la versión normal del gen, desde concentraciones de 10  $\mu$ M de cadmio, percibiendo un modesto crecimiento únicamente en una dilución de levadura de  $10^{-2}$ . Por otra parte, las levaduras con plásmidos transfectados con la versión corta del gen, presentaron un crecimiento normal en todas las concentraciones (0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) y diluciones ( $10^{-2}$ .,  $10^{-3}$ .,  $10^{-4}$ .) indicando el posible hallazgo de un alelo que confiere tolerancia al cadmio (Ullah et al., 2018)

## **2.4 Marco metodológico**

### Selección de variables

Moleculares: Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica con la finalidad de identificar los valores cuantificables que puede tomar la expresión genética mediante el análisis de bandas en PCR de punto final. Se determinó que las diferencias en la intensidad de la banda (saturación por cantidad de pixeles) se corresponden directamente con la cantidad de ARN mensajero sintetizado y presente en la célula (Montero, 2016; Stephens-Camacho et al., 2022).

Fisiológicas: Según Fernández (2022), concentraciones altas de cadmio dan lugar a una importante reducción en la conductancia estomática, la transpiración y fijación de carbono en el ciclo de Calvin, por lo tanto, el proceso de fotosíntesis también se ve reducido ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ). Gracias a esta información, se seleccionaron los parámetros de fotosíntesis neta ( $P_N$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ) y transpiración ( $E$ ).

Bioquímicas: Según (D. Rodríguez et al., 2024), la prolina es un aminoácido que es utilizado como marcador químico ante el estrés en plantas. Su función, es la de conferir protección celular mediante la neutralización de especies reactivas de oxígeno y células redox, así como aumentar la turgencia en las membranas celulares ante factores como el estrés hídrico y térmico (Wiebek et al., 2020). Por otra parte, teniendo en cuenta que el cadmio genera radicales libres de oxígeno debido a su composición química y carga eléctrica, se estima que esta respuesta ante el estrés por cadmio sea apreciable.

#### Selección de gen objetivo y de referencia

En la revisión de literatura, se encontró un artículo en el que se realizó un experimento donde se analizaba la expresión de la familia de genes *NRAMP*'s (Ullah et al., 2018) bajo condiciones de estrés por cadmio en el material PA121. De los 6 genes pertenecientes a esta familia, se destaca el *NRAMP 5* cuya función está directamente relacionada con el transporte de cationes divalentes metálicos, debido a que la proteína es poco específica y permite el ingreso de cadmio por su parecido con elementos nutritivos menores como el hierro, zinc y manganeso.

Por otra parte, los genes basales Poliubiquitina (*PUB*) y Proteína Ribosomal L135 (*RPL135*) se seleccionaron teniendo en cuenta su estabilidad, eficiencia de reacción y tipo de tejido. Para el caso de *PUB* su estabilidad fue de 0,3, mientras que para *RPL135* fue de 0,45, convirtiéndolos en el segundo y cuarto más estables, entre los más de 10 genes evaluados (Pinheiro et al., 2011)(Pinheiro et al., 2011)(Pinheiro et al., 2011)(Pinheiro et al., 2011).

#### Selección de método para análisis de expresión

Generalmente los resultados de base para el análisis de expresión de un gen objeto de estudio, se realizan por medio de métodos de cuantificación relativa como la PCR en tiempo real. En este caso, se optó por ejecutar un procedimiento de PCR convencional de punto final, para determinar diferencias en las intensidades de las bandas en los perfiles de bandeado de cada material. La metodología de análisis se conoce como análisis densitométrico, el cual se lleva a cabo por medio de programas de análisis de imágenes como Image J y Gel Analyzer, los cuales permiten determinar por medio de picos de información (agrupación de píxeles) la intensidad de banda inherente a cada producto de PCR. Adicionalmente, estos programas permiten establecer a los marcadores de peso molecular como referencia para calcular el tamaño del amplicón y por ende corroborar si el producto PCR corresponde a ADN complementario, ADN genómico o a errores en la reacción

como lo son los dímeros (Garboza et al., 2011).(Garboza et al., 2011).(Garboza et al., 2011).(Garboza et al., 2011).

### Selección de materiales

Actualmente en Colombia los portainjertos que más se utilizan en el establecimiento de cultivos de cacao son los materiales peruano IMC67 (Iquitos Maraño Collection) y PA121 (Fernández, 2022)(Fernández, 2022)(Fernández, 2022)(Fernández, 2022), los cuales se caracterizan por absorber grandes cantidades de cadmio del suelo (entre 50 y 120 ppm) y acumularlo en tejidos como las hojas y frutos (Fernández et al., 2021)(Fernández et al., 2021)(Fernández et al., 2021)(Fernández et al., 2021). Por otra parte, el material FEC2 es conocido por su alta tolerancia a la presencia, llegando a reportar valores promedio de 3,6 ppm de cadmio en tejido foliar y fruto (Hoogerwerf, 2020).(Hoogerwerf, 2020).(Hoogerwerf, 2020).(Hoogerwerf, 2020).

### Diseño del sistema hidropónico

Para reducir los factores de ruido y optimizar el proceso de absorción de cadmio, se estableció un montaje hidropónico según las recomendaciones de Ullah y colaboradores (2018)Ullah y colaboradores (2018)Ullah y colaboradores (2018)Ullah y colaboradores (2018), ubicando las plantas de forma aleatoria y agregando cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) en lugar de nitrato de cadmio [ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ] propuesto por los autores, debido a que este compuesto debido a su estructura requiere de una mayor cantidad de tiempo para ser absorbido (lenta liberación). Así mismo, según Bolaño & Coronado, (2023)Bolaño & Coronado, (2023)Bolaño & Coronado, (2023)Bolaño & Coronado, (2023) un monitoreo constante de las variables fisicoquímicas de la solución como el oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, pH, entre otras, favorece la absorción de los nutrientes y cadmio.

Por otra parte, para mantener la seguridad del equipo de trabajo al manipular los tejidos contaminados con cadmio, la metodología propuesta por Nguyen y colaboradores (2016)Nguyen y colaboradores (2016)Nguyen y colaboradores (2016)Nguyen y colaboradores (2016), permitió quelar la mayor proporción de cadmio en la superficie que pudiera entrar en contacto con la piel.

### Selección del protocolo de extracción de ARN total

Se tomó como referencia el estudio realizado por (Gallego et al., 2018)(Gallego et al., 2018)(Gallego et al., 2018)(Gallego et al., 2018) en el cual se evaluó la producción de flavonoides en células de cacao, para lo que requerían obtener muestras de ARN total de alta calidad (concentración y pureza). En dicho experimento combinaron dos metodologías de extracción, tanto la PureLink Plant RNA Reagent de la casa comercial Thermofisher Scientific y RNeasy Plus Universal Mini Kit de Qiagen, que les permitieron tener altas purezas en las muestras y concentraciones adecuadas, sin embargo, teniendo en cuenta que en el momento se contaba únicamente con el kit de Thermofisher Scientific, se realizaron pruebas

independientes en las que al efectuar algunos ajustes de optimización, se pudieron obtener muestras de gran calidad de ARN total.

### Selección del kit para tratamiento con Dnsas y síntesis de ADNc

El kit iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis kit (Biorad) es ampliamente utilizado en análisis de expresión genética por medio de PCR en tiempo real, debido a la eficiencia de sus enzimas (ADNasa y Retrotranscriptasa) y que contiene los dos pasos necesarios para un correcto análisis de expresión (digestión enzimática y síntesis de ADNc). Dicho protocolo ha sido usado desde inicios de la década pasada, en donde se realizaron análisis de patogenicidad de biofilms de *Staphylococcus epidermidis* y la optimización tanto del procedimiento de extracción de ARN total como la síntesis de ADNc y posterior Rtg-PCR (França et al., 2012)(França et al., 2012)(França et al., 2012)(França et al., 2012). Por otra parte, artículos más recientes revelan que dicho protocolo también permite comparar la eficiencia de la ADNasa al sintetizar ADNc sin la digestión enzimática previa, determinando diferencias significativas en la expresión (mayor en muestras no digeridas) y una baja interferencia en la calidad e integridad del ARN por dicho tratamiento(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022)(Norman et al., 2022).

### Selección de método para diseño de primers

Se utilizó el programa PRIMER 3 input, sugerido por (Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023)(Moncayo et al., 2023), para análisis de detección en PCR en tiempo real para el virus de la diarrea epidémica porcina. Dicho programa resultó ser útil al permitir modificar algunos parámetros como los son: tamaño del primer (18 – 20 pb), porcentaje de G/C (>45%) y temperatura de anelling (50°C, 60°C). Dichos parámetros se ajustaron teniendo en cuenta lo sugerido por De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018)De la fuente y colaboradores, (2018) pero adaptado a las necesidades del proyecto y considerando los resultados obtenidos en la estandarización de el gen objetivo *NRAMP5* y los genes de referencia (*PUB*, *RPL135*).

Adicionalmente, el esquema de la secuencia completa del gen, en donde se señala la ubicación de los primers, amplicones y demás secuencias de interés (exones de interés, regiones intrónicas, regiones de empalme) se realizó por medio del programa Benchling.



### 3. PROBLEMA O PLAN DE TRABAJO

#### 3.1 Planteamiento del problema

Alrededor del mundo, el cultivo de cacao representa un rubro de gran importancia en la seguridad alimentaria, que dinamiza las economías locales y se ubica como el tercer commodity internacional después del azúcar y el café. Sin embargo, actualmente su comercialización se rige bajo exigentes estándares de calidad, que limitan las exportaciones de grano y devalúan el producto a nivel local (Antolínez Sandoval et al., 2020).

Por otra parte, un factor que determina la calidad del grano es su inocuidad para el consumo humano, que actualmente se determina mediante la concentración de metales pesados como el cadmio (ppm). Dicho metal, además de ser tóxico tanto para la planta como para el ser humano, tiene el potencial de bioacumularse durante prolongados periodos de tiempo, dando lugar a un riesgo mayor proporcional a la antigüedad del cultivo (Reyes et al., 2016).

De este modo, para poder determinar las causas de la presencia de cadmio en los tejidos comestibles del cacao, es necesario examinar las condiciones del cultivo, así como las fuentes naturales y antrópicas del cadmio (García et al., 2021). El estudio de dichas características ha determinado que los cultivos cercanos a afluentes hídricos, así como aquellos que se encuentran en suelos ácidos y con gran cantidad de materia orgánica, poseen un mayor potencial de absorción de cadmio debido a su conformación química disponible (catión divalente) y a su ubicación en estratos superficiales del suelo (Llatance et al., 2018).

Los suelos productivos colombianos se caracterizan por tener una composición ácida, generalmente con altos contenidos de arcillas y poca materia orgánica, lo que sumado a la distribución y deposición de cadmio en los cultivos (principales fuentes: procesos de extracción y refinación de metales como el cobre  $\text{Cu}^{2+}$ , la combustión de hidrocarburos, la aplicación de fertilizantes y plaguicidas químicos y depósitos naturales en los suelos dados por meteorización de rocas sedimentarias, descomposición de materia orgánica, entre otros), favorecen los procesos de asimilación del cadmio en las plantas de cacao (Durango et al., 2019). De los departamentos con mayores concentraciones de cadmio en el suelo, se destacan: Santander con valores superiores a 10 mg/kg, Arauca con 10 mg/kg, Boyacá con 5 mg/kg y Norte de Santander con concentraciones que varían entre los 5 y los 10, g/kg (Charry et al., 2022), aunque dichos valores tienen una baja representatividad estadística, debido a que corresponden a una muestra pequeña de algunas unidades productivas que pueden no representar correctamente a todo el territorio.

Por otra parte, el proceso de absorción de  $\text{Cd}^{2+}$  en las raíces del cacao, ocurre mediante el mismo mecanismo de entrada usado por algunos nutrientes metálicos

como el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ). En este, participan proteínas integrales poco específicas, que permiten el ingreso del metal tóxico, debido a su gran similitud química y afinidad eléctrica (Rodríguez et al., 2020). Dicho mecanismo le confiere al cacao la clasificación de acumulador moderado de cadmio, lo que sumado a la baja eficiencia de los procesos de degradación natural del metal (ya sea por procesos químicos o metabolismo microbiano), dan lugar a la presencia de altas concentraciones de este en los granos sin procesar (Chavez et al., 2016).

De esta manera, el consumo de cacao contaminado con cadmio genera grandes perjuicios a la salud humana, como lo son afectaciones al sistema respiratorio, necrosis del tejido renal, descalcificación ósea e incluso procesos carcinogénicos (Pérez & Azcona, 2012). Estas alteraciones son generadas principalmente por la sustitución de hierro y cobre en proteínas de la membrana celular y el citosol, por cadmio, dando lugar de forma indirecta a la formación de radicales libres de oxígeno (peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y lipoperóxidos) que, por medio de la sustracción de electrones, alteran la función de proteínas y del ADN (Montero-Campos et al., 2024).

Por otra parte, se ha evidenciado que el cadmio también afecta los procesos fisiológicos de la planta de cacao, tales como la asimilación de nutrientes y la fotosíntesis; desencadenando disfunciones metabólicas y malformaciones de la raíz y el fruto. Estos efectos son más severos en las plántulas, dando lugar a la pérdida de biomasa en el proceso de desarrollo, y en algunos casos su muerte, generando pérdidas significativas a los productores (Durango et al., 2019).

Cabe resaltar que debido a la elevada tasa de consumo de cacao en Europa y Estados Unidos, así como, la preocupación que supone la ingesta de cadmio en la dieta diaria, se celebró reunión entre el comité mixto de la Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), la organización mundial de la salud (OMS), y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), en la que se determinó por primera vez el límite máximo de consumo de este metal en los alimentos ( $25\mu\text{g} \cdot \text{Kg}$  de peso corporal) (Mead, 2011). Así mismo en el año 2019 entraría en vigor el reglamento 488 de la Unión Europea, en donde se reduce aún más el porcentaje máximo permitido de cadmio, determinando que en un subproducto con un 50% de cacao debe contener una cantidad máxima de 0,3 mg/kg de Cd (Unión Europea, 2014).

Sin embargo, aunque se han adelantado investigaciones en las que se proponen niveles máximos de cadmio en los productos derivados del chocolate más consumidos en el país (INVIMA, 2017, 2021), los esfuerzos aún no se han manifestado en la forma normativas de obligatorio cumplimiento para el registro y comercialización de dichos productos en el territorio nacional. Por otra parte, estas investigaciones se han concentrado en los productos derivados y no en los granos secos ni los nibs, por lo que se generarían conclusiones erróneas que descartarían muestras viables para la preparación de productos derivados como ocurre en

Europa. Adicionalmente, la ausencia de regulaciones a nivel nacional de los niveles de cadmio en productos derivados también implicaría un alto riesgo para la salud de los consumidores (Florida Rofner, 2021; Meter & Laliberte, 2019).

Por otra parte, el cultivo de cacao en Colombia representa el segundo rubro de importancia económica después del café. Para el año 2019 (en el cual entró en vigor el reglamento 488 de la UE) el país contaba con 183.497 ha cultivadas en cacao y presentó un incremento en la cantidad de grano exportado del 22,59% (2.060 toneladas adicionales) respecto al año 2018, sin embargo, se evidenció una gran disminución en la demanda del cacao local por parte Holanda y Países bajos (40.9%). Posteriormente, se proyectó un crecimiento en el sector cacaotero del 3% anual hasta 2021 (65.174 ton), que respecto al año 2023 sufrió una reducción del 4,87% representando en 3.174 toneladas menos que dicho periodo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021; Gutiérrez et al., 2023).

De los 32 departamentos de Colombia, el Huila se establece como la cuarta región con mayor participación en la producción de cacao del país, disponiendo de un área cultivada de más de 8.000 hectáreas que producen el 6,8% del cacao nacional (Feria Internacional de Café, 2023). Dicho producto es cultivado en suelos con concentraciones bajas y moderadas de cadmio, que van desde los 0 a los 2 mg/kg, encontrándose los más altos valores, en la periferia del desierto de la Tatacoa, según algunas entrevistas realizadas a los habitantes del sector, esto se debe a que se emplean aguas residuales para el riego de los cultivos (debido a la escasez de este recurso), sumado al uso de fertilizantes químicos derivados de compuestos cúpricos (Charry et al., 2022).

Respecto a los materiales cultivados en la región, se destacan las variedades IMC-67 (llamado “el patrón universal” en los cultivos con injertos clonales) y FEC-2, (variedad resistente a las enfermedades y tolerante a la contaminación con metales pesados), las cuales son contrastantes en la proporción de cadmio que absorben del suelo (Fernández, 2022). Dichas variedades sufren procesos de hibridación natural con otros materiales formando ecotipos, cuya respuesta molecular en la presencia de Cd es desconocida.

Tomando como referencia el contexto que antecede, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe expresión diferencial del gen Nramp5 en las variedades TCS01, IMC-67 y FEC-2, durante el proceso fisiológico de absorción de cadmio?

### 3.2 Justificación

El grano de cacao y sus derivados se han establecido en el mercado mundial como uno de los commodities de mayor acogida y crecimiento en los últimos años, debido a la exquisitez de su sabor y a que ofrece una alimentación saludable, rica en vitaminas, minerales, antioxidantes y calorías (Mendoza-López et al., 2021). Dichos nutrientes generan beneficios para el cuerpo humano, tales como: actividad antioxidante (impide la formación de ROS), inhibición de procesos inflamatorios celulares, protección contra la radiación UV, eliminación de manchas en la piel, reducción de arrugas, prevención de la psoriasis, aumento en la elasticidad de las venas y arterias, entre otros beneficios (Zamora, 2024), además el cacao también es utilizado como componente activo de algunos productos de la industria cosmética, generando una alta demanda del mismo y mejorando la calidad de vida de productores y consumidores (Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación, 2017).

Por otra parte, el cacao constituye un rubro de importancia económica en América Latina y el Caribe, que permite el sostenimiento de familias campesinas, así como el flujo de ingresos y su distribución homogénea en las economías locales. Debido a que es una planta originaria de climas tropicales, su rango de distribución no es muy extenso en el continente, llegando a cultivarse desde México hasta Brasil, en un rango altitudinal que comprende los 0 a los 1.000 msnm. De estos países el 90% del grano es producido por familias campesinas, generando, en el periodo comprendido entre los años 2022 y 2023, 994 mil toneladas, que representaron el 21,2% de la producción mundial (Durango et al., 2019; Food and agriculture organization of the united nations (FAO), 2020; International Cocoa Organization (ICCO), 2023).

En este contexto, el grano de cacao colombiano es reconocido internacionalmente en la categoría de “fino o de sabor” y se menciona que para el año 2016, el 95% del cacao producido en Colombia pertenecía a dicha categoría (Rottiers et al., 2019). La calidad del grano permitió a grandes empresas como la Compañía Nacional de Chocolates o Luker chocolate, poder mantener los estándares de calidad de exportación en cuanto a carga de cadmio y características organolépticas, mediante la mezcla con granos de menor calidad, amortiguando de esta manera las presiones económicas ejercidas en el sector a causa de las restricciones europeas (Charry et al., 2022).

Por otra parte, el país cuenta con aproximadamente 65.341 familias productoras de cacao, cuya principal fuente de ingresos es la venta de grano seco (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021) y en muchas regiones, como en el caso de la Sierra Nevada de Santa Marta, constituye una alternativa para la sustitución de cultivos ilegales (Guarín et al., 2024).

Adicionalmente, el valor del cacao colombiano ha presentado incrementos históricos desde el mes de noviembre de 2023, sin encontrar un techo estimado

hasta la fecha, debido a las extremas condiciones climáticas y la falta de financiación extranjera, que afectaron negativamente la producción del grano y sus derivados, en países productores africanos. Dicho contexto facilitó la exportación del cacao nacional puesto que existe una alta demanda de este en Europa y Norteamérica (El Espectador 2024).

Respecto al contexto agronómico, se ha determinado que el material IMC67 posee una alta capacidad de absorción y asimilación de cadmio, reportando valores de hasta 50ppm de Cd en la raíz, como patrón de CCN51 y 35ppm en el mismo tejido como patrón de ICS95 posterior a los 4 meses de exposición con sustrato contaminado (Fernández et al., 2021). En contraste, el material FEC2 de origen colombiano, ha demostrado una mayor tolerancia a la presencia de Cd, reportando un valor máximo de 11,79 ppm y un promedio de 2,73 ppm, siendo un candidato ideal para el establecimiento de cultivos nuevos o la renovación de cultivos antiguos (Hoogerwerf, 2020). Sin embargo, aunque se cuenta con información valiosa sobre la absorción de cadmio, obtenida por medio del análisis de la biomasa seca, los mecanismos moleculares de respuesta de materiales genéticos específicos al estrés por cadmio aún son desconocidos (Engbersen et al., 2019).

Una consecuencia proporcional al crecimiento del sector fue un incremento en la inversión de los entes públicos y privados en el cultivo de cacao, lo que posibilitó la puesta en marcha de diferentes proyectos de tipo científico, con el objetivo de ampliar la comprensión de los factores limitantes en la calidad del grano de cacao (Villar, et al., 2022) Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. De estos se destacan los estudios de los mecanismos moleculares implicados en la absorción del cadmio en *T. cacao* L., que constituyen una estrategia rápida y eficiente para determinar los procesos clave de asimilación y así ofrecer alternativas (silenciamiento génico, potenciamiento, transgénesis, entre otros) que garanticen la calidad e inocuidad del grano sin procesar y sus productos derivados (Ullah et al., 2018).

Dentro de los proyectos financiados en el campo de la biología molecular, se encuentran algunos análisis de expresión genética, los cuales permiten dilucidar los mecanismos de respuesta de las plantas ante estímulos como las altas saturaciones de metales pesados en la matriz suelo. De esta manera se confirma la función de los genes objeto de estudio, para poder formular estrategias que mitiguen las afectaciones a la salud humana, causadas por el consumo de tejidos contaminados con metales pesados como el cadmio.

El estudio de la expresión de los genes NRAMP5 y NRAMP1 permitirá comprender una de las vías de ingreso del cadmio a la planta de cacao y su posterior asimilación en tejidos comestibles, así como facilitará la ejecución de posteriores estudios al estandarizar los procedimientos en laboratorio y permitirá a los productores hacer una mejor selección de materiales al momento de establecer unidades productivas de cacao. Por otra parte, se determinarán los niveles de expresión de los dos materiales bajo las condiciones dadas (exposición a 8ppm de CdCl<sub>2</sub>) por lo que

dichos valores podrán relacionarse directamente con las proporciones de cadmio biodisponible en los suelos.

Adicionalmente, el carácter interdisciplinar del presente estudio permite obtener un enfoque holístico de los resultados, así como interpretar por medio de análisis de relaciones, la compleja interacción entre la respuesta genética y fisiológica a estímulos fisicoquímicos. Todos estos resultados podrán ser extrapolables al comportamiento real de dichos materiales en un cultivo tradicional y servirán de base conceptual y metodológica para posteriores estudios relacionados con el campo.

### 3.3 OBJETIVOS

#### 3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del gen NRAMP5 de manera semicuantitativa en tres variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo condiciones de estrés por cadmio.

#### 3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las tendencias generales en la respuesta diferencial entre los materiales IMC67, FEC2, TCS01.
- Evaluar la estabilidad del gen de referencia *Poliubiquitina (PUB)*.
- Estandarizar los procedimientos de extracción de ARN, síntesis de ADNc y PCR de punto final.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Descripción general del experimento

#### 4.1.1 Área de estudio

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones del centro de investigación Nataima de AGROSAVIA, ubicado en las coordenadas 4°11'28.91"N y 74°57'38.08"O a 376 msnm, en el km 9 de la vía Chicoral – Espinal (módulo 3 de casa de mallas, laboratorio de fitopatología y laboratorio de biología molecular). Por otra parte, las condiciones del microclima durante el experimento fueron registradas con un termohigrómetro, del cual se destacan temperaturas máximas de 42°C y humedad relativa mínima del 25%, en contraste, se registraron temperaturas mínimas de 23°C y humedad relativa máxima del 99%.

#### 4.1.2 Material vegetal y establecimiento del experimento

Las semillas fueron adquiridas en la unidad productiva “El pecador” ubicada en la vereda “Centro” del municipio de Hobo – Huila. Sus frutos fueron producto de procesos de polinización abierta, en una parcela experimental del proyecto de regalías (Gobernación del Huila). Una vez recibidos los frutos (mazorcas) en el centro de investigación, se extrajeron entre 40 y 45 semillas por fruto de cada material, llegando a obtener 125 semillas por cada variedad (IMC67, FEC2 y TCS01). Posteriormente, estas fueron enjuagadas en agua destilada por triplicado sobre un tamiz. Posteriormente, se retiró el exceso de agua y se eliminó el mucílago por medio de fricción con aserrín, para finalmente conservar las semillas húmedas y cubiertas por aserrín en una bolsa Ziplock a la sombra en un cajón de fermentación por 2 -3 días (Maroto et al., 2017).

Transcurridos 3 días, se seleccionaron las semillas con ganchos hipocotilares visibles y se sembraron creando una pequeña abertura en la superficie del sustrato, dejando al descubierto 3 cuartas partes de la semilla y enterrando el gancho hipocotilar cuidando no desprenderlo (Soto & Torres, 2022). Luego, estas se sembraron en bolsas de polietileno negro de 12 cm de diámetro \* 35cm de alto, con sustrato húmedo compuesto por  $\frac{3}{4}$  de turba y  $\frac{1}{4}$  de vermiculita, estas bolsas se ubicaron en el invernadero “Casa de mallas”, del C.I. Nataima, donde permanecieron bajo condiciones de vivero durante 8 semanas (Soto & Torres, 2022). Adicionalmente, el control de plagas y enfermedades se realizó por medio de extractos vegetales como ajo ají y ortiga, así como trampas adherentes de color y sustitución manual de plantas enfermas.

Posteriormente, se seleccionaron las plántulas más vigorosas, lavando sus raíces con agua destilada y ubicándolas en una tina de 130L con 90L de agua destilada y solución Hoagland a mitad de fuerza. Dicha solución fue renovada semanalmente y

el pH corregido diariamente (5,5 – 5,8), para favorecer la absorción tanto de nutrientes como de Cd.

Un mes posterior a la adaptación de las plantas en este medio, se retiró la solución Hoagland a mitad de fuerza (Tabla 1) eliminando los elementos menores (factor de ruido) sin alterar el volumen final y se disolvieron 720mg de CdCl<sub>2</sub> en 90L de agua (4,9 ppm), manteniendo una saturación de oxígeno mínima de 3,8 ppm.

*Tabla 1. Componentes de la solución Hoagland a mitad de fuerza.*

Reactivo	Cantidad (g)	Volumen final (mL)	Nombre Sln. Madre	Cantidad (mL) * 90 L
KNO <sub>3</sub>	101,02	1000	A	255
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	236			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +	34,02	500l	B	102
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	123,22			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> +	1,3845	500	C	51
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1066			
CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O	0,03958			
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,817			
MoO <sub>3</sub>	0,026	300	D	51
FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O +	24,9	1000	E	13
Na <sub>2</sub> EDTA*2 H <sub>2</sub> O	26,1			

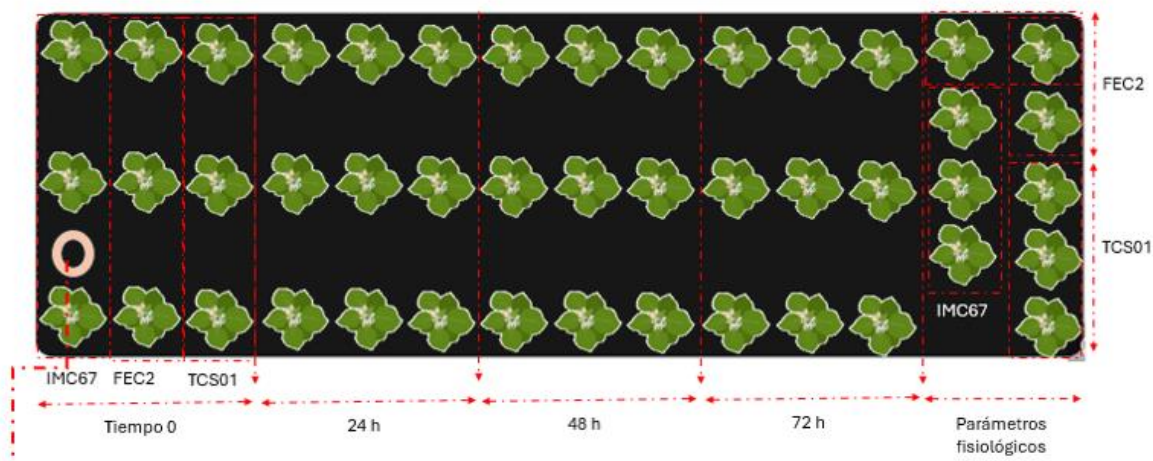
Los elementos menores como el hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn) y manganeso (Mn), presentes en las soluciones madre C y E, fueron retirados de la solución para evitar interferencias en el análisis.

La solución en el sistema hidropónico fue oxigenada y sus nutrientes resuspendidos por medio de un compresor de aire de la marca Pretul Ref. 23065 de 20L de capacidad. Dicho equipo fue conectado a una red de mangueras con válvulas para la distribución homogénea del aire y cuya presión de salida se ajustó a 4 Bares. Así mismo, se agregó un filtro para grasas debido a los precipitados que se formaban por el uso frecuente del equipo, como también se instaló un temporizador para garantizar periodos de reposo de 1 hora y 30 min con periodos de actividad de 30 min.

Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos de la solución como el pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto fueron monitoreados diariamente con un potenciómetro multiparámetro marca Hanna Ref. H198194. En el caso del pH, este fue corregido a un valor de 5,6 cada dos días para favorecer las captación de nutrientes en las raíces.

#### **4.1.3 Diseño experimental**

Se seleccionó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3\*4, donde el factor principal son los materiales (N: IMC67, FEC2, TCS01) y el segundo factor, el tiempo en horas de exposición al cadmio (N:0, 24, 48, 72), con 3 repeticiones por variedad y tiempo (Figura 1). Es relevante aclarar que el T0 también cumple la función de testigo absoluto debido a las condiciones del experimento (periodo de tiempo corto para tener un testigo por cada hora). El tamaño de la muestra fue de 36 plantas bajo un tratamiento (4,9ppm de cadmio y solución Hoagland a mitad de fuerza sin elementos menores).



*Figura 1. Diseño experimental. Nótese una agrupación de plántulas en el extremo derecho, las cuales representaban 3 réplicas por material para la toma de datos fisiológicos (plántulas independientes al experimento de cadmio) así como en el extremo izquierdo se encontraba una abertura donde se insertaban los sensores del potenciómetro multiparámetro, para el monitoreo de pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica.*

## 4.2 Evaluación de expresión genética (densitometría)

### 4.2.1 Muestreo destructivo

Previo a diluir el cadmio, se realizó el muestreo destructivo correspondiente al tiempo 0, para lo cual, se hizo uso de toallas de papel estériles (autoclave) en el secado de las raíces, para posteriormente cortar el tejido de las raíces secundarias y almacenarlo en un sobre de aluminio debidamente marcado en tanques de nitrógeno líquido, agrupando las muestras por material en una malla plástica.

Una vez se debió entrar en contacto con la solución contaminada con cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) para el muestreo de los tiempos 1, 2 y 3 (24, 48 y 72 horas), se ejecutó el siguiente protocolo:

1. Se ingresó al módulo 3 de casa de mallas a las 8 horas de la mañana (evitando las altas temperaturas del medio día) vistiendo trajes de protección Tyvek, mascarillas con filtro 3M Ref. 2091, y botas de caucho para el uso exclusivo en el lugar. Adicionalmente, se contó con guantes de nitrilo convencionales y de alto calibre.
2. Se ubicaron 3 diferentes *Baker* de 1L de capacidad, en los cuales se agregó: agua destilada, TRIS 20mM (pH8) y EDTA 5mM.
3. Se dispuso de un guardián para el descarte de cuchillas, bolsas de riesgo químico y biológico debidamente marcadas y bidones de 20L para el descarte de líquidos contaminados.
4. Se extrajeron las plántulas con mucho cuidado para evitar derrames, para posteriormente ubicar cada planta en el primer *Baker* y agitarlas vigorosamente por 30 segundos. Luego, se situó cada planta en la solución de EDTA 5mM (30 segundos de enjuague) para finalizar en la solución de TRIS 20mM.
5. Se ubicó cada planta en una toalla absorbente estéril e inmediatamente se realizó el corte con cuchillas descartables en la raíz secundaria.
6. La muestra de tejido se situó en sobres de papel aluminio debidamente marcados y se agruparon por materiales como se menciona en el procedimiento para el tiempo 0.
7. Diariamente, se realizó el descarte del material vegetal contaminado, así como de los implementos que entraron en contacto con la solución con cadmio (soluciones para quelar el cadmio, toallas y guantes de nitrilo).
8. Al final del muestreo, los trajes Tyvek guantes de nitrilo, fueron desechados, reutilizando únicamente las mascarillas y las botas de caucho.

#### **4.2.2 Procesamiento de muestras**

Una vez se contó con el tejido conservado en nitrógeno líquido (sobres de aluminio), se realizó un proceso de macerado de estos, con el objetivo optimizar la duración del procesamiento de las muestras (extracción de ácidos nucleicos) y aumentar el espacio disponible en los contenedores de nitrógeno líquido. Este procedimiento se llevó a cabo teniendo en cuenta el siguiente procedimiento: primero, se tomaron morteros y pistilos estériles, en los cuales se agregó nitrógeno líquido para pre-enfriar. Posteriormente, se extrajo el tejido y se maceró vigorosamente cuidando de no dejar evaporar el nitrógeno para evitar la rehidratación del tejido, para luego agregar 100 mg de tejido en un tubo eppendor de 1,5 ml y la cantidad restante en un tubo de 5mL con tapa rosca.

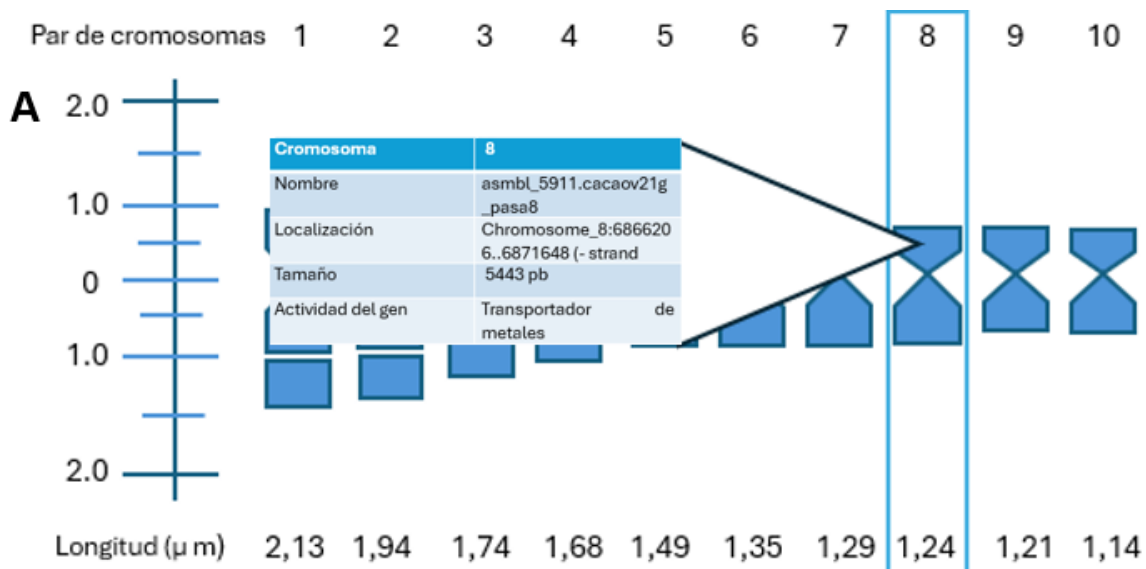
Es necesario aclarar que en el momento de contar con el material macerado en los respectivos tubos (1,5 mL para la muestra por procesar y 5mL como contramuestra), estos fueron almacenados en una nevera de Icopor con nitrógeno hasta su posterior almacenamiento en tanques.

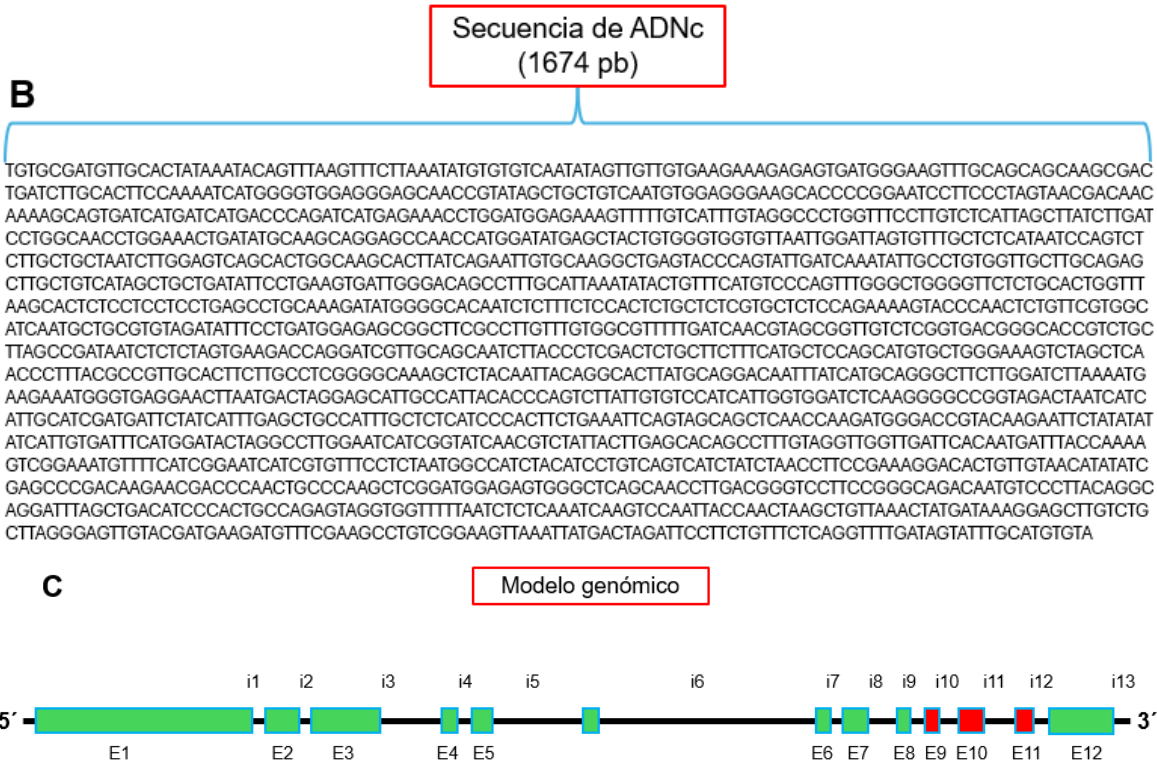
### 4.2.3 Selección de genes (objetivo y de referencia)

Se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos como NCBI, Scielo, EBSCO, Science direct, Google académico, entre otras, para encontrar información relacionada con la descripción de genes asociados a la absorción de cadmio en cacao. De estos se seleccionaron 5 artículos recientes, en los que se mencionaba que tanto en cacao (*T. cacao*), arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*) se detectó la familia de genes *NRAMP5* como proteínas de membrana transportadoras de cationes metálicos. De estos se seleccionó el gen *NRAMP5* por los productos PCR favorables (Ullah et al., 2018) y la confirmación de su influencia en la absorción de cadmio (análisis de expresión heteróloga en levaduras).

Por otra parte, se seleccionó el gen *PUB* por su estabilidad (intensidad de banda homogénea) y alto porcentaje de amplificación (9 de cada 10 muestras fueron positivas), según las consideraciones propuestas por Pinheiro y colaboradores (2011), respecto a los genes de referencia candidatos para análisis de qPCR.

Posteriormente, se realizó la búsqueda de la secuencia del gen *NRAMP5* en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se realizó un alineamiento BLAST en el programa Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) el cual permitió definir la secuencias exónicas, intrónicas y el sitio de unión de los primers, así como la ubicación del amplicón en el gen (Figura 2).





**Figura 2. Esquemas de la estructura y ubicación del gen NRAMP5 en cacao criollo (*Theobroma cacao cacao*). A. Ubicación física en el genoma, B. Secuencia codificante (ADN complementario), C. Modelo genómico del gen NRAMP5.**

*Fuente: Adaptado de (Figueiredo et al., 2013; Hassanin et al., 2022; Phytozome, 2024; Ullah et al., 2018)*

#### 4.2.4 Extracción de ARN total

Para el procedimiento de extracción de ARN se utilizó el protocolo PureLink® Plant RNA Reagent de la casa comercial ThermoFischer Scientific, el cual fue adaptado para cacao (*T. cacao L.*) según el procedimiento descrito en el apartado de los resultados de estandarización de metodologías. Dicho procedimiento usado por Gallego y colaboradores (2018), está diseñado para el procesamiento de muestras vegetales ricas en compuestos polifenólicos como en el caso del cacao y cuyo buffer de extracción contiene:  $\beta$ - mercaptoetanol (desnaturalizante de proteínas), Polietileno glicol mono(octilofenilo) éter (detergente no iónico) y Azida de Sodio (agente reductor) (Haz - Map -, 2024; Trejo, 2012)

#### 4.2.5 Tratamiento con ADNasa y síntesis de ADNc

Para poder realizar inferencias sobre la expresión, debe garantizarse la eliminación de ADN genómico remanente del proceso de extracción de ARN. Para esto, se

realizó un tratamiento con ADNasa según el protocolo iScript™ Gdna Clear cDNA Synthesis Kit de la casa comercial Biorad, en el cual se prepara un coctel con 0,5 µL de ADNasa y 1,5 µL de buffer. Dicho coctel se agregó a 14 µL de ARN total diluido por cada reacción (apartado de optimización) y se ubicó en un termociclador donde se seleccionó el programa de corrida corregido, para digestión enzimática con ADNasa.

Posterior a la digestión, se preparó un coctel para la reacción PCR convencional, como control de dicha digestión mediante el protocolo GoTaq® Flexi DNA Polymerase de la marca Promega, el cual consiste en un procedimiento paso a paso que se detallará en el apartado de PCR de punto final. Posterior al revelado del control, se preparó un coctel con 4 µL (por reacción) de Rt supermix para el proceso de retrotranscripción que da lugar a la síntesis de ADNc. Los parámetros de corrida se programaron en el termociclador según las indicaciones del fabricante.

#### 4.2.6 PCR de punto final y electroforesis

Se hizo uso del protocolo paso a paso GoTaq® Flexi DNA Polymerase de la marca Promega, el cual contiene algunas sugerencias para mejorar la calidad del producto PCR como el uso de BSA como coadyuvante (Tabla 2). Sin embargo, las cantidades de cada reactivo no fueron modificadas en la preparación del coctel y los parámetros de corrida para el gen *NRAMP5* (Objetivo) y Poliubiquitina – *PUB* (Referencia) se diseñaron según las pruebas de optimización como los gradientes de temperatura para la evaluación de primers.

*Tabla 2. Reactivos seleccionados en el proceso de estandarización de la PCR de punto final para los genes NRAMP5 Y PUB.*

Reactivo	Concentración inicial	Unidades	Concentración final	Unidades	Volumen *1 tubo (15 µl)	volumen final * 15 tubos
Primer F	10	µM	0,2	µM	0,3	4,5
Primer R	10	µM	0,2	µM	0,3	4,5
dNTP's	10	Mm	0,2	Mm	0,3	4,5
Buffer 5X	5	X	1	X	3	45
MgCl2	25	mM	2	mM	1,2	18
BSA	5	µg/µL	0,1	µg/µL	0,3	4,5
Taq pol	5	U/µl	1	U/µl	0,16	2,4
H2O					7,44	111,6
ADN	5	µg/µL	3	µg/µL	2	30

Por otra parte, las electroforesis se llevaron a cabo preparando geles de agarosa al 2% para molde grande (1,8 g de agarosa por 90 mL de buffer TBE 1x + 9µL de Buffer

de carga Sybr safe) y los parámetros del programa en la fuente de poder fueron: 90mV, 90mA, por 60 minutos.

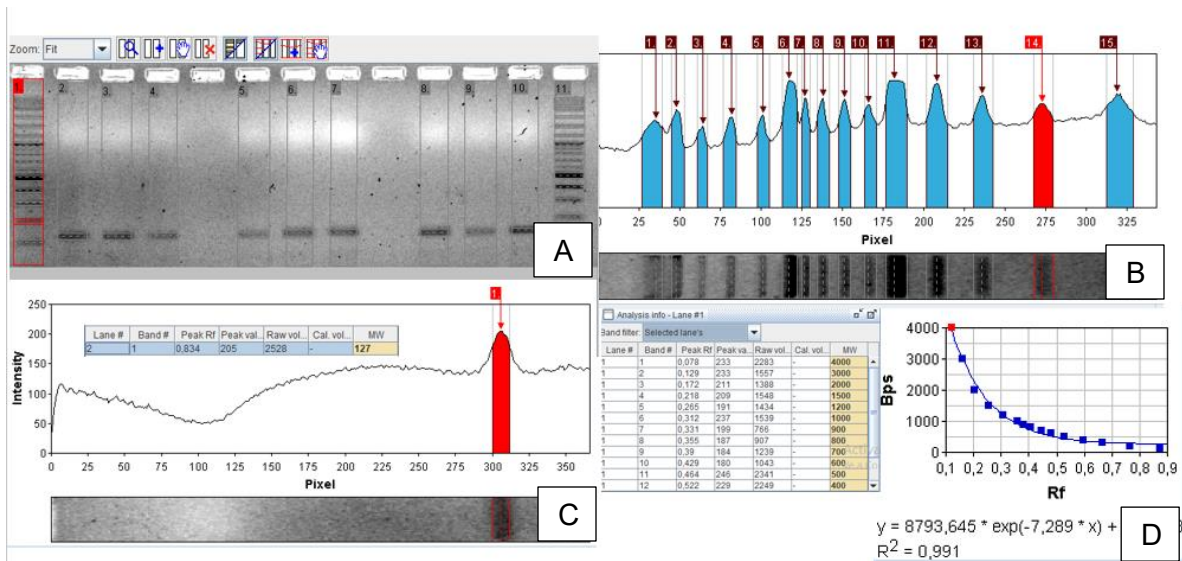
#### **4.2.7 Análisis de datos de expresión genética**

Se prepararon geles de agarosa al 2% a razón de 1,8 g de agarosa por 90 ml de buffer TBE 1x más 9  $\mu$ L de Sybr Safe, en estos, se agregaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular Quick-Load Purple 1kb Plus DNA Ladder de la casa comercial New England's Biolabs. Dicho marcador se agregó en dos pozos para obtener dos carriles de fragmentos para comparar.

Posteriormente, el gel producto de la electroforesis, fue irradiado durante 18 segundos y 35 milisegundos con luz ultravioleta en el foto documentador ENDURO GDS II. Consecuentemente, se realizaron ajustes en la exposición de la imagen, modificando los parámetros: B (black)= 10763, W (White)= 24274 y V (volume)= 1. Finalmente, se invirtió el contraste de la imagen para que las bandas se tornaran de una coloración oscura y el fondo de color claro y así facilitar el posterior análisis en el programa Gel Analyzer versión 23.1.1.

Una vez se abrió la imagen en el programa Gel Analyzer, se seleccionaron carriles de longitudes iguales que incluyeran cada pozo informativo del gel (marcadores de peso molecular y productos PCR) y se seleccionaron los picos para cada fragmento de los marcadores de peso y así construir una curva de calibración de pesos moleculares (Figura 3). Luego, se seleccionó cada banda correspondiente a los productos PCR y se registró tanto el valor del peso molecular como la intensidad (Peak value) para cada réplica y gen en una matriz de Excel.

*Figura 3. Interfaz del programa Gel Analyzer versión 23.1.1. A. Selección de carriles en el gel. B. Selección de picos automática y corregida para el marcador de peso molecular. C. Detección de la banda del producto PCR. D. Curva de calibración para el peso molecular en pares de bases (pb).*



Posteriormente, los datos brutos (intensidad de banda) fueron registrados en una matriz de columnas con variables sencillas agrupadas y mediante esta, se calcularon medidas de tendencia central y dispersión de datos. Por otra parte, se realizó la respectiva verificación de supuestos, mediante la prueba gráfica Q-Q Plot y F de Fisher.

Una vez se confirmó que los datos procedían de una distribución normal, se realizó un análisis de varianza ANAVA para dos factores con una sola muestra por grupo, en el programa Microsoft Excel como ejercicio preliminar, el cual se confirmó con un ANAVA ejecutado en InfoStat/L. Así mismo, se realizó una comparación de medias LSD de Fisher.

Luego, se calcularon los niveles de expresión del gen *NRAMP5* mediante una relación entre el gen de referencia *PUB* y el gen Target *NRAMP5* así como se comparó dicho promedio de expresión relativa respecto a la media del control absoluto en el tiempo 0. Dichas relaciones se detallarán a profundidad en los resultados.

## 4.2 Evaluación fisiológica

### 4.2.1 Muestreo no destructivo

Se hizo uso del analizador de gases portátil de sistema abierto LI 6400/XT de la casa comercial LI-COR, en simultáneo al muestreo destructivo. Dicho equipo fue manipulado por el operario Mauricio Gómez, quien contó con el equipo de bioseguridad descrito en el numeral 4.2.1 y el apoyo de los investigadores para el registro de datos.

Adicionalmente, se tomaron 3 datos por cada planta, seleccionando hojas jóvenes y sanas que se encontraban a 4 p 5 hojas de distancia del ápice de la planta. Cabe aclarar que los datos se registraron en horas de la mañana (8:00 a.m y 10:00 a.m) buscando evitar afectaciones en la salud del operario debidas al calor, así como variaciones en los datos debidas a las altas temperaturas en las instalaciones.

#### **4.2.2 Análisis de datos fisiológicos**

Se realizó una selección de datos según la precisión del registro en el equipo LICOR, medido con el parámetro de estabilidad F (valores cercanos o iguales a 1). Una vez seleccionados los datos por planta, en el programa Microsoft Excel se diseñó un gráfico dinámico a modo de resumen de la información, así como por medio del programa InfoStat/L versión del 29/09/2020, se realizó un gráfico de cajas y bigotes por cada variable fisiológica.

Se realizó la verificación de supuestos de forma independiente por cada variable, mediante las pruebas de Shapiro Wilks (Normalidad), Q-Q-Plot de residuales (Normalidad) y gráfico de dispersión de residuales Vs Valores predichos.

Para aquellos parámetros que cumplieron los supuestos de homocedasticidad y distribución normal, se realizó un análisis de varianza ANAVA con su respectiva comparación de medias *LSD*. Sin embargo, para aquellas variables que no son normales, se realizó la prueba Kruskal Wallis con comparación de medias.

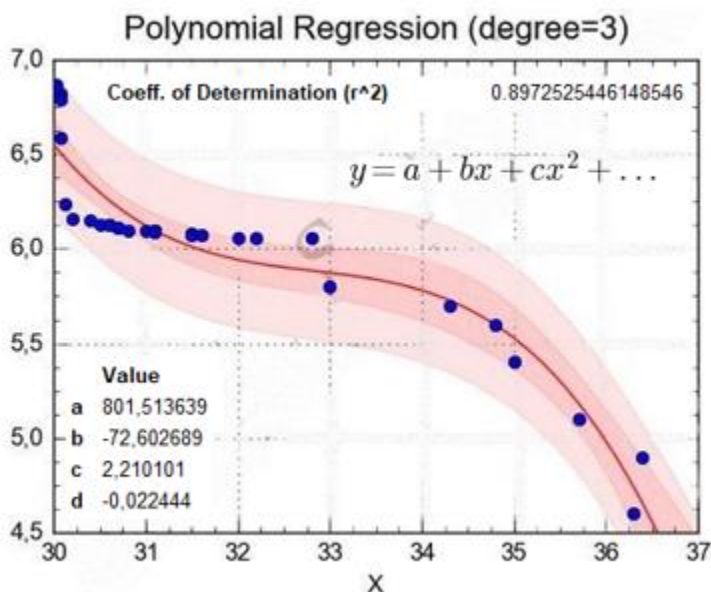
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Manejo del cultivo hidropónico y estandarización de procedimientos en laboratorio.

#### 5.1.1 Parámetros fisicoquímicos de la solución hidropónica

Los valores registrados del oxígeno disuelto ( $O_2$ ) en la solución, se encontraron entre los 3,8 ppm y 5 ppm, con periodos de actividad del compresor de 30 minutos en intervalos de 1 hora y 30 minutos. Lo cual resultó ser óptimo para garantizar el vigor y la correcta nutrición de las plantas según la curva de agotamiento de  $O_2$  (Figura 4) diseñada a partir de periodos prolongados de inactividad del compresor en diferentes horas del día.

*Figura 4. Gráfico del modelo de regresión polinomial de tercer grado para estimar los tiempos de actividad del compresor. Realizado en CurveExpert Professional.*



Partiendo del modelo, se determinó la mínima concentración de oxígeno aceptable en 3,8 ppm para una temperatura de solución de 38,6°C que fue el valor máximo registrado durante el experimento y el cual permitió seleccionar los periodos de actividad y apagado del compresor.

Por otra parte, el promedio de conductividad eléctrica en solución se estimó en un valor promedio de 1377,78  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , lo que se considera como un valor aceptable

para el crecimiento de tejidos vegetales en otras especies comerciales como la espinaca baby (*Spinacia oleracea* L.) (Castillo et al., 2019).

### 5.1.2 Extracción de ARN

Se realizaron extracciones preliminares según el protocolo paso a paso PureLink® Plant RNA Reagent de la casa comercial Ambion. Sin embargo, al notar que existieron diferencias en los resultados (geles de calidad con presencia y ausencia de bandas), se realizaron las siguientes modificaciones al protocolo (los pasos adicionales o ajustes se resaltan en color amarillo):

1. Extraer 100mg de tejido (aprox.) y agregar 500µL del reactivo PureLink® RNA Plant Reagent a 4°C y mezclar en Disruptor por 30 segundos. Posteriormente dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugar a 12000g \* 2 minutos a 2°C. La manipulación de las muestras a partir de este punto se realizará en Cooler el cual se refrigerará entre cada ciclo de centrifugación.
2. Extraer el sobrenadante (400 µL aprox.) y ubicarlo en un tubo nuevo libre de RNasas. Luego, agregar 100 µL de NaCl 5M enfriada a 4°C y mezclar en Disruptor por 10 segundos. Posteriormente agregar 300 µL de cloroformo y mezclar en Disruptor por 30 segundos.
3. Centrifugar a 12000 g \* 10 minutos a 2°C (separación de fases 1).
4. Extraer el sobrenadante (350 µL aprox.) en tubos libres de RNasas y agregar el mismo volumen (350 µL) en cloroformo. Luego se mezclará en Disruptor por 30 segundos y se centrifugará 12000g \* 10 minutos a 2°C.
5. Extraer el sobrenadante (300 µL) y ubicarlo en un tubo nuevo libre de RNasas y agregar un volumen igual (300 µL) de isopropanol enfriado a 4°C. Luego mezclar por inversión por unos minutos y dejar incubando a -10°C por 1 hora.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 2°C.
7. Descartar el sobrenadante cuidando no eliminar el pellet y agregar 1000 µL de etanol al 75%, enfriado a 4°C. Luego centrifugar a 13000 rpm \* 1 minuto a 2°C
8. Descartar el etanol evitando eliminar el pellet y agregar 1000 µL de etanol al 75%. Luego centrifugar a 13000 rpm \* 1 minuto a 2°C.
9. Descartar nuevamente el etanol y ubicar los tubos abiertos de cabeza para su secado final.
10. Agregar de 30 a 50 µL de agua de grado molecular y resuspender la muestra. Extraer un alícuota de 10 µL para las pruebas de calidad.

Posterior a la extracción, se cuantificó cada muestra en el espectrofotómetro NanoDrop One de la casa comercial Thermo Fisher Scientific y se preparó un gel de agarosa al 2% que se reveló en el foto-documentador (Anexo 1, 2, 3, 4). Luego, al seleccionar 3 muestras por material (las de mejor calidad), estas fueron diluidas

en agua de grado molecular a una concentración de 10 ng/μL, que se determinó como la concentración máxima en la que la DNasa funciona adecuadamente. Así mismo, se completaron los 2 μL extraídos para el control de la DNasa (Anexo 5), con agua de grado molecular, dando lugar a una concentración final de ARN de 8,75 ng/μL.

### 5.1.3 Estandarización de primers y PCR de punto final

Se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos desde los productos de la extracción de ARN total hasta los productos PCR de punto final en muestras no diluidas (Tabla 3), obteniendo los siguientes resultados:

*Tabla 3. Concentraciones y relaciones de absorbancias de ARN total, ARN tratado y ADNc*

<b>ARN TOTAL</b>			
Muestra	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
IMC67-t2-R1	334,481	1,473	0,846
IMC67-t2-R3	397,49	1,122	0,618
IMC67-t2-R5	36,033	1,649	1,03
FEC2-t2-R1	40,758	1,694	1,161
FEC2-t2-R2	44,95	1,828	1,486
FEC2-t2-R5	50,064	1,86	1,497
<b>ARN TRATADO</b>			
IMC67-t2-R1	28,937	1,272	0,412
IMC67-t2-R3	19,295	0,919	0,265
IMC67-t2-R5	21,718	0,92	0,231
FEC2-t2-R1	16,353	0,808	0,205
FEC2-t2-R2	23,072	0,752	0,179
FEC2-t2-R5	19,662	0,743	0,175
<b>ADNc</b>			
IMC67-t2-R1	1189,516	1,794	1,936
IMC67-t2-R3	1329,759	1,729	1,697
IMC67-t2-R5	1272,497	1,752	1,732
FEC2-t2-R1	993,081	1,682	1,436
FEC2-t2-R2	1254,805	1,703	1,496
FEC2-t2-R5	1109,599	1,664	1,314

En la tabla se destaca una considerable disminución en la concentración de los ácidos nucleicos para las tres variedades de cacao, posterior al tratamiento con ADNasa, reportando una reducción de entre el 39,7% y 91,3%. Por otra parte, se evidencia un gran incremento en la concentración de ácidos nucleicos en el proceso de síntesis de ADNc, aumentando hasta 60 veces su concentración inicial.

Por otra parte, se realizaron gradientes de temperatura para los genes *NRAMP5*, *PUB* y *RPL135* con la finalidad de determinar la temperatura óptima de anillamiento de los primers, así como seleccionar el gen de referencia con mayor estabilidad para el experimento. Las temperaturas del gradiente se seleccionaron según la información del inserto de los primers y la temperatura de anillamiento calculada (Figura 5), permitiendo que el programa del termociclador agregara temperaturas por encima y debajo de las mencionadas (Tabla 4).

Figura 5. Fórmula para determinar la temperatura y tiempo de anillamiento. Donde  $T_a$  es la temperatura de anillamiento calculada y  $T_i$  es la temperatura sugerida en el inserto.

$$T_a(^{\circ}\text{C}) = 4(G + C) + 2(A + T) - T_i$$

(Longitud de amplicón por defecto (1000pb))/(Longitud de *NRAMP5* (125pb) →  
(Tiempo del ciclo por defecto (60 s))/■(Tiempo estimado)

Fuente: Tomada de (Barboza et al., 2019)

Tabla 4. Gradientes de temperatura seleccionados para los genes *NRAMP5* y *PUB*. Subrayadas se encuentran las columnas del termociclador en las que se ubicaron las muestras y resaltadas aquellas en las que se presentó amplificación.

# Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1 2
T (°C) NRAMP 5	5 8	58, 4	58, 7	59, 1	<u>59,</u> <u>5</u>	59, 8	<u>60,</u> <u>2</u>	60, 5	60, 9	<u>61,</u> <u>3</u>	61, 6	<u>6</u> <u>2</u>
T (°C) PUB	5 8	58, 4	58, 7	59, 1	<u>59,</u> <u>5</u>	59, 8	<u>60,</u> <u>2</u>	60, 5	<u>60,</u> <u>9</u>	61, 3	61, 6	<u>6</u> <u>2</u>

Posteriormente, por medio de los resultados de la electroforesis, se seleccionó la temperatura de 61°C como la óptima para el anillamiento tanto para *NRAMP5* como *PUB* (Tabla 5), mientras que la temperatura para el gen *RPL135* fue de 59°C con bandas muy opacas, por lo tanto, se descartó como gen de referencia.

Tabla 5. Parámetros de configuración del termociclador para PCR de punto final de los genes *NRAMP5* Y *PUB*.

Proceso	Temperatura en °C	Tiempo en minutos	Ciclos
Desnaturalización	94	05:00	1
Activación E	94	00:40	35
Anillamiento P.	61	00:40	
Extensión	72	00:20	

Desactivación E.	72	10:00	1
Mantenimiento	8	∞	1

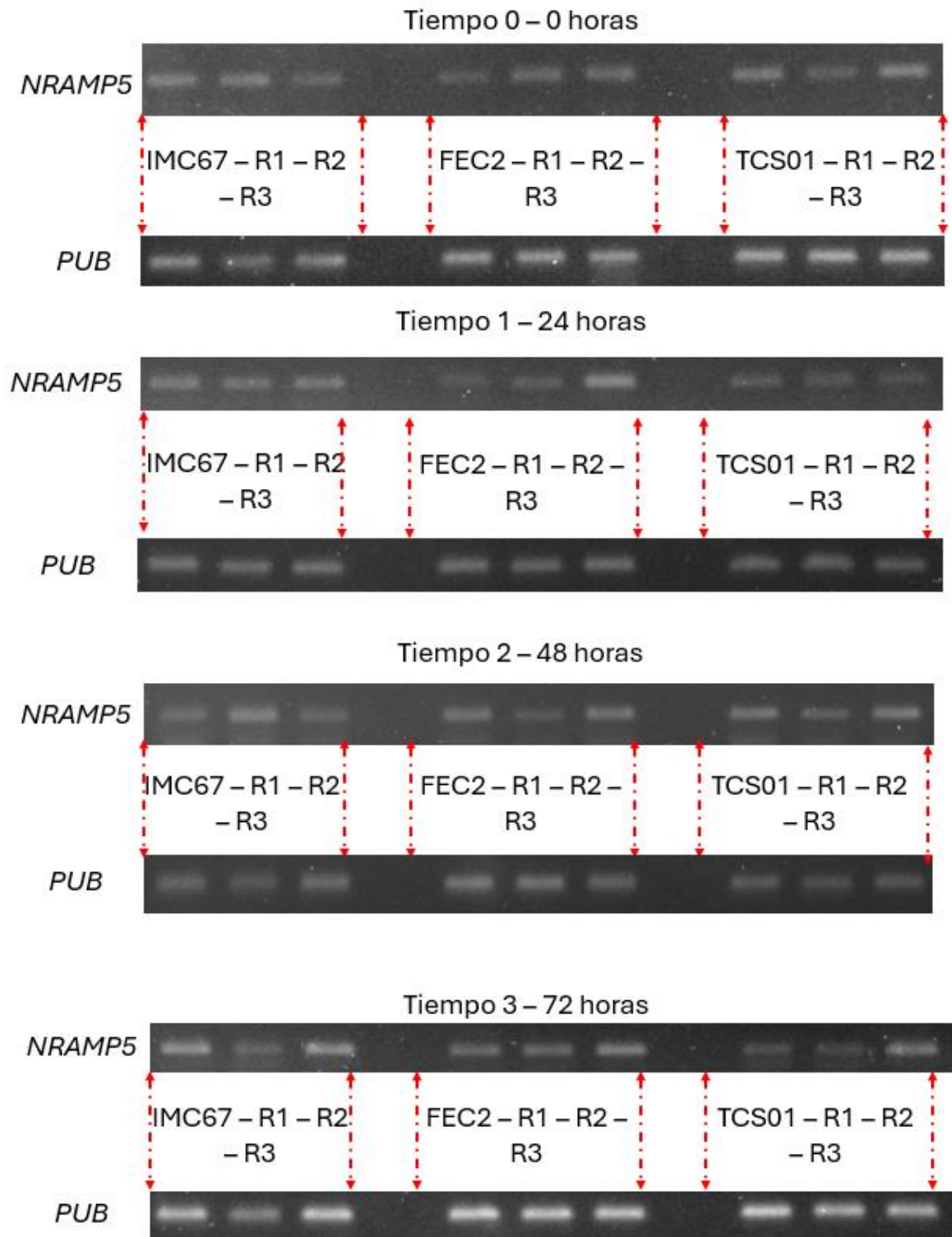
Así mismo, se determinó que aumentar el tiempo de trabajo de la ADNasa de 5 minutos a 10, aumentó considerablemente la cantidad de muestras negativas en el respectivo control por medio de PCR convencional de *RUBISCO*.

Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos con los reactivos del kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), para la PCR de punto final, teniendo en cuenta la baja definición en la cual se revelaban las bandas y la probable presencia de inhibidores. Para esto se aumentó la concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1mM a 2,5mM según el rango permitido en el protocolo, así como se agregó BSA (0,1µg/µL) como coadyuvante para restringir el efecto de inhibidores como los fenoles.

## 5.2 Análisis de expresión genética

Los parámetros de exposición del gel de agarosa a la radiación UV previos a la toma de la imagen, así como las modificaciones posteriores en el foto-documentador, permitieron definir claramente las bandas y los fragmentos de los marcadores de peso molecular (Figura 6, Anexo 10), facilitando la calibración de los pesos moleculares en pb e intensidades de banda en pixeles/mm<sup>2</sup>. Adicionalmente, al trabajar con el negativo de la foto, se obtuvo una mayor precisión en los datos.

*Figura 6. Resultados de PCR de punto final para los genes NRAMP5 y PUB en gel de agarosa al 2%.*



En las imágenes se identifica una tendencia homogénea de intensidad de banda (>90%) para el gen *PUB*, lo que confirma su idoneidad como gen de referencia. En

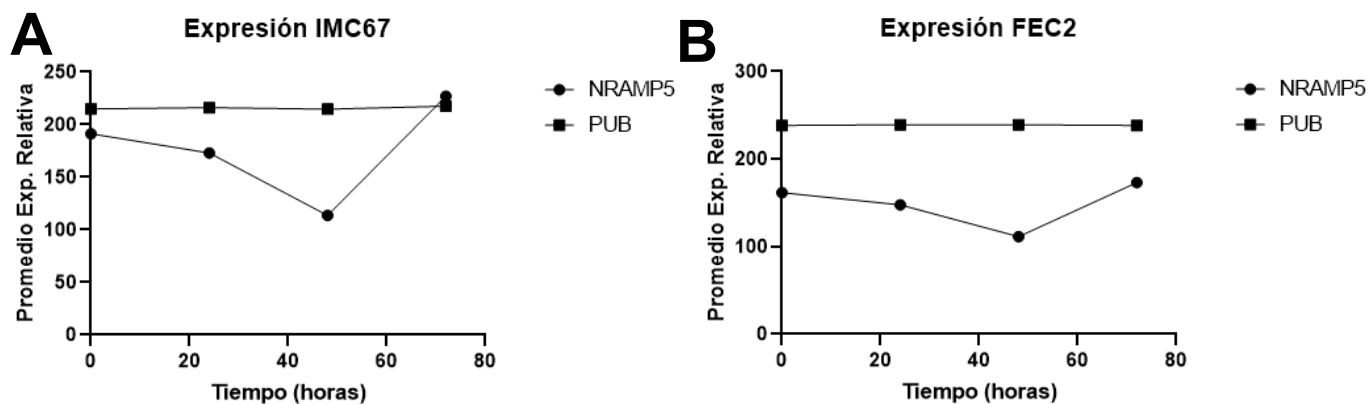
contraste, el gen *NRAMP5* evidencia una clara expresión diferencial entre los materiales y tiempos, inclusive presentándose entre réplicas.

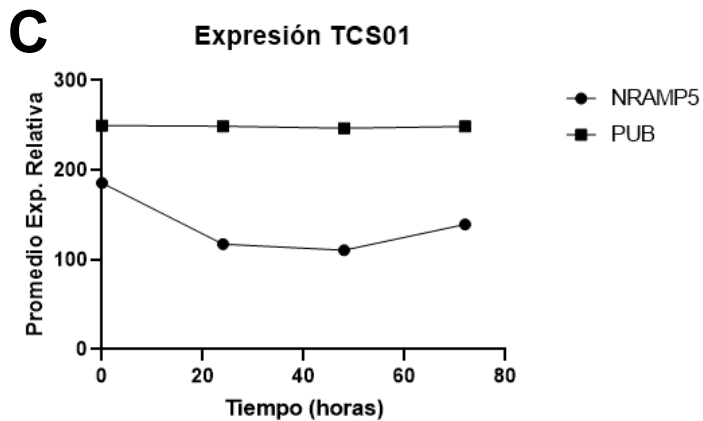
Una vez se contó con los resultados de la intensidad de banda para el negativo de los geles en el programa Gel Analyzer, se diseñó un gráfico de cajas y bigotes (Anexo 6) para identificar la presencia de datos atípicos que afectarían la precisión de los índices descriptores, de esta manera, se estableció que aproximadamente el 10% de los datos totales por material, correspondía con esta característica. Por lo tanto, se realizó una regresión lineal, generando los residuales **estudiantizados** y una gráfica de distribución de los estos (control del error en el modelo), para realizar un ajuste en los datos atípicos, así como disminuir su dispersión (Anexo 6).

Al revisar la columna de valores de residuales **estudiantizados**, ninguno de ellos fue superior a 2, indicando que la variación en los datos respecto al promedio no es significativa.

Por otra parte, los valores de las intensidades de banda ( $Px/mm^2$ ) se registraron en una matriz de Microsoft Excel, para diseñar gráficas de dispersión de los patrones de expresión en genes *NRAMP5* y *PUB* (Figura 7) y determinar los comportamientos de estos en los distintos materiales.

Figura 7. Patrones de expresión de los genes *NRAMP5* y *PUB* para los materiales *IMC67*, *FEC2* y *TCS01*. A Expresión de *IMC67*, B. Expresión de *FEC2* y C. Expresión de *TCS01*





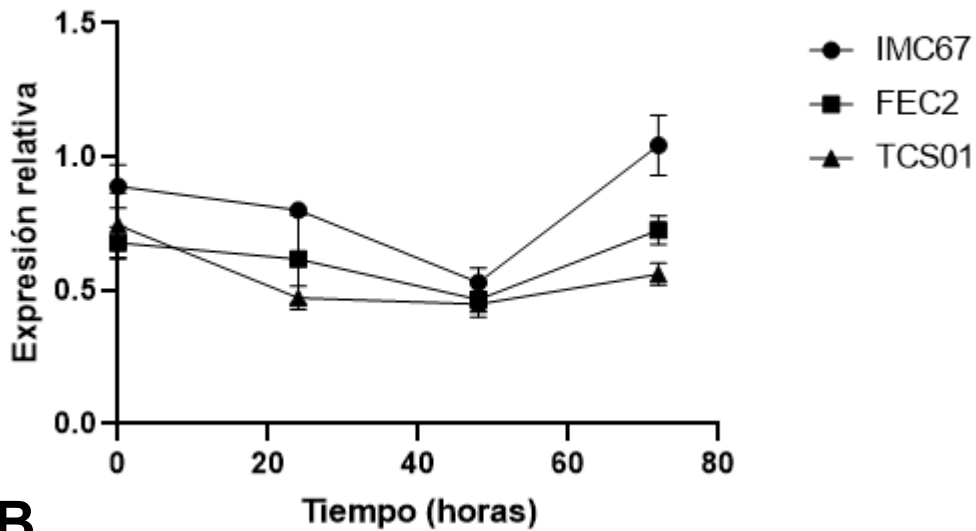
Fuente: gráficos realizados con el programa Graph pad – Prism 8.0.1

En las gráficas se identifica una gran estabilidad del gen de referencia *PUB*, representada en una tendencia de los datos casi constante, por el contrario, la distribución de los promedios en la intensidad de la banda para el gen *NRAMP5* aparenta una tendencia sinusoidal.

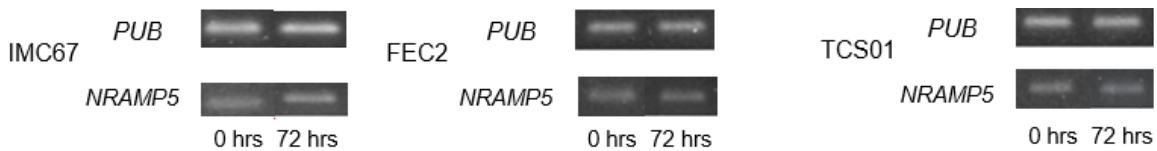
Posteriormente, se calculó la expresión relativa de *NRAMP5* mediante un factor de conversión sencillo, determinando una proporción de expresión en donde los valores inferiores a 1 indican la regulación del gen y valores superiores a este, su sobre expresión. Contando con estos datos, se realizó una tabla de resumen para determinar la dispersión de los datos, así como se diseñó una gráfica comparativa de la expresión relativa de cada material en los tiempos de evaluación (Figura 8).

Figura 8. Patrones de expresión relativa en los materiales IMC67, FEC2 y TCS01. A. Gráfico de picos con barras de error de los patrones de expresión relativa. B. Gel de agarosa con el contraste entre *NRAMP5* y *PUB* a las 24 horas y 72 horas.

## A Patrones de expresión relativa



## B



En la gráfica se destaca la predominancia en cada tiempo del material IMC67, añadiendo que de los 3 materiales es el único que llega a sobre expresarse respecto al gen de referencia. Por otra parte, el material FEC2 exhibe características intermedias de expresión mientras que el material TCS01 presenta los niveles más bajos de expresión relativa, posterior a la exposición a CdCl<sub>2</sub>.

Posteriormente, se calcularon los niveles de expresión, como la relación entre el promedio de la expresión relativa en cada tiempo de exposición al cadmio, respecto a la condición inicial de expresión denominada como control absoluto (tiempo 0) (Figura 9).

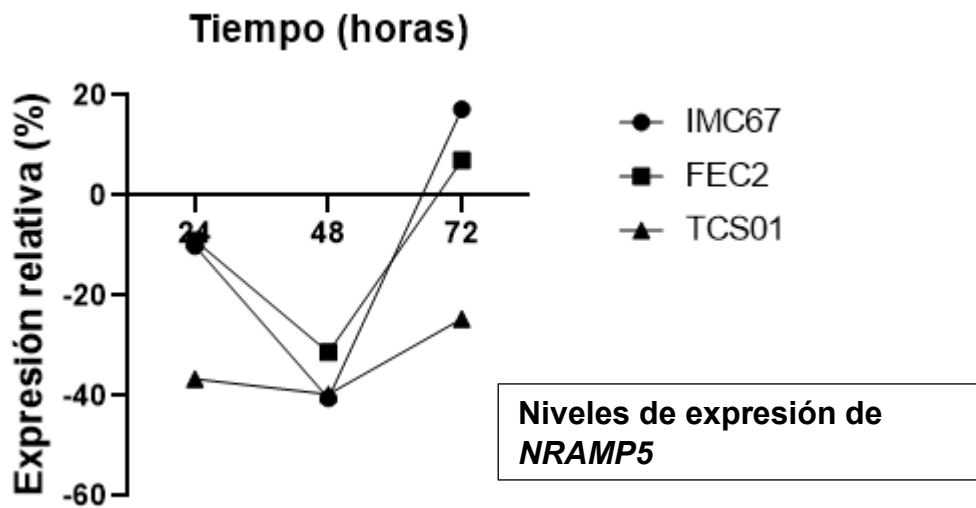
Figura 9. Fórmula para calcular los niveles de expresión del gen NRAMP5 en los materiales IMC67, FEC 2 Y TCS01.

$$\begin{aligned} \text{Nivel de expresión (fold change)} \\ = ((x_{med}(t_{1,2,3}) - X_{med}(t_0)) / x_{med}(t_0)) * 100 \end{aligned}$$

Fuente: tomado de (Kelmansky, 2006)

Una vez se contó con la matriz de los niveles de expresión se realizó una gráfica de picos y barras de error para determinar las diferencias entre los materiales (Figura 10)

Figura 10. Niveles de expresión de NRAMP5 en los materiales IMC67, FEC2 y TCS01 en respuesta a estrés por Cd.



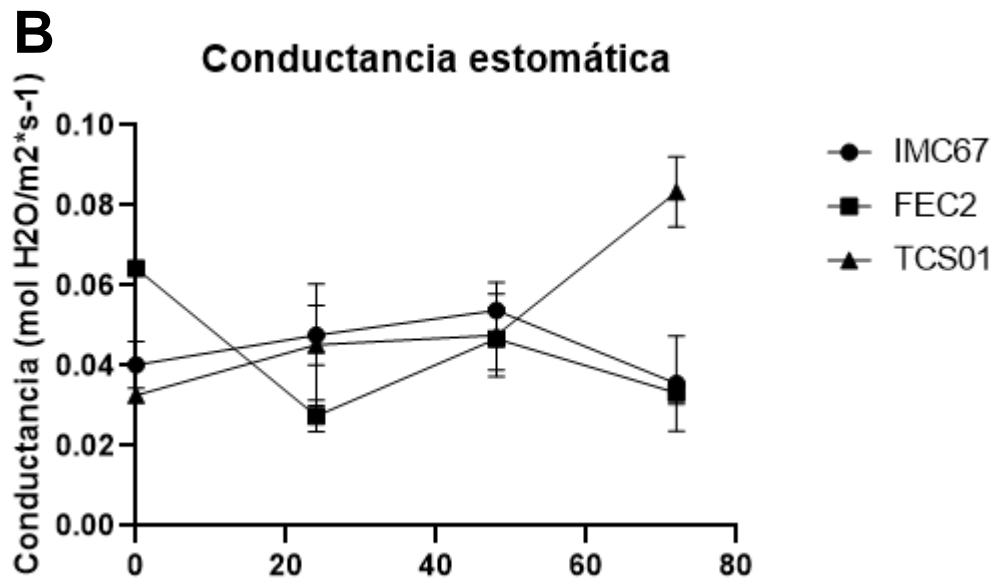
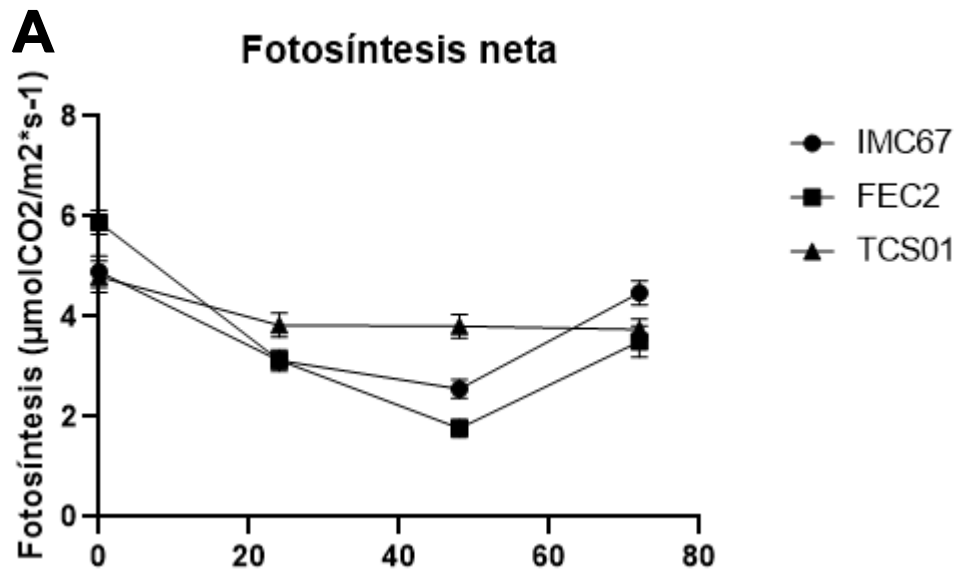
En el gráfico se distinguen diferencias entre el patrón para cada material respecto a la expresión relativa y los niveles de expresión, una de las diferencias más relevantes es el comportamiento del material IMC67 en las 48 horas del experimento, puesto que decrece más visiblemente respecto a su condición inicial sus niveles de expresión, inclusive, llegando a ser menores que el material FEC2 en casi todos los tiempos evaluados. Por otra parte, el material TCS01 exhibe procesos de subexpresión y sus niveles son estables a lo largo del experimento, indicando que fue más tolerante al estímulo por cadmio que FEC2 e IMC67.

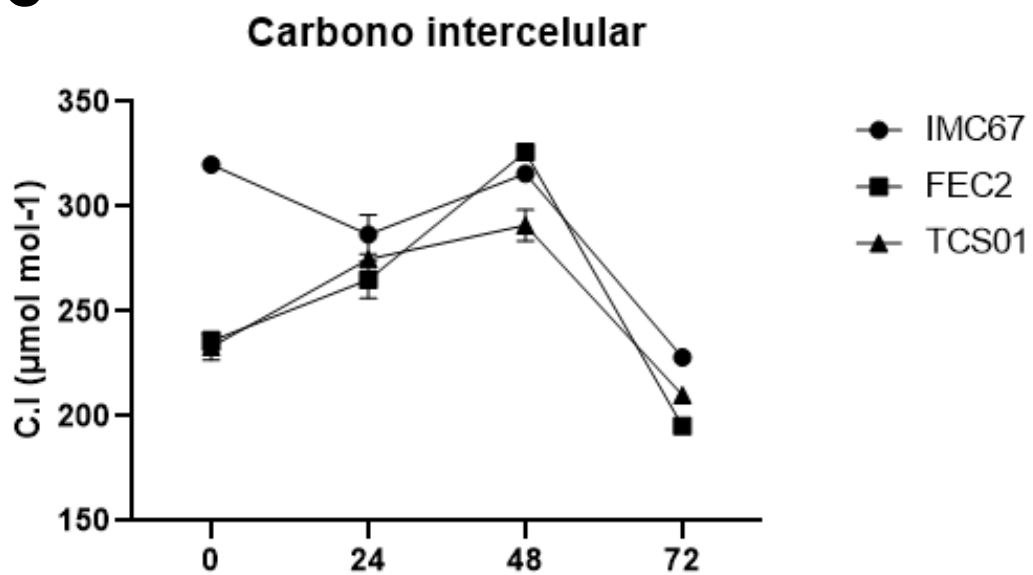
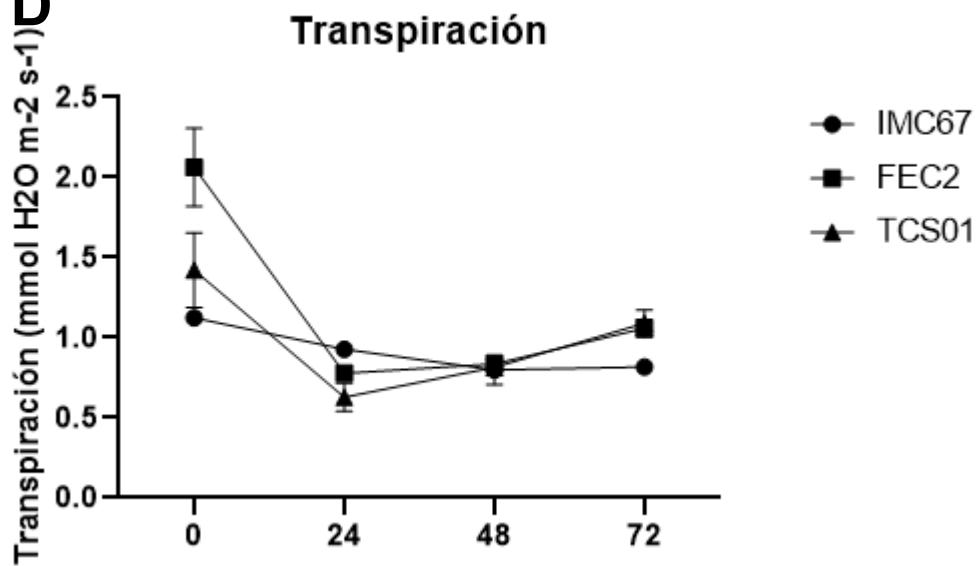
Por otra parte, se realizó un análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis (Fuentes et al., 2019) y una comparación de medias, ambas pruebas con una significancia  $\alpha=0,05$  (Anexo 7). Como el valor p (0,443) es menor que H (1,87), se concluye que los niveles de expresión entre los materiales son diferentes, sin embargo, la comparación entre medias no identifica una diferencia mínima significativa para los materiales evaluados.

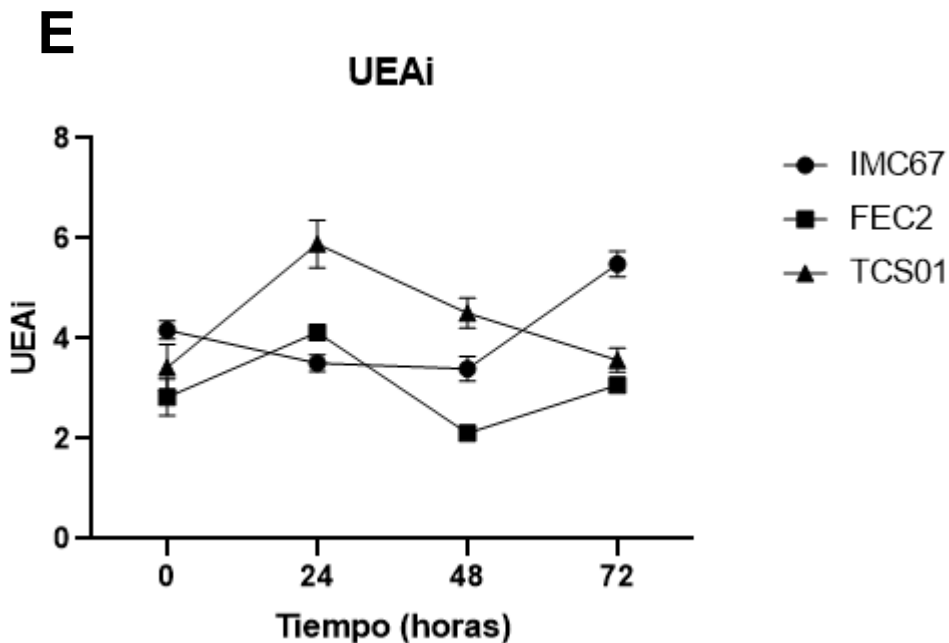
### 5.3 Respuesta fisiológica

Teniendo en cuenta los promedios por material (6 réplicas), se diseñó un gráfico de dispersión (Figura 11) para comparar los patrones de los datos por material, en cada parámetro fisiológico ( $P_N$ ,  $gs$ ,  $E$ ,  $C_i$  y  $UEAi$ ).

Figura 11. Gráficos de dispersión de parámetros fisiológicos. A. Gráfico de fotosíntesis neta, B. Gráfico de conductancia estomática, C. Gráfico de carbono intercelular, D. Gráfico de transpiración, E. Gráfico de  $UEAi$ .  $\text{mol H}_2\text{O/m}^2\text{s}^{-1}$



**C****D**



En el gráfico se distingue una clara disminución de la fotosíntesis neta, entre las 0 y 24 horas para los 3 materiales. Sin embargo, mientras que los materiales IMC67 y FEC2 continúan presentando una tendencia de decrecimiento hasta las 48 horas, TCS01 exhibe un comportamiento de crecimiento. Adicionalmente, a las 72 horas, los 3 materiales alcanzan un valor cercano a los  $3,35 \mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ , con una baja desviación de los datos respecto al promedio.

En cuanto al parámetro C.I., se presentó una distribución en forma de arco para todos los materiales, indicando que los mayores valores para C.I. se reportaron a las 24 y 48 horas, lo que se interpreta como una respuesta sensible al estímulo con cadmio. Sin embargo el material TCS01 fue el que presentó una menor variación en los valores, manteniendo sus niveles de carbono intercelular estables, hasta llegadas las 48 horas después de dar inicio al experimento.

Adicionalmente, se presentó una disminución en la conductancia estomática para los materiales IMC67 y FEC2 con un pico en las 48 horas y su posterior decrecimiento; mientras que el material TCS01 presenta un leve crecimiento hasta las 48 horas, que se incrementa exponencialmente entre esta y las 72 horas. Dicho patrón entre materiales fue similar al observado en la transpiración, lo cual indica la relación positiva creciente, entre la apertura del estoma y las tasas de transpiración.

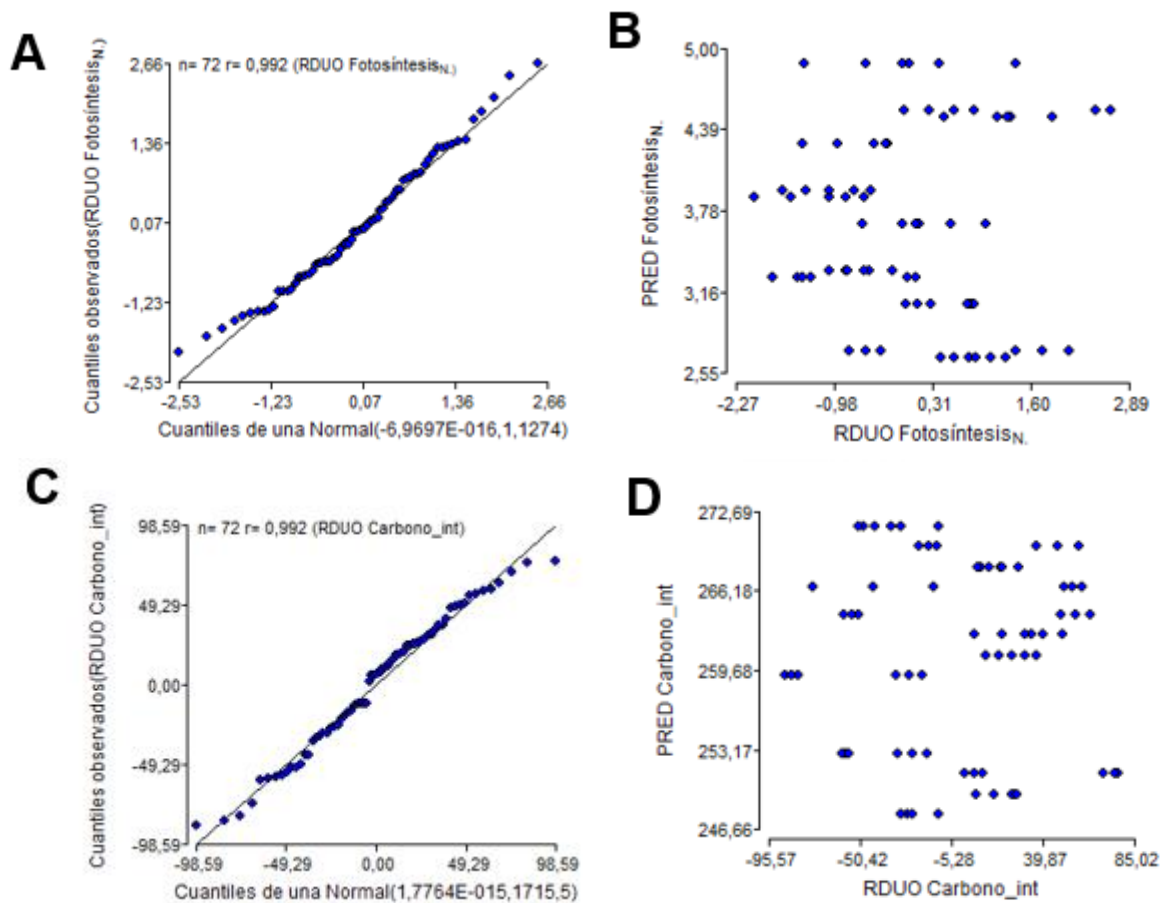
Por otra parte, la diferencia en la transpiración fue significativamente menor a la de la fotosíntesis neta, indicando que aunque ambos mecanismos se ven influenciados por el estrés generado por el cadmio, el aparato fotosintético es más sensible y por consecuencia se ve mayormente afectado.

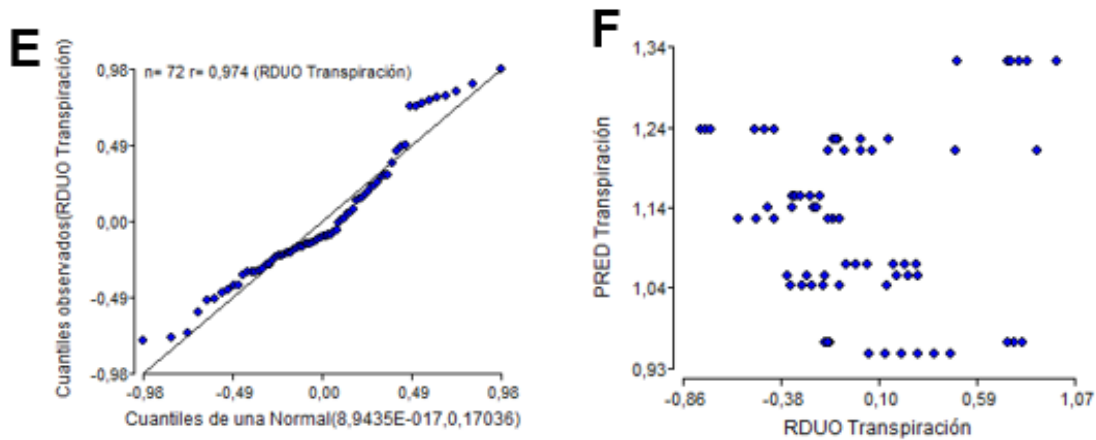
Posteriormente, se realizó una verificación de supuestos (normalidad y homocedasticidad) para las variables, por medio de las pruebas: Shapiro Wilks (Anexo 8), Q-Q Plot y gráfico de residuales vs valores esperados (Figura 11). El

valor p en la prueba Shapiro Wilks fue de 0,2556 para fotosíntesis, 0,0765 para carbono interno, con un valor  $\alpha = 0,05$ . Por lo tanto, se concluye que existen diferencias en los valores de fotosíntesis neta entre los materiales.

Adicionalmente, el valor p para la variable: Transpiración, fue inferior a la significancia ( $p$  valor =  $0,002 < \alpha = 0,05$ ). Sin embargo, en las pruebas gráficas se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Figura 11).

Figura 11. Verificación de supuestos por pruebas gráficas para los parámetros: fotosíntesis neta, C.I.y Transpiración. A, C, E, . Q-Q- Plot de los residuales, B, D, F, . Gráfico de residuales vs valores esperados.



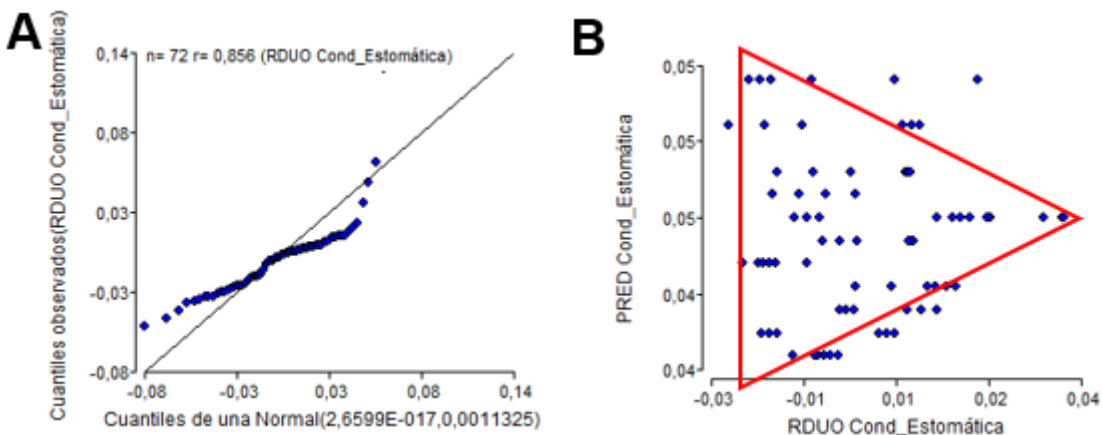


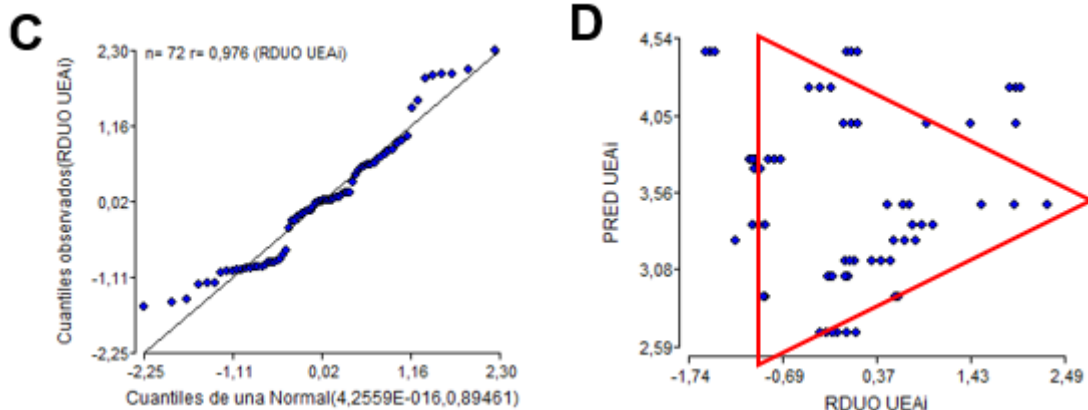
Fuente: elaborado en el programa InfoStat versión 20201

En las 3 gráficas Q-Q- Plot, se evidencia una clara tendencia de los residuales a agruparse según el patrón de la función identidad, por lo tanto, se puede concluir que los datos provienen de una distribución normal. Por otra parte, la nube de puntos errática en las gráficas de residuales vs valores predichos, indica que los datos son insesgados y homocedásticos (igualdad de varianzas).

Por otra parte, la prueba Shapiro Wilks para la variable conductancia estomática y UEAi, presentaron valores entre (0,0001 y 0,002)  $\alpha= 0,05$ , lo que indica que los datos no son normales. Dicha información se corroboró con las pruebas gráficas correspondientes (Figura 12).

Figura 12. Pruebas gráficas para las variables Conduc. E. y UEAi. A y C. Q-Q Plot para datos normales, B y D. Gráfico de residuales vs valores predichos.





En las gráficas Q-Q Plot, se pueden apreciar valores atípicos (Outlayers), así como su patrón sesgado a la izquierda, dado por los segmentos de los extremos que se distancian de la identidad. Por lo tanto, se considera que los datos no son normales. Por otra parte, los patrones de agrupación en forma de campana de las gráficas de residuales vs valores predichos indican que los datos son imparciales y heterocedasticos (Ferrero, 2019); por lo tanto, no se cumple la igualdad de varianzas).

Una vez se contó con la fiabilidad de los supuestos, se realizó un análisis de varianza ANOVA para dos factores con 3 niveles, así como se realizó una diferencia mínima significativa, ambas con una significancia  $\alpha=0,05$ . Sin embargo, para el caso de las variables conductancia estomática y UEAI, se realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) y su respectiva comparación de medias (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza paramétrico y no paramétrico para las variables estudiadas, así como los resultados de la comparación de medias.

Variable	Resultado ANAVA	Conclusión ANAVA	Resultado comparación de medias
Fotosíntesis neta	Valor $p=0,0214 < \alpha=0,05$	Las medias son diferentes	TCS01=FEC2=IMC67
Carbono interno	Valor $p=0,0313 < \alpha=0,05$	Las medias son diferentes	TCS01=FEC2=IMC67
Transpiración	Valor $p=0,0077 < \alpha=0,05$	Las medias son diferentes	TCS01=FEC2=IMC67
UEAi	Valor $p=0,0024 < H=12,02$	Las medianas son diferentes	TCS01>FEC2=IMC67
Conductancia estomática	Valor $p=0,506 < H=1,36$	Las medianas son diferentes	TCS01=FEC2=IMC67

Contando con estos resultados, se puede inferir que hubo diferencias entre las medidas de tendencia central para cada material de cacao en todos los parámetros. Sin embargo, solo las diferencias entre medias para el UEAi son significativas, indicando que el material TCS01 posee la mejor relación entre fotosíntesis y conductancia estomática, mientras que FEC2 e IMC67 poseen una menor relación y no son diferentes entre sí.

Adicionalmente, se diseñaron regresiones no lineales e independientes para cada material, seleccionando aquellos modelos con los mayores coeficientes de determinación  $r^2$  (Tabla 7).

*Tabla 7. Modelos de regresión no lineal para cada material.*

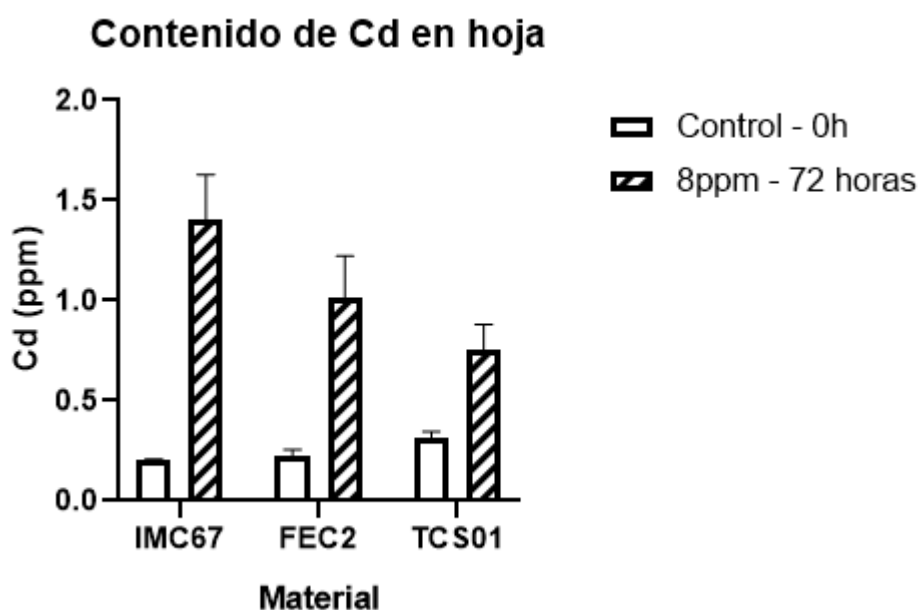
Variable	Material	Modelo	Fórmula	R <sup>2</sup>	X <sub>max</sub> (horas)	Y <sub>min</sub>
Fotosíntesis neta	IMC67	Polinomial 3°	$y = a + bx + cx^2 + dx^3$	0,97	96	0,564
	FEC2			0,98	96	5,195
	TCS01			0,97	96	5,2
Conductancia estomática	IMC67	Truncado	$y = a \cdot \cos(x+d) + b \cdot \cos(2x+d) + c \cdot \cos(3x+d)$	0,95	80	0,36
	FEC2	Fourier		0,98	80	0,396
	TCS01			0,98	80	0,391
Carbono intercelular	IMC67	Exponencial	$Y = a + b^r + c \cdot x$	0,97	94	224,67
	FEC2	Plus linear		0,91	94	114,11
	TCS01			0,94	94	175,72
Transpiración	IMC67	Polinomial 3°	$y = a + bx + cx^2 + dx^3$	0,99	90	1,303
	FEC2			0,97	90	0,341
	TCS01			0,98	90	1,408
UEAi	IMC67	Sinusoidal	$y = a + b \cdot \cos(cx+d)$	0,96	90	0,546
	FEC2			0,99	90	4,662
	TCS01			0,98	90	3,034

De los modelos, se destaca que, luego de transcurridas 96 horas de exposición del material IMC67 a 4,9ppm de Cd, el valor de la fotosíntesis neta será de 0,56  $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ , el cual es aproximadamente 1/10, de la fotosíntesis proyectada para los materiales FEC2 y TCS0. Por otra parte, se determinó que, transcurridas 94 horas, la transpiración para el material FEC2 será de aproximadamente 0,34  $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ , lo cual es aproximadamente  $\frac{1}{4}$  parte de la transpiración proyectada para los materiales TCS01 e IMC67. Finalmente, se identificó que el material IMC67 podría presentar el valor más bajo para el UEAi, que es hasta 8,5 veces menor que FEC2 y 5,5 veces menor que TCS01.

#### 5.4 Contenido de Cd en lámina foliar

Los análisis de contenido de cadmio en hojas sanas, se elaboró con muestras correspondientes al tiempo inicial (0 horas) y final (72 horas) (Figura 13). Luego, se realizó la respectiva verificación de supuestos con la prueba de D'Agostino & Pearson (normalidad) y prueba F (homocedasticidad) (Anexo 8 – 9), determinando que los datos son normales y homocedásticos.

Figura 13. Gráfico de barras del contenido de cadmio en tejido foliar.



En la gráfica se describe un aumento considerable en los contenidos de cadmio en la lámina foliar de los tres materiales. Sin embargo, el material IMC67 presenta la mayor acumulación de cadmio en hoja, seguido de FEC2 y finalmente TCS01 con el valor más bajo.

Posteriormente, para realizar la respectiva prueba de hipótesis, se hizo una prueba T (dos tratamientos) y comparación de medias *LSD* con un  $\alpha = 0,05$ , obteniendo que: como el valor *p* (0,0001) es menor que la significancia (0,05) los contenidos de cadmio en lámina foliar son diferentes entre los materiales (Anexo 11). Por otra parte, en la comparación de medias, se determinó que el material con la mayor media de contenido de cadmio en hoja fue IMC67 (A), una media intermedia dada por el material FEC2 (AB) y la menor media respectiva al material TCS01 (B).

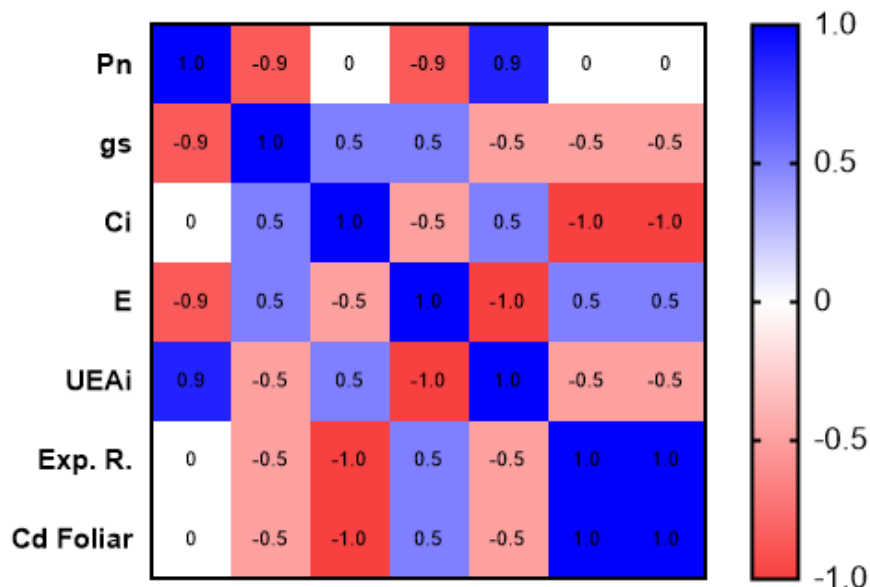
### 5.5 Análisis de correlación de Spearman y componentes principales (PCA)

Se realizaron análisis multivariantes para la determinación de las interacciones entre las variables. El primero de ellos fue un análisis de correlación de Spearman teniendo en cuenta las diferencias en la naturaleza de los datos (Figura 14).

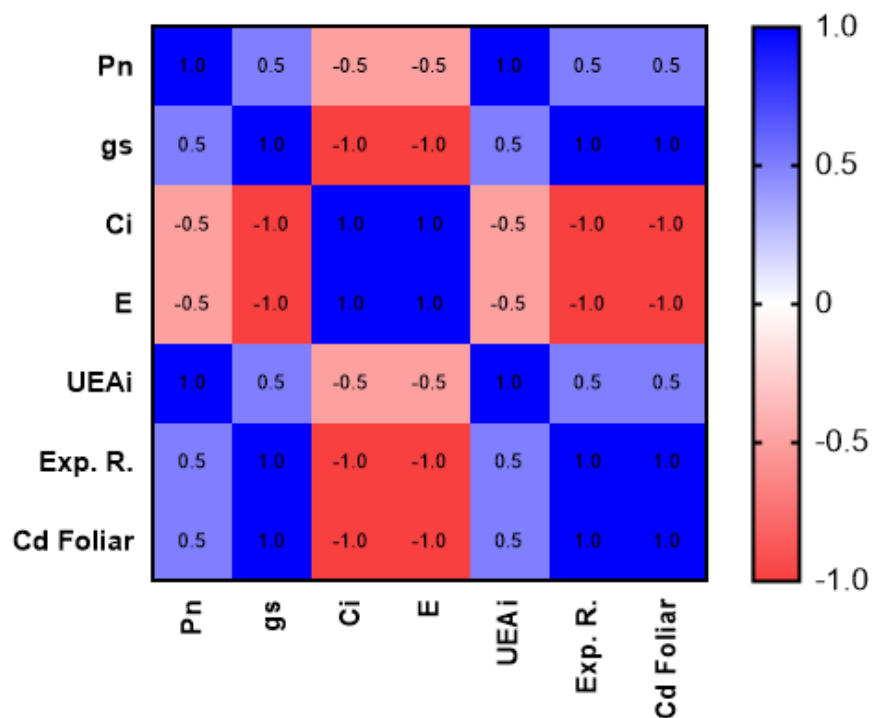
Figura 14. Gráfico de correlación de Spearman de los tiempos 0 (0 horas - control) y 3 (72 horas de exposición a cd), para las variables evaluadas (respuesta fisiológica, genética y contenidos de cadmio foliar) en los materiales: A. IMC67, B. FEC2 y C. TCS01

**A**

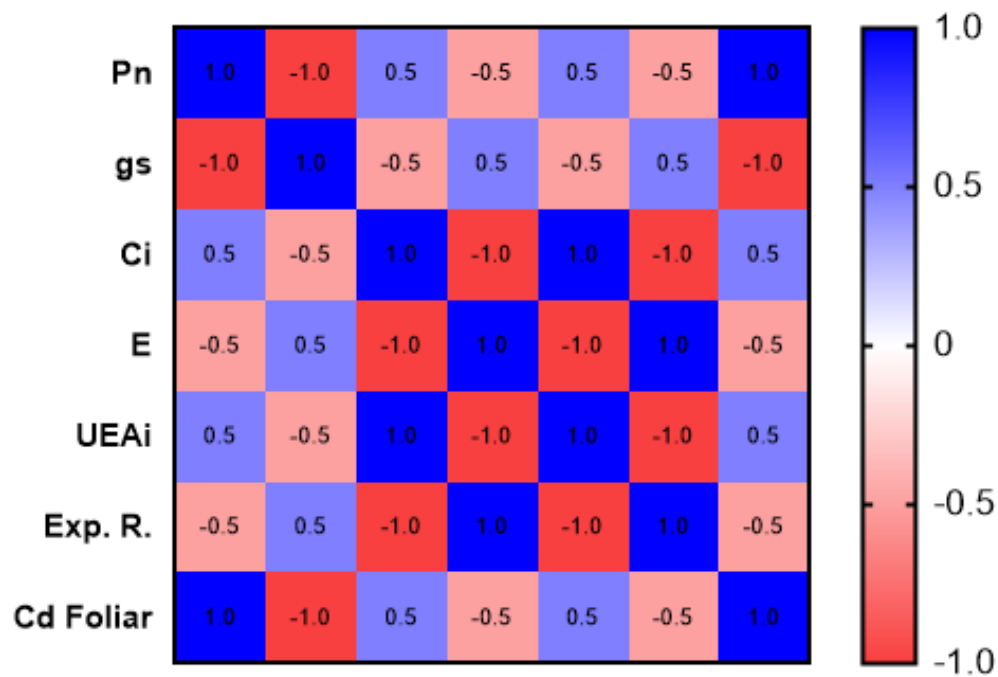
**Correlación de Spearman para IMC67 T0**



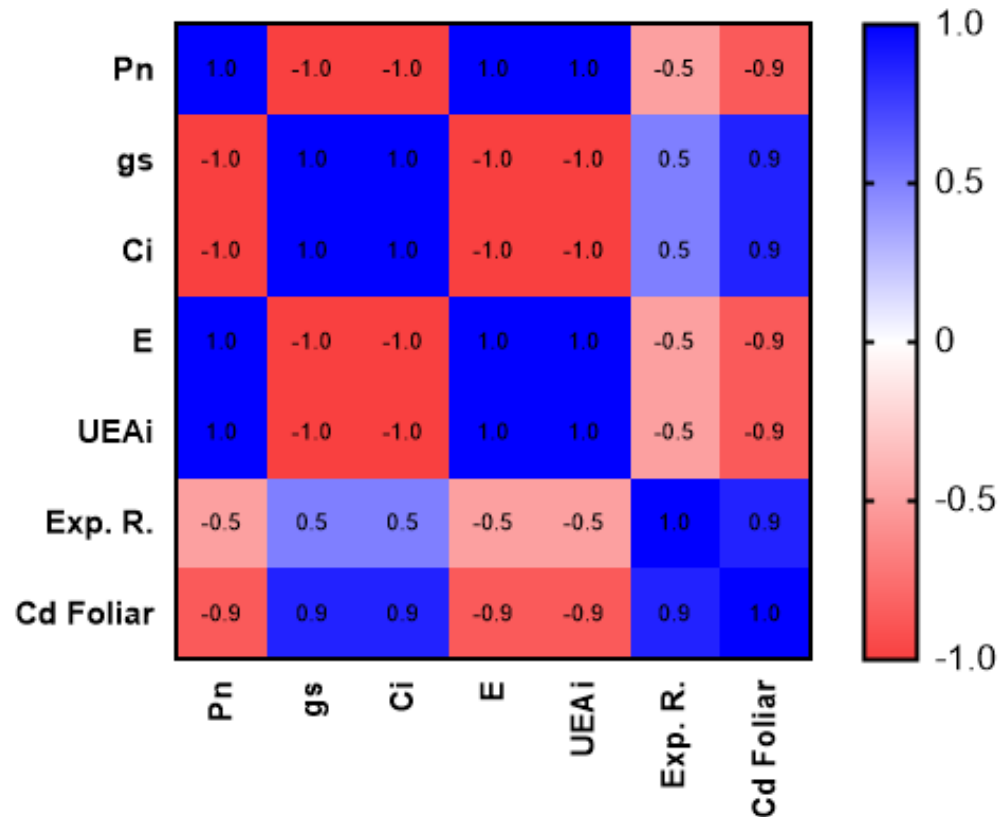
**Correlación de Spearman para IMC67 T3**



## B Correlación de Spearman para FEC2 T0

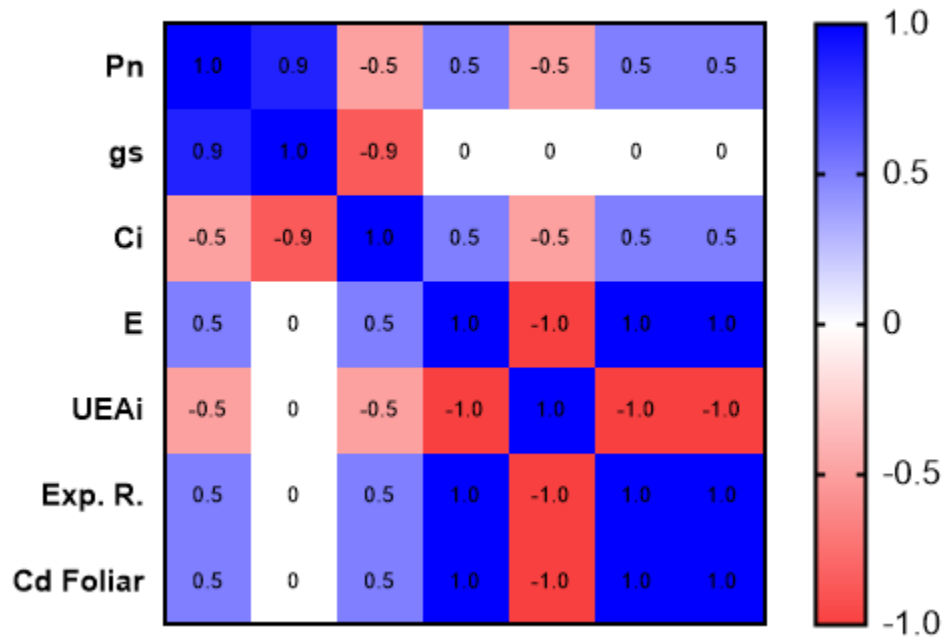


## Correlación de Spearman para FEC2 T3

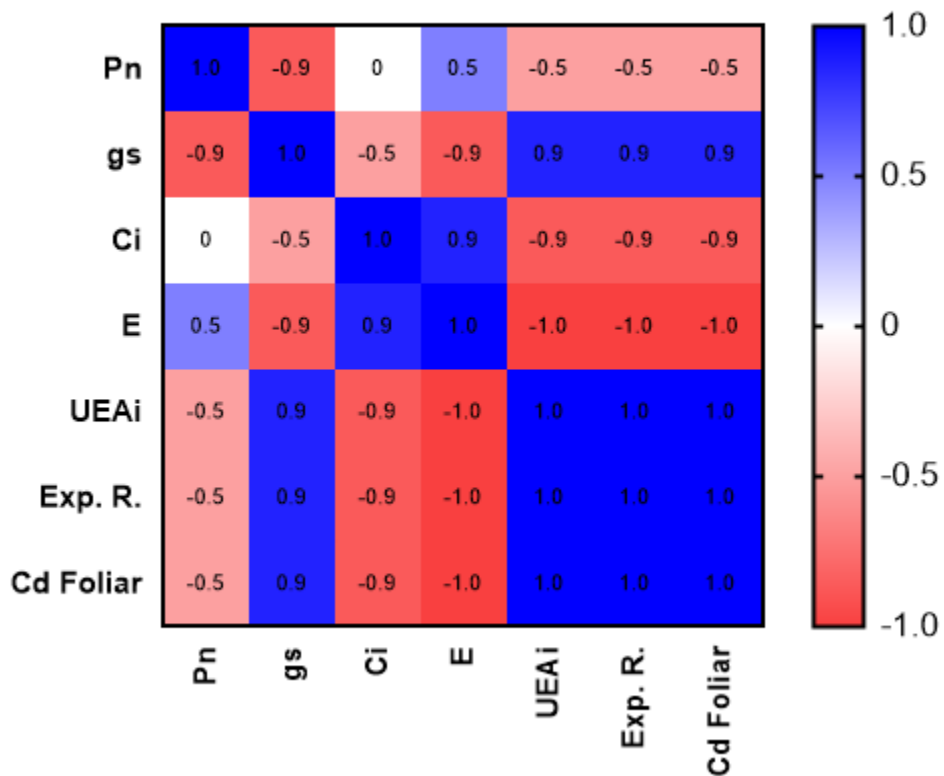


**C**

**Correlación de Spearman para TCS01 T0**



**Correlación de Spearman para TCS01 T3**



En las gráficas se destacan correlaciones positivas y negativas fuertes entre las variables estudiadas. En primer lugar, la correlación de mayor interés es la de las variables: expresión relativa (Exp. R.) y cadmio foliar (Cd Foliar), la cual fue positiva y fuerte ( $x \geq 0.9$ ) en los dos tiempos contrastantes (0 y 72 horas) para todos los materiales, indicando una relación directa de proporcionalidad entre estas.

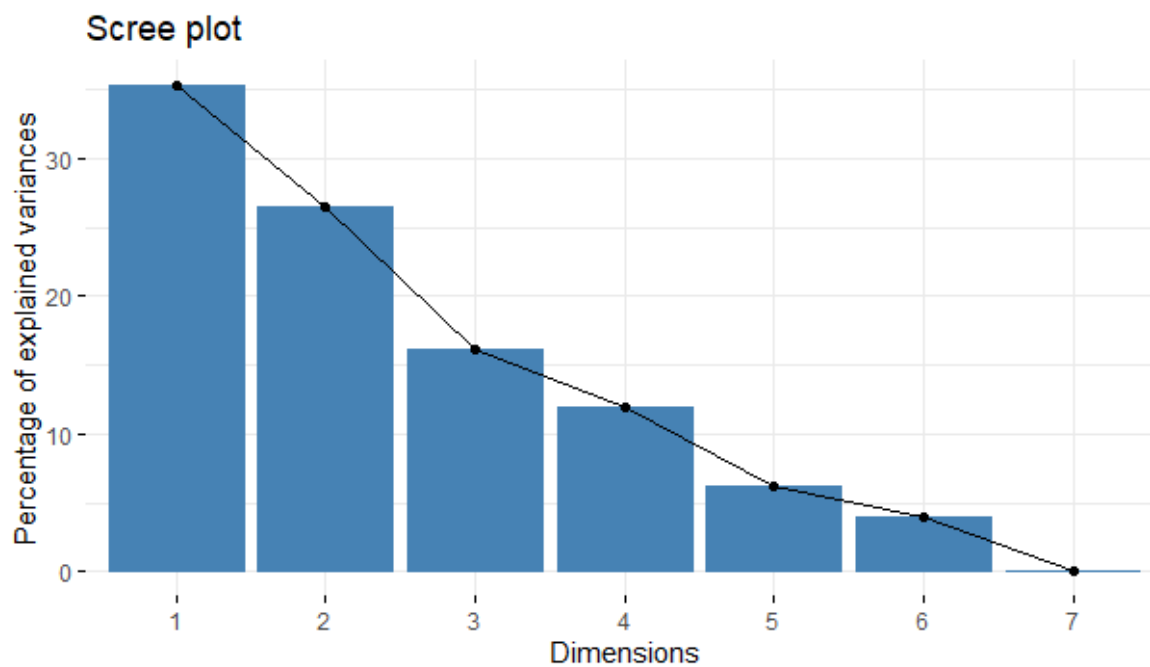
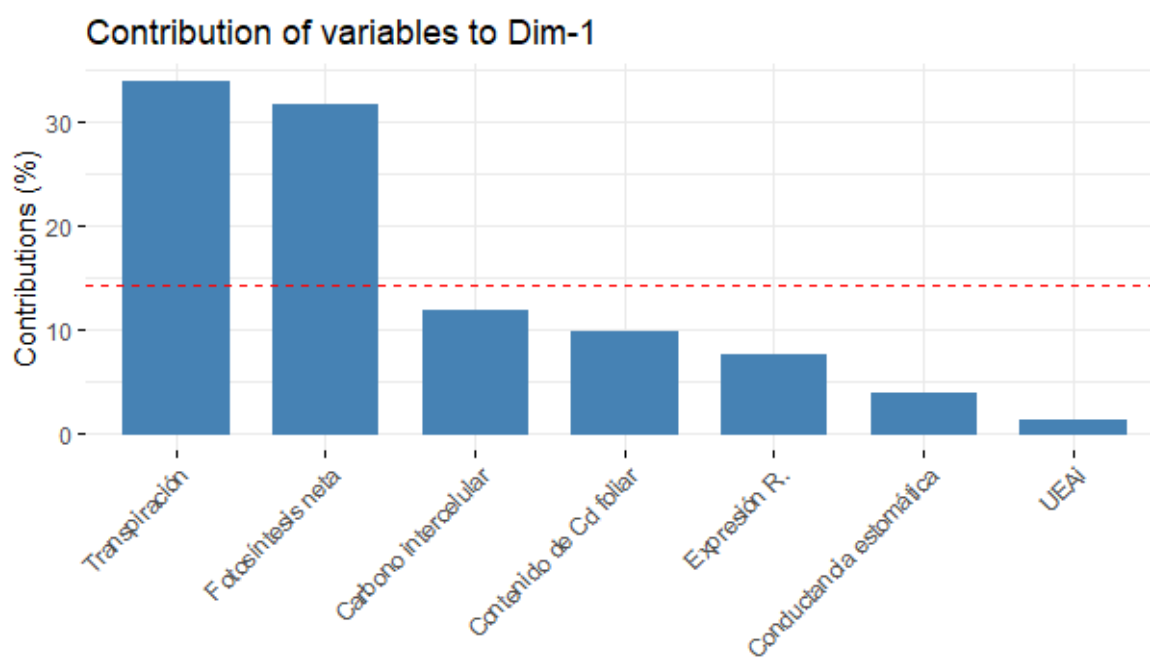
Por otra parte, se evidenció una correlación negativa fuerte ( $x = -1$ ), para los materiales IMC67 y TCS01 y moderada para FEC2 ( $x = -0.5$ ), entre las variables Exp. R. y  $UEAi$  para el tiempo 0. Posteriormente, a las 72 horas, dicha correlación fue moderadamente positiva para IMC67 y FEC2, mientras que para el material TCS01 fue positiva y fuerte ( $x = 1$ ).

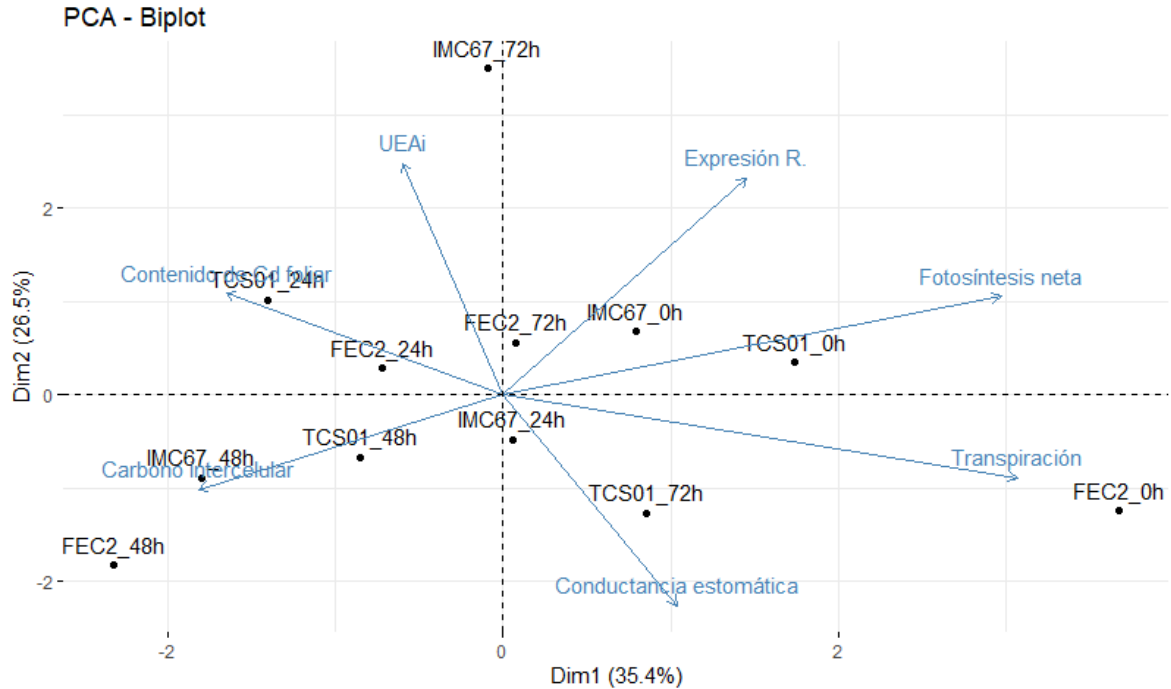
Adicionalmente, se identifica una correlación positiva entre la Ex. R y transpiración (E) para el T3 en IMC67 y TCS01 ( $x \geq 0.9$ ), mientras que FEC2 exhibió una correlación moderada positiva. Dichas correlaciones son relevantes teniendo en cuenta que en el tiempo 0 no se detectaron correlaciones en IMC67 y TCS01, mientras que en FEC2 se determinó una correlación positiva débil.

Respecto al cadmio foliar (Cd. Foliar), este posee una correlación negativa fuerte ( $x = -0.9$ ), con la fotosíntesis neta ( $P_N$ ) en el material FEC2, negativa débil ( $x = -0.5$ ) en TCS01, mientras que en IMC67 es una correlación positiva débil ( $x = 0.5$ ). Así mismo, el Cd. Foliar posee una correlación negativa fuerte con  $E$  ( $x \geq -0.9$ ) (72 h) y con  $Ci$  ( $x \geq -0.9$ ) en los tres materiales. Finalmente, el Cd. Foliar, posee una correlación negativa fuerte con el  $UEAi$  ( $x \geq -0.9$ ) para los materiales IMC67 y FEC2, mientras que para TCS01 reporta una correlación positiva fuerte ( $x = 1$ ).

Por otra parte, se realizó un análisis de componentes principales, del cual se obtuvo el aporte de cada componente a la variabilidad de los datos y por cada variable, así como los vectores y distribuciones de los datos respecto a estos (Figura 15).

*Figura 15. Gráficas descriptivas del PCA. A. Porcentajes de varianza explicados por los componentes, B. Contribución de las variables al modelo, C. PCA con vectores por cada variable y la respectiva agrupación de los datos.*

**A****B**

**C**

*Fuente: Gráficos diseñados con el paquete ggplot de R studio*

En los resultados, se destaca la gran importancia de la variable “fotosíntesis neta” dada por una contribución del 34,8% al modelo, dentro de los 2 principales componentes (PC1, PC2) que a su vez describen el 68,6% de la varianza explicada. Por otra parte, las variables: transpiración, carbono intercelular y expresión relativa aportan el 31%, 29,5% y el 10,5% respectivamente.

Adicionalmente, se corrobora la estrecha relación entre las variables “expresión relativa” y “fotosíntesis neta”, al agruparse los vectores de estas variables en el mismo cuadrante. Por otra parte, las variables “expresión relativa” y “Carbono intercelular” son opuestas respecto a su dirección, lo que confirma su fuerte correlación negativa vista en el análisis de correlación de Spearman.

Por otra parte, la transpiración y conductancia estomática se agrupan en el cuadrante 4 indicando una correlación fuerte, mientras que el uso eficiente del agua intrínseco se proyecta en dirección opuesta a estos y es la variable con la menor contribución al modelo.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Manejo del cultivo hidropónico y estandarización de procedimientos en laboratorio

El ajuste de los parámetros fisicoquímicos como el oxígeno disuelto y conductividad eléctrica, influyen directamente en el correcto desarrollo de las plantas en sistemas hidropónicos. De esta manera, un cultivo como la lechuga (*Lactuca sativa*) requiere una cantidad de entre 4 y 5,6 mg/L o ppm de O<sub>2</sub> para el correcto desarrollo de raíces y estructuras vegetativas. Adicionalmente, se indica, que un valor de C.E.=1,8 mS/cm, garantiza la correcta resuspensión de los minerales en la solución nutritiva (Manqueros, 2015). Teniendo en cuenta que los valores estandarizados para el experimento con cacao fueron inferiores a los recomendados en otras especies (3,8 ppm de O<sub>2</sub> y 1,1 mS/cm), es posible inferir que el cacao en cultivo hidropónico se desarrolla correctamente en condiciones inferiores a los límites mínimos permitidos para hortalizas y vegetales. Dicha afirmación se sustenta en la ausencia de deficiencias nutricionales en más del 90% de las plantas durante todo el experimento.

El protocolo para la extracción de ARN PureLink® Plant RNA Reagent – Ambion fue seleccionado debido a su alta eficiencia en el procesamiento de muestras con altos contenidos poli fenólicos (como los tejidos del cacao) y almidón (Ambion, 2012). Dicha eficiencia, se debe a los contenidos del buffer de extracción, tales como ázida sódica, que previene la contaminación con ARNasas y microorganismos suspendidos en el ambiente (QIAGEN, 2021), así como también contiene β-mercaptoetanol cuya función principal es la de eliminar ribonucleasas que se liberan en el proceso de lisis celular (Castillo, 2019).

En las pruebas de cuantificación, al identificar valores de absorbancias A260/A280 menores a 1,8 (Mubarak et al., 2020), se determinó que dichos resultados estaban relacionados con un bajo tiempo de precipitación de los ácidos nucleicos y la presencia natural de compuestos fenólicos en los tejidos del cacao (Quiñones et al., 2016), por lo tanto, se ajustó el tiempo de incubación con isopropanol a 1 hora, se aumentaron las revoluciones y temperatura en la centrifuga (Michel-López et al., 2018). Dichos ajustes se realizaron, además, con el objetivo de visualizar más fácilmente el pellet, evitando descartarlo en los lavados con etanol al 75%.

Por otra parte, la temperatura de anillamiento de los primers resultó ser la indicada para ambos genes, debido a que los tamaños de amplicón son muy similares (*NRAMP5*= 125pb, *PUB*= 121pb) y que se realizaron los cálculos según la fórmula tradicional para amplicones de 100 pb o más, teniendo en cuenta el valor en el inserto del pedido de primers y considerando valores cercanos a 5°C bajo la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) (Asif et al., 2021). Dicho valor permitió la obtención de productos PCR de gran calidad debido a la aplicación de correcciones en el algoritmo del programa Pimer3 que consideran la formación de cationes en la reacción y corrigen el enmascaramiento por defecto de secuencias repetitivas, lo que aumenta la precisión de los cebadores (Koressaar & Remm, 2007).

Finalmente, las modificaciones realizadas en los reactivos de la PCR de punto final, como aumentar la concentración de  $MgCl_2$  de 1 mM a 2Mm y agregar BSA como coadyuvante, se realizaron teniendo en cuenta las consideraciones del fabricante. En el caso del  $MgCl_2$ , la baja eficiencia de reacción podía deberse a la disminución de magnesio libre por la presencia de los ácidos nucleicos, por lo tanto, se aumentó empíricamente su concentración hasta observar bandas definidas sin formación de dímeros (Dorado, 2019). Por otra parte, la función de la seroalbúmina bovina (BSA), es estabilizar la reacción al inhibir la reacción de nucleasas y evitar la adherencia de la polimerasa al tubo y a las puntas de micropipeta (Thermo Fisher Scientific, 2024)

## 6.2 Expresión del gen *NRAMP5* en respuesta al estrés por Cadmio

Como la enzima Poliubiquitina (*PUB*) cumple la función de regular la expresión genética, generando modificaciones en el proceso de transcripción y en las proteínas sintetizadas (Zamudio et al., 2012), la intensidad diferencial de algunas bandas puede responder precisamente a un mecanismo de regulación por la respuesta al cadmio. Sin embargo, como dichos datos representaron menos del 10% del total, la corrección por medio del modelo satisface la premisa de una alta estabilidad de dicho gen (Pinheiro et al., 2011).

Por otra parte, la expresión diferencial en el gen *NRAMP5* ha sido evaluada en condiciones de deficiencia de cationes metálicos nutritivos y en presencia de cadmio (en conjunto y por separado), con el objetivo de identificar su especificidad, así como la interferencia de estos nutrientes en la respuesta genética a la presencia de cadmio (Ullah et al., 2018). Dentro de las conclusiones más importantes del estudio, se encuentra que la mayor regulación del gen *NRAMP5* en cacao, se dio ante la deficiencia de  $Fe^{2+}$ , indicando que es un transportador de cationes metálicos muy sensible al hierro y por lo tanto puede ser un factor que generó ruido en los resultados de expresión.

Adicionalmente, en la misma investigación (Ullah et al., 2018) se hizo una comparación entre un tratamiento con solución Hoagland a mitad de fuerza sin elementos menores y sin cadmio (T1) vs solución Hoagland sin elementos menores suplementada con 20  $\mu M$  de Cd (T2), donde se encontraron niveles de expresión significativamente altos del gen en el T1, mientras que el T2 exhibió un proceso de normalización en los niveles de expresión, similar a las condiciones del control (solución Hoagland completa). De esta manera, al comparar los materiales de cacao evaluados, se evidenció un patrón de subexpresión en todos ellos, lo cual puede estar relacionado con una abundante oferta de cadmio que sustituyó al hierro en la planta y fue menguando a medida que dicho elemento se agotaba en la solución. Muy probablemente debido a esta sustitución, no hubo diferencias significativas entre los materiales, así como hubo un comportamiento muy similar entre los materiales IMC67 y FEC2, que según la literatura son contrastantes en la absorción de cadmio (Fernández-Paz et al., 2021; Hoogerwerf, 2020). Cabe aclarar que, al

umentar la significancia  $\alpha=0,1$ , en la prueba de comparación de medias, se determinó que los materiales IMC67 y FEC2 son iguales, mientras que TCS01 es diferente, indicando el potencial de este último como material promisorio para establecimiento de cultivos tolerantes al cadmio (Anexo 8).

Este argumento se sustenta con los análisis de nutrientes realizados en tejido foliar de cacao por Fernández (2022), que indican que la cantidad promedio de hierro en la hoja del material IMC67 es de 209,75 ppm 5 meses después de la exposición sin adición de cadmio (0.7ppm de Cd), mientras que en el mismo suelo enriquecido con cadmio (40,36 ppm) es de 175,5 ppm. Estos resultados explican los altos requerimientos de hierro por parte de la planta (de edad similar a las del experimento) y un posible comportamiento de competencia entre Cd y Fe por el ingreso en la célula, por consecuencia, es muy probable que el metal pesado pueda sustituir temporalmente al hierro en la misma, causando irregularidades en su metabolismo (Viehweger, 2014).

Así mismo, un estudio en el que se realizaron homologías entre las secuencias de *NRAMP5* en arroz (*OsNRAMP5*) y cacao (*TcNRAMP5*), sugirió una posible alternativa para limitar la absorción de cadmio en cacao, generando un silenciamiento del exón 5 mediante técnicas de CRISPR -CAS9, que funcionó al reducir hasta un 98% del cadmio en las raíces del arroz (J. Rodríguez & Marín, 2020). Estos resultados validan la hipótesis de la importancia de cada fragmento codificante en la función gen (según la estructura visualizada en los análisis bioinformáticos), aunque puede resultar más efectivo un silenciamiento del exón 11, que no comprometería la función de la proteína permitiendo el transporte de hierro y no de cadmio.

Por otra parte, las correlaciones positivas y fuertes entre los valores de Change Fold y contenidos de cadmio foliar para los tres materiales, dan cuenta de la función de la proteína *NRAMP5* en el transporte del catión  $Cd^{2+}$ . Sin embargo, se debe considerar un mayor volumen de datos a nivel transcriptómico, para comprender apropiadamente el contexto global de la respuesta genética de los materiales objeto de estudio, frente al estrés por cadmio (Osorio, 2021)

### **6.3 Respuesta fisiológica del cacao al Cd**

En los materiales evaluados, se identificaron patrones diferenciales en la respuesta fisiológica ante el estrés por cadmio. Uno de los parámetros más relevantes fue la fotosíntesis neta, entendida como la capacidad de fijación de carbono por unidad de área y tiempo. En este caso, se presentó una disminución en todos los materiales desde una condición inicial sin cadmio, hasta las 72 horas de exposición. Esta disminución, se debe a los daños producidos en el fotosistema por las altas concentraciones de Cd, puesto que se ha determinado que en algunos materiales de cacao como la progenie A2, la concentración del metal es inversamente proporcional a la tasa fotosintética y biomasa (Álvarez, 2023). Adicionalmente, se determinó que el material TCS01 presenta una mayor tolerancia al cadmio que

IMC67 y FEC2, determinada por una disminución progresiva de la fotosíntesis en lugar de un cambio abrupto respectivamente.

En cuanto a la conductancia estomática y transpiración, los materiales se comportaron de forma sinuosa, es decir, presentaron picos y valles indicando la activación de mecanismos de regulación fisiológica. Según (Álvarez, 2023), una reducción en la transpiración y conductancia estomática, dan lugar a procesos regulatorios en la entrada y translocación del cadmio en los tejidos de la planta de cacao. Así mismo, se ha demostrado en otras especies, como la fresa (*Fragaria \* Ananassa Duch*), que el cadmio tiene un efecto regulatorio en la apertura estomática que a su vez ocasiona reducciones en la toma de CO<sub>2</sub> disminuyendo la tasa fotosintética (Martínez, 2014).

Por otra parte, el carbono intercelular incrementó en todos los materiales posterior a la exposición al cadmio, presentando una ligera disminución entre las 48 y 72 horas para todos los materiales. Esto puede estar relacionado con alteraciones en la actividad enzimática de *RUBISCO* dado que se ha demostrado, que los iones libres de cadmio (Cd<sup>2+</sup>) sustituyen al magnesio (Mg) que es un cofactor en la reacción de carboxilación, generando interacciones con los grupos tiol de la proteína (Fernández, 2022).

Además, se encontraron diferencias significativas en el uso eficiente del agua intrínseco (UEAi), indicando que el material TCS01 fue el que obtuvo la media más alta, seguido del material FEC2 y finalmente IMC67. Esto se puede relacionar con los resultados obtenidos por (Fernández, 2022), en donde obtuvo una reducción significativa (40,6%) en el UEAi, para el portainjerto PA121, previo a la injertación, lo que indica que la capacidad de absorción de cadmio está dada en mayor medida por el sistema radicular, más que el aéreo o copa. En el caso de los materiales evaluados, todos presentan un decrecimiento para las 72 horas después de la exposición al cadmio, lo que indica una constricción cada vez mayor en los estomas y por ende, una menor captación de CO<sub>2</sub> que causa la pérdida de biomasa. La marcada diferencia del material TCS01 en el UEAi, se confirma con los valores del índice de correlación de Spearman, que indica una correlación negativa débil entre los contenidos de cadmio foliar y la  $P_N$ , pero una correlación negativa fuerte entre la primera y la  $E$ . lo cual puede dar cuenta de una respuesta fisiológica que otorga una protección temporal del aparato fotosintético mediante la disminución rápida de la transpiración y mecanismos de respuesta genética desconocidos (Álvarez, 2023).

Un factor para considerar, que permite interpretar los mecanismos de tolerancia del cacao al estrés por cadmio es el estado de desarrollo de la planta, ya que se ha determinado que las plantas adultas poseen mejores mecanismos de detoxificación y exclusión de metales pesados, aunque la demanda en kg/ha en un cultivo de elementos menores como el hierro y manganeso sean mayores (Meter et al., 2019).

## 6.5 Análisis de componentes principales y correlación de Spearman

Los resultados del experimento demostraron que las variedades de cacao IMC67, FEC2 y TCS01 manifiestan diferentes respuestas a una concentración de Cd de 0,436mmol/L (4,9 mg/L). La variable que tiene más correlaciones fuertes negativas en todos los materiales fue el contenido de Cd en lámina foliar. Dicho resultado concuerda con lo descrito por Millán & colaboradores (2022), donde, en evaluaciones hechas en pimiento y brócoli, determinaron que el efecto tóxico del cadmio en la planta del pimiento fue mayor en tejido foliar que en el radicular, sin embargo, en dichas especies el cadmio se concentra en una mayor proporción en raíces respecto a las hojas, mientras que en variedades de cacao como IMC67, se ha evidenciado una mayor proporción en las hojas que en raíces, lo que puede incrementar dicho efecto tóxico en la especie (Fernández, 2022).

Así mismo, al considerar las interacciones independientes de los contenidos de cadmio en hoja con las demás variables, se determinó que la correlación negativa fuerte entre esta y la fotosíntesis neta, puede estar relacionada con el efecto degradativo en el aparato fotosintético dado por los radicales libres de oxígeno generados por cadmio. Dicha correlación negativa también fue descrita por Martínez (2014)Martínez (2014)Martínez (2014)Martínez (2014) en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa Duch.*) donde indicó que otro factor influyente en la disminución de las tasas fotosintéticas fue la correspondiente disminución de la conductancia estomática. Sin embargo, dicho patrón se mantuvo en los materiales IMC67 y FEC2 mientras que en TCS01 fue una correlación positiva fuerte, lo que indicaría un mecanismo de tolerancia fisiológico de este material al estrés por cadmio.

Por otra parte Fernández (2022)Fernández (2022)Fernández (2022)Fernández (2022) quien realizó estudios de la respuesta fisiológica de portainjertos (IMC67 y PA121), corrobora la correlación negativa entre contenidos de cadmio en tejidos foliares y la tasa fotosintética, indicando además una relación inversamente proporcional entre la concentración de cadmio y el UEAi. Sin embargo, en los materiales evaluados, dicha correlación negativa entre los contenidos de cadmio foliar y UEAi o bien no se presentó (TCS01) o exhibió una correlación positiva fuerte entre ambas (FEC2 e IMC67). Esto puede deberse a que en el experimento se trabajó con un sustrato enriquecido con 7,49 ppm de CdCl<sub>2</sub>, mientras que en el presente estudio se aplicaron 8ppm de CdCl<sub>2</sub> en solución hidropónica (4,9 ppm de Cd), por lo que la absorción del catión divalente se dio con una mayor eficiencia en este último, alterando los patrones de respuesta.

## 6.5 Implicaciones prácticas de los resultados en el campo de las ciencias biológicas

La confirmación de la función del gen NRAMP5 en las 2 variedades nacionales estudiadas (FEC2 y TCS01) y su proporción de expresión relativa, fundamentan las bases para la ejecución de posteriores estudios, al proveer una fuente primaria de información sobre la respuesta genética de estas variedades frente a 5 ppm de

cadmio molecular. Por otra parte, la estandarización de los procedimientos como: extracción de ácidos nucleicos, estandarización de primers, PCR de punto final y el establecimiento del sistema hidropónico; aportan información novedosa y procedimientos reproducibles que ahorrarán tiempo y recursos en futuros estudios.

Adicionalmente, el descubrimiento de una variedad de cacao tolerante al cadmio como TCS01, permitirá diseñar nuevas prácticas de injertación y establecimiento de cultivos, que permitan seleccionar mejores materiales portainjerto, resistentes a enfermedades y que absorban bajas cantidades de cadmio.

En cuanto al conocimiento de la respuesta genética del cacao frente al estrés por cadmio, el presente estudio revela importantes premisas mediante el método semicuantitativo de densitometría, por lo tanto, en próximas investigaciones en donde se apliquen técnicas como la secuenciación del ADN y PCR en tiempo real, se puede llegar a definir claramente la conformación estructural del gen en las tres variedades y como esta afecta el plegamiento de la proteína y su función.

## 7. CONCLUSIONES

El cadmio genera una subexpresión del gen *NRAMP5* en los tres materiales de cacao evaluados, bajo condiciones de deficiencia de elementos menores.

Una menor expresión relativa en el material TCS01 respecto a FEC2 e IMC67, puede indicar una mayor tolerancia al estrés por cadmio de este material (menor cantidad de copias de ARNm).

La exposición de las plantas de cacao a 5 ppm de cadmio molecular da lugar a efectos tóxicos sobre el aparato fotosintético y por consecuencia en la fotosíntesis neta, transpiración y conductancia estomática.

El material IMC67 demostró ser el mayor acumulador de cadmio en tejido foliar entre los tres materiales evaluados, dicho resultado revela la importancia del uso de nuevos materiales para patronaje en el cultivo de cacao.

El material TCS01 se puede considerar como promisorio para su uso como portainjerto en el establecimiento de nuevos cultivos, aunque debe considerarse su resistencia a enfermedades y compatibilidad con otros materiales.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un análisis cuantitativo de qPCR para aumentar la representatividad e impacto de los resultados, utilizando las muestras previamente seleccionadas por medio de la confirmación por PCR de punto final.

Se sugiere utilizar clones de una sola planta como unidad experimental, o controlar la polinización por autofecundación, puesto que la variabilidad genética dada por la obtención de plántulas a partir de semillas genera ruido en los resultados.

Se recomienda analizar la respuesta de los materiales frente a distintas concentraciones de cadmio, puesto que se han demostrado correlaciones negativas fuertes en concentraciones superiores a 60 ppm en suelo enriquecido. Por lo tanto, es relevante evaluar qué proporción de cadmio en solución es equivalente a dicho valor.

Adicionalmente, se sugiere evaluar la expresión del gen *NRAMP5* durante un día adicional, puesto que la tendencia de los materiales entre el tiempo 2 (48 h) y tiempo 3 (72) indicó un punto de inflexión, por lo que las conclusiones sobre la influencia de la expresión del gen en la absorción de cadmio podrían ser diferentes entre materiales.

Se recomienda hacer un análisis químico de la solución nutritiva al inicio y final del experimento (posterior a disolver el cadmio), con la intención de identificar la cantidad de cadmio absorbido durante la ejecución de este.

Se sugiere secuenciar el gen *NRAMP5* en materiales tolerantes y susceptibles al estrés por cadmio, con la finalidad de identificar diferencias en la secuencia (deleciones parciales o completas en los exones 10, 11 y 12) que puedan dar cuenta de los alelos implicados en la herencia de dichos atributos.

Se recomienda realizar un análisis a nivel de transcriptómica para identificar copias de ARNm, correspondientes a genes desconocidos que estén involucrados en la absorción radicular de cadmio y la respuesta al estrés causado por el metal.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, N. (2022). *Identificación de insectos polinizadores en el cultivo de cacao, en la plantación Luker agrícola ubicada en Villanueva Casanare* [Pregrado]. Universidad\_de\_los\_llanos.
- Álvarez, A. (2023). *Respuesta fisiológica y acumulación de cadmio en cacao (Theobroma cacao L.) bajo déficit hídrico* [Pregrado]. Unoversidad\_Nacional\_de\_Colombia.
- Alvarez Morales, E. L., Guillin Llanos, X. M., & Rodríguez Angulo, D. E. (2021). ANÁLISIS DE LOS EFECTOS QUE PRODUCE LA PRESENCIA DEL CADMIO EN EL CULTIVO DE CACAO (theobroma cacao). *Ingeniería e Innovación*, 9(2). <https://doi.org/10.21897/23460466.2723>
- Ambion. (2012). *PureLink® Plant RNA Reagent* (Patent 12322–012).
- Antolinez Sandoval, E. Y., Almanza Merchán, P. J., Barona Rodriguez, A. F., Polanco Díaz, E., & Serrano Cely, P. A. (2020). Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y Agricultura*, 17(2), 1–11. <https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n2.2020.10729>
- Asif, S., Khan, M., Waqar Arshad, M., & Shabbir, M. I. (2021). PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. *Research in Molecular Medicine*, 9(2), 81–102. <https://doi.org/10.32598/rmm.9.2.1189.1>
- Atiencina, F., & Córdova, V. (2024). *Determinación de la compatibilidad y habilidad combinatoria de cacao (Theobroma cacao L) clon bola, mediante la polinización artificial en la localidad mata de cacao* [Profesional]. Unoversidad\_Estatal\_de\_Bolivar.
- Azzi, V. S., Kanso, A., Kobeissi, A., Kazpard, V., Lartiges, B., & Samrani, A. El. (2015). Effect of Cadmium on Lactuca sativa Grown in Hydroponic Culture Enriched with Phosphate Fertilizer. *Journal of Environmental Protection*, 06(12), 1337–1346. <https://doi.org/10.4236/jep.2015.612116>
- Barboza-Fallas, L., Guillen-Watson, R., Rivas-Solano, O., & Peraza-Moraga, J. (2019). Optimización de temperatura de anillamiento de PCR multiplex para la detección de Listeria monocytogenes. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i5.4170>
- Barraza, F., Moore, R. E. T., Rehkämper, M., Schreck, E., Lefeuvre, G., Kreissig, K., Coles, B. J., & Maurice, L. (2019). Cadmium isotope fractionation in the soil – cacao systems of Ecuador: a pilot field study. *RSC Advances*, 9(58), 34011–34022. <https://doi.org/10.1039/C9RA05516A>

- Batista, L. (2009). *Guía Técnica de Cacao en la República Dominicana*. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal CEDAF.
- Bolaño, J., & Coronado, S. (2023). *Diseño de un sistema de monitoreo con IOT para controlar parámetros físico-químicos en un invernadero para cultivos hidropónicos ubicado en el corregimiento de tigrera en el distrito de Santa Marta* [Pregrado]. Universidad\_Cooperativa\_de\_Colombia.
- Cáceres, M. (2023). *EVALUACIÓN DE CALIDAD FÍSICOQUÍMICA Y ORGANOLÉPTICA DE CACAO (Theobroma cacao L.) PROVENIENTE DEL MUNICIPIO DE SAN PABLO DE BORBUR (BOYACÁ)* [Tesis de pregrado]. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Castellanos, J. (2016, February 12). *Manejo y Corrección de la Acidez de los Suelos*. Hojas Técnicas de Fertilab.  
<https://www.intagri.com/articulos/suelos/manejo-y-correccion-de-acidez-de-suelo>
- Castillo, Y. (2019). *Identificación de virus en camote (Ipomoea batatas (L.) Lam.) y tomate (Solanum lycopersicum L.) empleando la técnica de PCR* [Licenciatura]. Escuela\_Agrícola\_Panamericana\_Zamorano\_Honduras.
- Cedeño, W. (2020). *REMOCIÓN DE CADMIO EN ALMENDRAS DE CACAO EN PROCESO POSCOSECHA CON AGENTES QUELANTES, MEDIOS ÁCIDOS, LAVADO Y PRESECADO* [Tesis de maestría]. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ.
- Chancay Alcívar, L. F., Delgado Demera, M., & Salas Macías, C. A. (2022). Cadmio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus efectos ambientales. *La Técnica: Revista de Las Agrociencias*. ISSN 2477-8982, 91.  
[https://doi.org/10.33936/la\\_tecnica.v0i0.4324](https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i0.4324)
- Charrupi, N., & Martínez, D. (2017). Estudio ambiental del cadmio y su relación con suelos destinados al cultivo de cacao en los departamentos de Arauca y Nariño. *Ciencia Unisalle*, 132.
- Charry, A., Perea, C., & Vélez, A. (2022). *Impactos en la cadena de valor del cacao en Colombia como consecuencia del Reglamento (UE) No. 488/2014*.
- Chaudri, A. M., Zhao, F. J., McGrath, S. P., & Crosland, A. R. (1995). The Cadmium Content of British Wheat Grain. *Journal of Environmental Quality*, 24(5), 850–855. <https://doi.org/10.2134/jeq1995.00472425002400050008x>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., & Baligar, V. C. (2016). Chemical speciation of cadmium: An approach to evaluate plant-available cadmium in Ecuadorian soils under cacao production. *Chemosphere*, 150, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.013>

- Chouhan, S., Verma, S. C., & Thakur, M. (2017). *Effect of Cadmium on Biology of Tobacco Caterpillar Spodoptera litura Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) Nature Environment and Pollution Technology An International Quarterly Scientific Journal Open Access*. 16, 883–888. [www.neptjournal.com](http://www.neptjournal.com)
- Colombia trade. (2020, June 25). *El cacao en Colombia está presente en sus departamentos*. <https://www.colombiatrade.com.co/noticias/el-cacao-en-colombia-esta-presente-en-sus-departamentos>
- Compañía, N. de C. (2021). *Modelo productivo para el cultivo de cacao , Origen, Botánica y Generalidades* (1st ed., Vol. 1). Área de compras y fomento agrícola.
- Coninx, L., Martinova, V., & Rineau, F. (2017). Micorriza- asistida fitorremediación. *Advances Un Botanical Research*, 83.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. (2024). *Corpoica TCS-01*. 1. <https://www.agrosavia.co/productos-y-servicios/oferta-tecnol%C3%B3gica/l%C3%ADnea-agr%C3%ADcola/cacao/material-reproductivo/337-corpoica-tcs-01>
- Davodpour, R., Sobhanardakani, S., Cheraghi, M., Abdi, N., & Lorestani, B. (2019). Honeybees (*Apis mellifera* L.) as a Potential Bioindicator for Detection of Toxic and Essential Elements in the Environment (Case Study: Markazi Province, Iran). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(3), 344–358. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00634-9>
- De la fuente, A., Romero, D., Cárdenas, O., & Álvarez, M. (2018). Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR). *Revista\_Con-Ciencia\_Nº1*, 6, 107–124.
- Dorado, G. (2019). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). In *Sesiones1y2PCR* (1st ed., Vol. 1, pp. 1–18).
- Dostert, N., Roque, J., & Weigend, M. (2011). Factsheet: Datos Botánicos Sobre el Cacao. *Botconsult GmbH*, 8(19), 1–17.
- Durango, W., Caicedo, M., Sanchez, V., & Vaca, J. (2019). *La Cadena de Valor del Cacao en América Latina y el Caribe* (1st ed., Vol. 1).
- ECOYUMA. (2024, May 7). *Plántula de cacao FEC 2*. Plántulas de Cacao Con Injertado Regional. [https://www.google.com/search?q=requiremientos+clim%C3%A1ticos+para+cacao+FEC+2&rlz=1C1CHWL\\_enCO1097CO1097&oq=requiremientos+clim%C3%A1ticos+para+cacao++FEC+2&gs\\_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOTIKCAEQABiABBiiBDIKCAIQABiABBiiBNIBCTEyNjA5ajBqN6gCALACAA&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=requiremientos+clim%C3%A1ticos+para+cacao+FEC+2&rlz=1C1CHWL_enCO1097CO1097&oq=requiremientos+clim%C3%A1ticos+para+cacao++FEC+2&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOTIKCAEQABiABBiiBDIKCAIQABiABBiiBNIBCTEyNjA5ajBqN6gCALACAA&sourceid=chrome&ie=UTF-8)

- Erazo Solórzano, C. Y., Bravo Franco, K. J., Tuárez García, D. A., Fernández Escobar, Á. O., Torres Navarrete, Y. G., & Vera Chang, J. F. (2021). Efecto de la fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.), variedad nacional y trinitario, en cajas de maderas no convencionales sobre la calidad física y sensorial del licor de cacao. *Revista de Investigación Talentos*, 8(2), 42–55. <https://doi.org/10.33789/talentos.8.2.153>
- Federación Nacional de Cacaoteros. (2022, February 11). *La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico*. <https://www.fedecacao.com.co/post/la-produccion-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-record-historico> .
- Feria Internacional de Cafe, C. y A. (2023). *El Huila Cacaotero*. <https://ficca.co/el-huila-es-cacao/>.
- Fernández, J. (2022). *Efecto fisiológico de la absorción de cadmio (Cd<sup>2+</sup>) sobre accesiones de cacao (Theobroma cacao L.)* [Maestría en Ciencias Agrarias]. Universidad Nacional de Colombia.
- Fernández-Paz, J., Cortés, A. J., Hernández-Varela, C. A., Mejía-de-Tafur, M. S., Rodríguez-Medina, C., & Baligar, V. C. (2021). Rootstock-Mediated Genetic Variance in Cadmium Uptake by Juvenile Cacao (*Theobroma cacao* L.) Genotypes, and Its Effect on Growth and Physiology. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.777842>
- Ferrero, R. (2019, August 17). *¿Cómo validar tu modelo de regresión? 1*. <https://www.maximaformacion.es/blog-dat/como-validar-tu-modelo-de-regresion/>
- Figueiredo, G. S. F., Melo, C. A. F., Souza, M. M., Araújo, I. S., Zaidan, H. A., Pires, J. L., & Ahnert, D. (2013). Karyotype variation in cultivars and spontaneous cocoa mutants (*Theobroma cacao* L.). *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 4667–4677. <https://doi.org/10.4238/2013.October.18.5>
- Florida Rofner, N. (2021). Revisión sobre límites máximos de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L.). *La Granja*, 34(2), 117–130. <https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.08>
- Food and agriculture organization of the united nations (FAO). (2020, May). *Global Forest Resources Assessment*. 1. <https://www.fao.org/3/ca9825en/ca9825en.pdf>
- França, A., Freitas, A. I., Henriques, A. F., & Cerca, N. (2012). Optimizing a qPCR Gene Expression Quantification Assay for *S. epidermidis* Biofilms: A Comparison between Commercial Kits and a Customized Protocol. *PLoS ONE*, 7(5), e37480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037480>

- Gallego, A. M., Rojas, L. F., Parra, O., Rodriguez, H. A., Mazo Rivas, J. C., Urrea, A. I., Atehortúa, L., Fister, A. S., Guiltinan, M. J., Maximova, S. N., & Pabón-Mora, N. (2018). Transcriptomic analyses of cacao cell suspensions in light and dark provide target genes for controlled flavonoid production. *Scientific Reports*, 8(1), 13575. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31965-7>
- Gao, H., Xie, W., Yang, C., Xu, J., Li, J., Wang, H., Chen, X., & Huang, C. (2018). NRAMP2, a trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for *Arabidopsis* root growth under manganese deficiency. *New Phytologist*, 217(1), 179–193. <https://doi.org/10.1111/nph.14783>
- Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología*, 31, 138–143.
- García, A., Pico, B., & Jaimez, R. (2021). La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *NOVASINERGIA REVISTA DIGITAL DE CIENCIA, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA*, 4(2), 152–172. <https://doi.org/10.37135/ns.01.08.10>
- Gonzales, D., & Zapata, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 82, 53–61.
- Guarín, D., Martín-López, J. M., Libohova, Z., Benavides-Bolaños, J., Maximova, S. N., Guiltinan, M. J., Spargo, J., da Silva, M., Fernandez, A., & Drohan, P. (2024). Accumulation of cadmium in soils, litter and leaves in cacao farms in the North Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Geoderma Regional*, 36, e00762. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2024.e00762>
- Gutiérrez, G., Montes, I., Suárez, J., & Butler, C. (2023). *Local knowledge in cocoa (Theobroma cacao L.) crop management: contributions to the design of training processes for rural producers in Colombia* [Pregrado]. Universidad de la Amazonía.
- Hassanin, A. A., Eldomiaty, A. S., Ujjan, J. A., Al-Mushhin, A. A. M., Alrashidi, A. A., Saad, A. M., Sakit ALHaithloul, H. A., El-Saadony, M. T., Awad, M. F., & Sitohy, M. Z. (2022). Assessment of the R2R3 MYB gene expression profile during tomato fruit development using in silico analysis, quantitative and semi-quantitative RT-PCR. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.021>
- Haz - Map -Ingeniero IT. (2024, March 5). *Poletilen glicol mono(octilofenilo) éter*. 1. <https://haz-map.com/Agents/6753>

- Helm, E. (2021). *Purification of Rpl-135* [Maestría]. Louisiana\_State\_University.
- Hoogerwerf, E. (2020). *Role of genotype on cadmium content of colombian cacao beans*. Universidad de Gante.
- Huaraca-Fernandez, J. N., Pérez-Sosa, L., Bustinza-Cabala, L. S., & Pampa-Quispe, N. B. (2020). Enmiendas orgánicas en la inmovilización de cadmio en suelos agrícolas contaminados: una revisión. *Información Tecnológica*, 31(4), 139–152. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000400139>
- International Cocoa Organization (ICCO). (2023, February). *Monthly Review of the Market*. Events & Documentation. <https://www.icco.org/icco-documentation/cocoa-market-review/>
- InterPro. (2024, March 19). *InterProScan Search Result*. <https://www.ebi.ac.uk:443/interpro//result/InterProScan/iprscan5-R20240319-151307-0224-191134-p1m/>
- INVIMA. (2017). *Programa nacional de vigilancia y control de cadmio en productos derivados del cacao (licor del cacao, chocolate de mesa, cacao en polvo y chocolatina de leche)*.
- INVIMA. (2021). *Plan nacional de vigilancia de cadmio en cacao y productos derivados, (cacao, chocolate de mesa, cobertura de chocolate/ chocolatina de leche) año 2021*.
- Jiménez, Claudia. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción+limpia*, 1(1), 84–104.
- Kazemi-Dinan, A., Thomaschky, S., Stein, R. J., Krämer, U., & Müller, C. (2014). Zinc and cadmium hyperaccumulation act as deterrents towards specialist herbivores and impede the performance of a generalist herbivore. *New Phytologist*, 202(2), 628–639. <https://doi.org/10.1111/nph.12663>
- Kelmansky, D. (2006). Fold change. In Dpto. de matemática (Ed.), *Análisis Exploratorio y Confirmatorio de Datos de Experimentos de Microarrays* (4th ed., Vol. 1, pp. 124–129). Instituto\_de\_cálculo.
- Kimura, Y., & Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*, 147(6), 793–798. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq044>
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Kozicka, M., Tacconi, F., Horna, D., & Gotor, E. (2018). Forecasting Cocoa Yields for 2050. *Biodiversity International*, 1–58.

- Llatance, W. O., Gonza Saavedra, C. J., Guzmán Castillo, W., & Pariente Mondragón, E. (2018). Bioacumulación de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad Nativa de Pakun, Perú. *Revista Forestal Del Perú*, 33(1), 63. <https://doi.org/10.21704/rfp.v33i1.1156>
- López, N., Duarte, J., & Posso, J. (2021, February 13). Cacao criollo: su importancia para la gastronomía, el turismo, cambio climático y algunas preparaciones a base de sus residuos. *Num. 13 (7)*, 17–40.
- Manqueros, V. E. (2015). Mediciones Nutritivas En Un Sistema Hidropónico NFT Mediante El Uso De Sensores De Iones Selectivos Y LabVIEW. *1er Congreso Internacional de Ciencias de La Ingeniería*, 1, 1–7.
- Maroto, S., Montoya, P., Gonzales, D., Delgado, T., & Arvelo, M. (2017). *Manual Técnico para el Cultivo de Cacao, Prácticas Latinoamericanas*.
- Martínez, R. (2014). *Caracterización de parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de fresa (Fragaria x ananassa Duch.) variedad Albión, sometidas a diferentes concentraciones de Cadmio* [Maestría]. Universidad\_Nacional\_de\_Colombia.
- Mendoza-Escalona, B., Torres-Rodríguez, D., Merú Marcó, L., Gómez, C., Estanga-Barrios, M., & García-Orellana, Y. (2021). Concentración de metales pesados en suelos agrícolas bajo diferentes sistemas de labranza. *Tecnológicas*, 24(51), e1738. <https://doi.org/10.22430/22565337.1738>
- Mendoza-López, K. L., Mostacero-León, J., López-Medina, S. E., Efraín Gil-Rivero, A., De La Cruz-Castillo, A. J., & Villena-Zapata, L. (2021a). Cadmium in *Theobroma cacao* L. “cacao” plantations in the San Martin region (Lamas), Peru. *Manglar*, 18(2), 169–173. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.022>
- Mendoza-López, K. L., Mostacero-León, J., López-Medina, S. E., Efraín Gil-Rivero, A., De La Cruz-Castillo, A. J., & Villena-Zapata, L. (2021b). Cadmium in *Theobroma cacao* L. “cacao” plantations in the San Martin region (Lamas), Peru. *Manglar*, 18(2), 169–173. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.022>
- Meter, A., Atkinson, R., & Laliberte, B. (2019). Cadmium in cacao from Latin America an the Caribbean - A review of research an potential mitigation solutions. *Latin\_American\_Cocoa\_Initiative*, 3, 1–78.
- Meter, A., & Laliberte, B. (2019). *Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe - Análisis de la investigación y soluciones potenciales para la mitigación*.
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., & Bermúdez-Guzmán, M. de J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), 1259–1267. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788>

- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (202 C.E., March). *Cadena de cacao - Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales*.  
<https://Sioc.Minagricultura.Gov.Co/Cacao/Documentos/2020-03-31%20Cifras%20Sectoriales.Pdf>.
- Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación. (2017, August 22). *Los beneficios del cacao colombiano*. [https://Minciencias.Gov.Co/Sala\\_de\\_prensa/Los-Beneficios-Del-Cacao-Colombiano](https://Minciencias.Gov.Co/Sala_de_prensa/Los-Beneficios-Del-Cacao-Colombiano).
- Moncayo, D., Proaño, F., Garrido, A., & Barrera, M. (2023). Ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBRGreen para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina. *Revista de salud animal*, 45(05), 1–7.
- Montero, S. (2016). *Efecto del estrés crónico sobre el linfoma Murino L5178Y-R [Maestría]*. Universidad\_Autónoma\_de\_Nuevo\_León.
- Montero-Campos, V., Huang-Qiu, Y. Y., & Rodríguez-Sevilla, H. (2024). Agentes químicos que dañan al ADN: inducción de genotoxicidad en la vida diaria, riesgo y prevención. *Revista Tecnología En Marcha*.  
<https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7622>
- Moore, R. E. T., Ullah, I., de Oliveira, V. H., Hammond, S. J., Strekopytov, S., Tibbett, M., Dunwell, J. M., & Rehkämper, M. (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. *Horticulture Research*, 7(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0292-6>
- Morillo, E., Buitron, J., & Quiroz-Vera, J. (2023). Evaluación de la expresión genética de Linalool en genotipos de cacao nacional altamente homocigóticos proveniente de las principales zonas cacaoteras tradicionales del Ecuador. *Bionatura*, 8(2), 1–6. <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.20>
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10), e3311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Mubarak, S., Al-koofee, D., Radhi, O., Mohammed, J., & Al-Zubaidi, Z. (2020). An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. *Journal\_in\_the\_field\_of\_farma*, 11(2), 427–436.
- National Center of Biotechnology Information - NCBI. (2016, September 11). *PREDICTED: Theobroma cacao metal transporter Nramp3 (LOC18611230), mRNA*.
- NCBI. (2023, November 9). *LOC18592385 metal transporter Nramp5 [ Theobroma cacao (cacao) ]*.

- Nguyen, N. T., McInturf, S. A., & Mendoza-Cózatl, D. G. (2016). Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements. *Journal of Visualized Experiments*, 113. <https://doi.org/10.3791/54317>
- Norman, O., Koivunen, J., Mäki, J. M., Pihlajaniemi, T., & Heikkinen, A. (2022). Identification of suitable reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in the fibrotic phase of the bleomycin mouse model of pulmonary fibrosis. *PLOS ONE*, 17(10), e0276215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276215>
- Osorio, M. (2021). *Análisis fisiológico y transcriptómico de la respuesta a déficit hídrico en cacao (Theobroma cacao L.) para la identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés* [Doctorado]. Pontificia\_Universidad\_Javeriana.
- Pacheco, D. D. R., Santana, B. C. G., Pirovani, C. P., & de Almeida, A.-A. F. (2023). Zinc/iron-regulated transporter-like protein gene family in Theobroma cacao L: Characteristics, evolution, function and 3D structure analysis. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1098401>
- Parmar, P., Kumari, N., & Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies*, 54(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-45>
- Patiño, C., & Julca, A. (2021). *Informe sobre absorción de cadmio y manejo agronómico y su validación en vivero*.
- Peñalosa Albarracín, D. F., Laiton Daza, L. J., Caballero Yáñez, D. F., Blanco Tirado, T. del S., & Acevedo Argüello, C. (2020). Estudio cuantitativo de tendencias en el aprovechamiento de los subproductos del cacao (Theobroma cacao L.). *Revista Espacio I+D Innovación Más Desarrollo*, 83–94. <https://doi.org/10.31644/IMASD.27.2021.a05>
- Pérez, E., & Azcona, M. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico - Quirúrgicas*, 17(3), 199–205.
- Perez-Millan, R., Alfosea-Simon, M., Zavala-Gonzalez, E. A., Camara-Zapata, J. M., Martinez-Nicolas, J. J., Lidon, V., Simon, I., Shahid, M. A., Garcia-Sanchez, F., & Simon-Grao, S. (2021). The Addition of Selenium to the Nutrient Solution Decreases Cadmium Toxicity in Pepper Plants Grown under Hydroponic Conditions. *Agronomy*, 11(10), 1905. <https://doi.org/10.3390/agronomy11101905>
- Pérez-Millán, R., Cámara-Zapata, J. M., Fernández-Zapata, J. C., Simón-Grao, S., Alfosea-Simón, M., Zavala-González, E. A., Shahid, M. A., & García-Sánchez, F. (2022). Application of Biocat G, Selenium, and Chitosan to Counteract the

- Negative Effects of Cd in Broccoli Plants Grown in Soilless Culture. *Agronomy*, 12(6), 1327. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061327>
- Phytozome. (2024, May 21). *Cromosoma 8, característica 1*. [https://phytozome-next.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FTcacao\\_v2\\_1&loc=Chromosome\\_8%3A6841896..6846707&tracks=UserBlastResults%2CTranscripts%2CAlt\\_Transcripts%2CPASA\\_assembly%2CBlastx\\_protein&highlight=](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FTcacao_v2_1&loc=Chromosome_8%3A6841896..6846707&tracks=UserBlastResults%2CTranscripts%2CAlt_Transcripts%2CPASA_assembly%2CBlastx_protein&highlight=)
- Pilaloo David, W., Alvarado Aguayo, A., Pérez Vaca, D., & Torres Sánchez, S. (2021). Manejo agroecológico de la Moniliasis en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) mediante la utilización de biofungicidas y podas fitosanitarias en el cantón La Troncal. *Revista Alfa*, 5(15). <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i15.129>
- Pinheiro, T. T., Litholdo Jr., C. G., Sereno, M. L., Leal Jr., G. A., Albuquerque, P. S. B., & Figueira, A. (2011). Establishing references for gene expression analyses by RT-qPCR in *Theobroma cacao* tissues. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 3291–3305. <https://doi.org/10.4238/2011.November.17.4>
- Pinzón, O., Rojas, J., Rojas, F., & Ramírez, D. (2012). *Guía Técnica para el Cultivo de Cacao* (5th ed.). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- QIAGEN. (2021). *Instrucciones de uso del QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit (manual de uso)* (Patent 61904).
- Quiñones, J., Hernández, M., Quirós, Y., Capdesuñer, Y., & Trujillo, R. (2016). Factores que controlan en contenido de fenoles en el cultivo de callos de *Theobroma cacao*. *Cultivos tropicales*, 37(especial), 118–126.
- Rebeki, A., Lon, Z., & ari, ari. (2016). Genotypic difference in cadmium effect on agronomic traits and grain zinc and iron concentration in winter wheat. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(11), 772. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-05-475>
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS: IMPLICACIONES EN SALUD, AMBIENTE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16(2). <https://doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447>
- Riaño-Castillo, E. R., Caicedo-Gegén, L., Torres-Mesa, A., & Hurtado-Giraldo, H. (2019). Cambios en los niveles de nutrientes en solución hidropónica de espinaca baby (*Spinacia oleracea* L.), para su futura aplicación en acuaponía. *Orinoquia*, 23(1), 73–84. <https://doi.org/10.22579/20112629.544>
- Ricaño Rodríguez, J., Ramos Prado, J., M., Cocolletzi Vásquez, E., & Hipólito Romero, E. (2018). EL ESTUDIO GENÓMICO DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.); BREVE RECOPIACIÓN DE SUS BASES CONCEPTUALES. *Agro Productividad*, 11(9), 29–35.

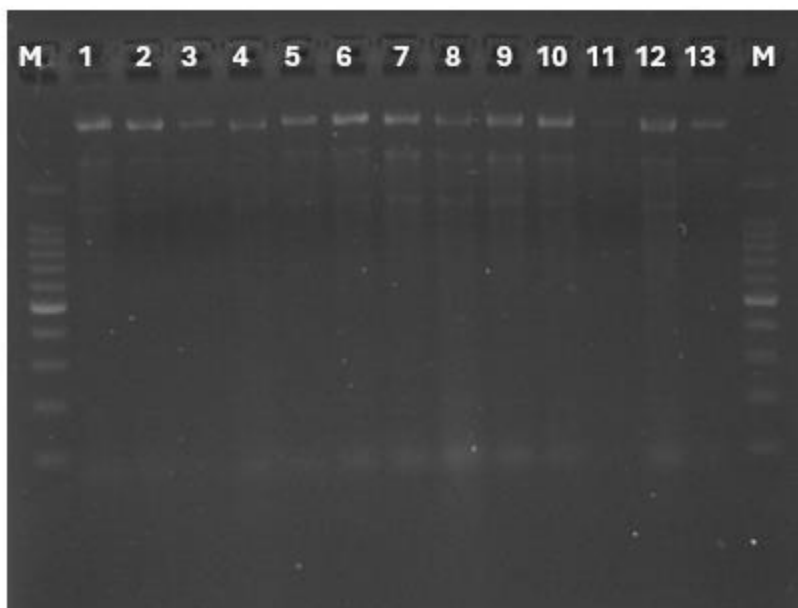
- Ricaño-Rodríguez, J., Hipólito-Romero, E., Ramos-Prado, J. M., & Cocolletzi-Vásquez, E. (2019). Genotipado por secuenciación de variedades tradicionales de *Theobroma cacao* (Malvaceae) del Estado de Tabasco, México. *Botanical Sciences*, 97(3), 381–397. <https://doi.org/10.17129/botsci.2258>
- Robles-Valdivia, M. T., & Sánchez-Otero, M. G. (2022). Familia Malvaceae: especies fundamentales en la industria agroalimentaria con potencial comercial, nutrimental y nutracéutico. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 40. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.943>
- Rodríguez, D., Escalante, C., Lara, M., & Martínez, M. (2024). La melatonina y su participación en la biosíntesis de prolina en chile habanero (*Capsicum chinense*). *HerbarioCICY*, 16, 131–134.
- Rodríguez, J., & Marín, N. (2020). Desarrollo de líneas de cacao (*Theobroma cacao* L.) editadas genéticamente que limiten la acumulación de cadmio en sus tejidos : FASE-I. *Universidad\_EAFIT*, 1, 1–32.
- Rodríguez José, Marín, N., & Villanueva, D. (2020). Desarrollo de líneas de cacao (*Theobroma cacao* L.) editadas genéticamente que limiten la acumulación de cadmio en sus tejidos : FASE-I. *Universidad EAFIT*, 1–32.
- Rodríguez, M. (2007). *Mecanismos Moleculares de Respuesta al Cadmio en Plantas de Pisum sativum L.: Función de las Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo* [Doctorado]. Unoversidad\_de\_Granada.
- Ruiz, M. (2023). *Análisis de la calidad del grano de cacao modelo araucano en tres materiales regionales FSA13, FEAR5 Y FTA2 en Saravena, Arauca*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Salazar, L. (2022). *Caracterización físico - mecánica del grano de cacao (Theobroma cacao L.) producido en Llaylla de la microcuenca del río Chalhuanayo Satipo* [Maestría en ciencias ambientales]. Universidad Nacional Agraria de Molina.
- Salvador, N., & Rojas, J. (2012). *Manual del cultivo de cacao blanco en Piura* (Vol. 1). Mesa Técnica Regional de Cacao en Piura.
- Sánchez Mora, R. M., Lozano Jiménez, Y. Y., & Ochoa Cabezas, D. C. (2024). *Regulación de la expresión génica de eucariotas: principios básicos*. Universidad de La Salle. Ediciones Unisalle. <https://doi.org/10.19052/978-628-7645-54-7>
- Sandoval, F. (2019). *Efecto de las comunidades locales de hongos formadores de micorrizas arbusculares y patrones de injertación en la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc* [Tesis de maestría en Ciencias Agrarias]. Universidad Nacional de Colombia.

- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., & Ma, J. F. (2012). Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice. *The Plant Cell*, 24(5), 2155–2167. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096925>
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., & Polle, A. (2001). Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiology*, 127(3), 887–898. <https://doi.org/10.1104/pp.010318>
- Schwarz, D. (2020). *Caracterización botánica y molecular de los árboles élite de cacao (Theobroma cacao L.-Malvaceae) de la Región de Costa Sur, Guatemala* [Profesional]. Universidad\_del\_Valle\_de\_Guatemala.
- Sisalima-Ortega, Lady, Ruilova, V., & Capa-Morocho, M. (2023). Efecto de inoculación micorrízica en la etapa productiva del cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonía ecuatoriana. *CEDAMAZ*, 13(1), 17–24. <https://doi.org/10.54753/cedamaz.v13i1.1742>
- Soto, É., & Torres, E. (2022). *Manual de buenas prácticas agrícolas para el cultivo de cacao* (1st ed., Vol. 1). Érika Soto.
- Stephens-Camacho, N. A., Rodríguez, J. A. R., Islas-Zamorano, A. P., Magaña-Gómez, J. A., & Flores-Mendoza, L. K. (2022). La sucralosa promueve la polarización a macrófagos proinflamatorios M1. *Revista Chilena de Nutrición*, 49(5), 578–587. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182022000600578>
- Sui, F.-Q., Chang, J.-D., Tang, Z., Liu, W.-J., Huang, X.-Y., & Zhao, F.-J. (2018). Nramp5 expression and functionality likely explain higher cadmium uptake in rice than in wheat and maize. *Plant and Soil*, 433(1–2), 377–389. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3849-5>
- Tang, L., Mao, B., Li, Y., Lv, Q., Zhang, L., Chen, C., He, H., Wang, W., Zeng, X., Shao, Y., Pan, Y., Hu, Y., Peng, Y., Fu, X., Li, H., Xia, S., & Zhao, B. (2017). Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*, 7(1), 14438. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14832-9>
- Thermo Fisher Scientific. (2024). *Thermo Scientific™ Seroalbúmina bovina (BSA)*. 10829410.
- Trejo, K. (2012). *Caracterización de la expresión diferencial de 6 genes de respuesta al plomo en *Salvinia minima* Baker* [Maestría]. Centro\_de\_investigación\_científica\_de\_Yucatán.
- 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(1), 14412. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y>

- Unión Europea. (2014). Reglamento (ue) no 488/2014 de la comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios . *Diario Oficial*, 138, 1–5.
- Vásquez, E. (2019). Lixiviación de metales pesados de los sedimentos de la laguna de limoncocha en agua ultrapura para determinar su movilidad con fines de conservación [Magister\_en\_gestión\_ambiental]. Universidad\_Internacional\_SEK.
- Vega gonzalez, R. J., Castro Salinas, D., Pajuelo Risco, F. M., Honorio Javes, C. E., & Hernandez-Valdez, J. E. (2024). Subproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en la alimentación animal: ¿Una alternativa viable y sostenible? *Manglar*, 21(1), 127–134. <https://doi.org/10.57188/manglar.2024.013>
- Verdugo-Fuentes, A. A., Castro Espinoza, L., Gutiérrez-Coronado, M. A., & Martínez-Carrillo, J. L. (2019). Metodologías para el análisis de expresión y cuantificación de proteínas conferidas en tejidos de cultivos GM. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 815–828. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1666>
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Villar, G., Thomas, E., Dávila, C., & Atkinson, R. (2022). *Caracterización socioeconómica de las cadenas de valor de cacao con énfasis en la problemática de cadmio en Piura y Huánuco, Perú*.
- Wiebek, N., Glawe, A., Pfohl, K., & Pawelzik, E. (2020). The effect of short-term vs. long-term soil moisture stress on the physiological response of three cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars. *Plant Growth Regulation*, 92, 295–306.
- Wiggenhauser, M., Aucour, A.-M., Bureau, S., Campillo, S., Telouk, P., Romani, M., Ma, J. F., Landrot, G., & Sarret, G. (2021). Cadmium transfer in contaminated soil-rice systems: Insights from solid-state speciation analysis and stable isotope fractionation. *Environmental Pollution*, 269, 115934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115934>
- Zamora, F. (2024). *Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de Theobroma cacao L. "cacao" del VRAEM. Ayacucho, 2023* [Pregrado]. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Zamudio, J., Peña, M., & Escovar, J. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Revista\_Especializada\_en\_ciencias\_quimico-Biológicas*, 15(2).

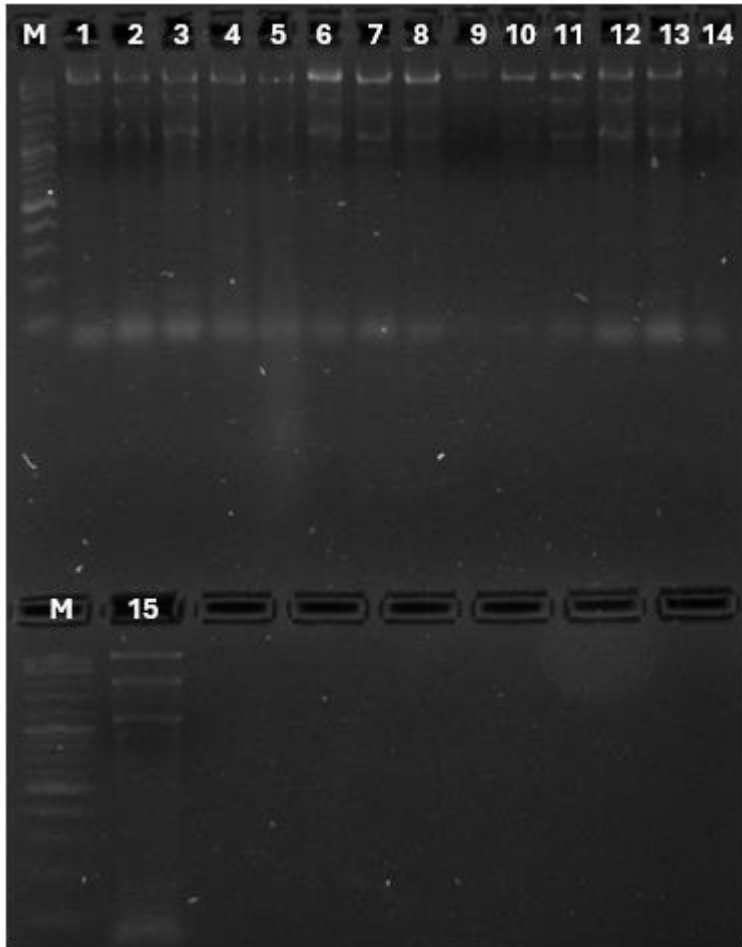
## **10. ANEXOS**

Anexo 1. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 0. Resaltadas en color verde se encuentran las muestras seleccionadas para los procedimientos posteriores



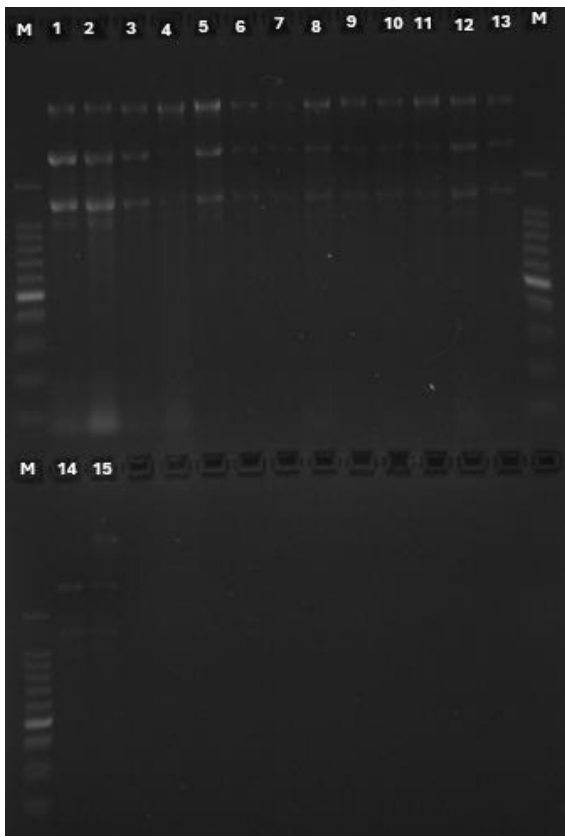
Código de muestra	Número	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
IMC67_T1_t0_R1	1	97,198	1,882	2,215
IMC67_T1_t0_R2	2	49,03	1,79	1,704
IMC67_T1_t0_R4	3	23,602	1,705	1,435
IMC67_T1_t0_R5	4	67,318	1,711	1,43
FEC2_T1_t0_R2	5	35,557	1,793	2,095
FEC2_T1_t0_R3	6	106,665	1,808	2,234
FEC2_T1_t0_R4	7	67,693	1,845	2,004
FEC2_T1_t0_R5	8	276,696	1,915	1,592
TCS01_T1_t0_R1	9	95,301	1,968	1,962
TCS01_T1_t0_R2	10	78,4	1,865	1,867
TCS01_T1_t0_R3	11	9,601	1,697	1,418
TCS01_T1_t0_R4	12	95,606	1,885	1,796
TCS01_T1_t0_R5	13	48,225	1,81	1,773

Anexo 2. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 1



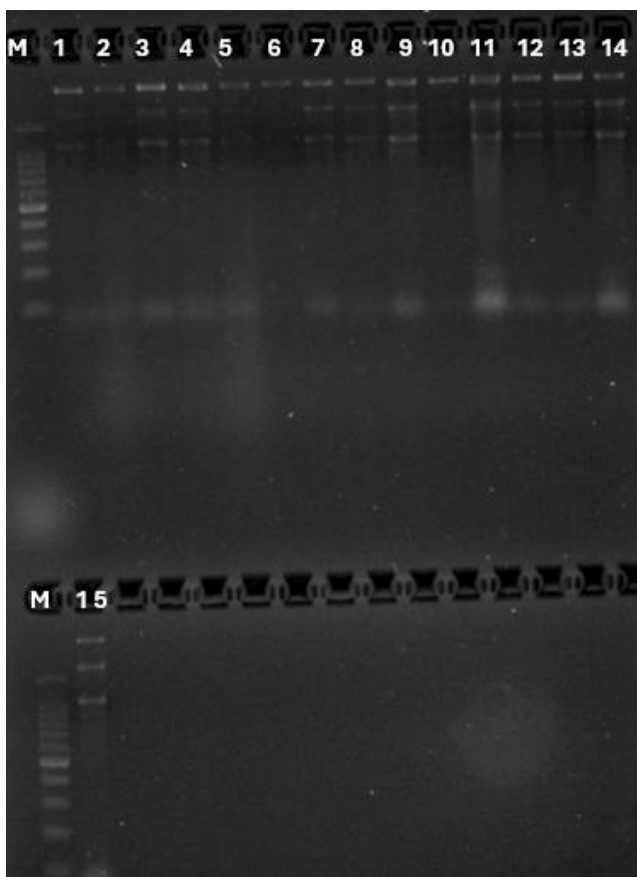
Código de muestra	Número	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
IMC67_T1_t1_R1	1	52,429	1,85	1,765
IMC67_T1_t1_R2	2	108,634	1,908	1,652
IMC67_T1_t1_R3	3	115,906	1,942	1,863
IMC67_T1_t1_R4	4	67,37	1,827	1,251
IMC67_T1_t1_R5	5	135,366	1,832	1,426
FEC2_T1_t1_R1	6	62,578	1,928	1,756
FEC2_T1_t1_R2	7	56,847	1,837	1,31
FEC2_T1_t1_R3	8	44,91	1,829	1,356
FEC2_T1_t1_R4	9	30,631	1,829	1,875
FEC2_T1_t1_R5	10	33,542	1,805	1,756
TCS01_T1_t1_R1	11	41,747	1,851	1,585
TCS01_T1_t1_R2	12	92,361	1,93	1,779
TCS01_T1_t1_R3	13	88,747	1,945	1,646
TCS01_T1_t1_R4	14	32,559	1,893	1,151
TCS01_T1_t1_R5	15	118,271	1,997	1,828

Anexo 3. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 2



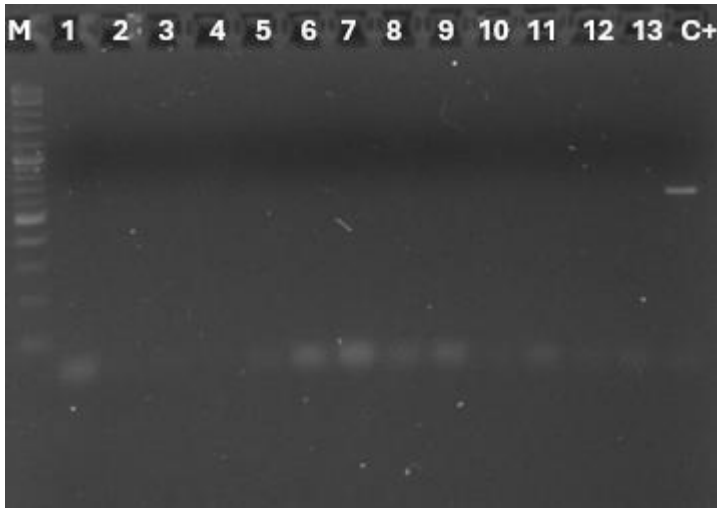
Código de muestra	Número	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
IMC67_T1_t3_R1	1	52,156	1,904	1,899
IMC67_T1_t3_R2	2	64,078	1,777	1,148
IMC67_T1_t3_R3	3	98,887	1,962	2,055
IMC67_T1_t3_R4	4	12,781	1,861	2,089
IMC67_T1_t3_R5	5	240,703	1,382	0,673
FEC2_T1_t3_R1	6	39,862	1,88	1,578
FEC2_T1_t3_R2	7	92,055	1,882	1,579
FEC2_T1_t3_R3	8	50,657	2,041	1,653
FEC2_T1_t3_R4	9	68,316	1,955	1,735
FEC2_T1_t3_R5	10	61,606	1,945	1,509
TCS01_T1_t3_R1	11	100,427	1,834	1,584
TCS01_T1_t3_R2	12	100,299	1,95	1,798
TCS01_T1_t3_R3	13	68,333	1,871	1,701
TCS01_T1_t3_R4	14	43,754	1,89	1,69
TCS01_T1_t3_R5	15	106,625	1,877	1,095

Anexo 4. Geles de calidad de ARN y cuantificación en NanoDrop One del tiempo 3

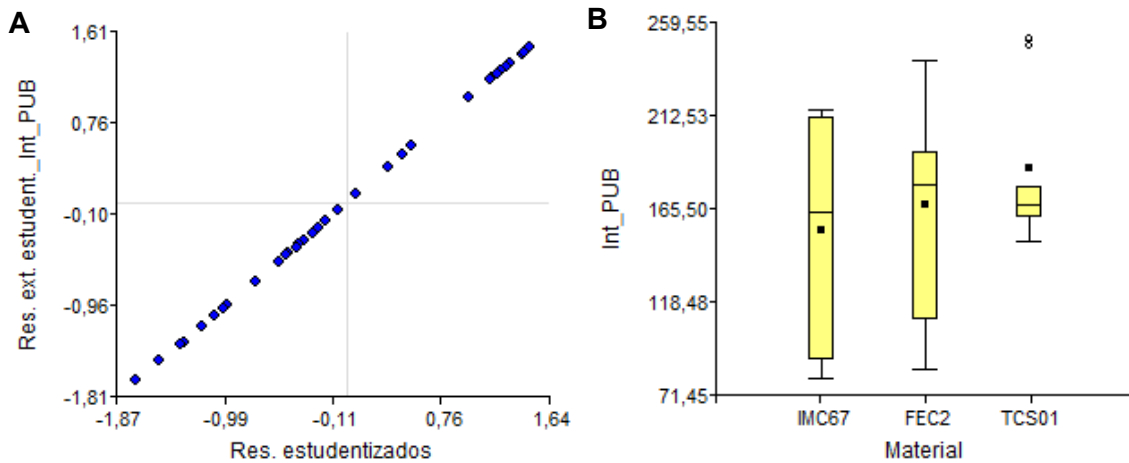


Código de muestra	Número	Concentración (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
IMC67_T1_t3_R1	1	52,156	1,904	1,899
IMC67_T1_t3_R2	2	64,078	1,777	1,148
IMC67_T1_t3_R3	3	98,887	1,962	2,055
IMC67_T1_t3_R4	4	12,781	1,861	2,089
IMC67_T1_t3_R5	5	240,703	1,382	0,673
FEC2_T1_t3_R1	6	39,862	1,88	1,578
FEC2_T1_t3_R2	7	92,055	1,882	1,579
FEC2_T1_t3_R3	8	50,657	2,041	1,653
FEC2_T1_t3_R4	9	68,316	1,955	1,735
FEC2_T1_t3_R5	10	61,606	1,945	1,509
TCS01_T1_t3_R1	11	100,427	1,834	1,584
TCS01_T1_t3_R2	12	100,299	1,95	1,798
TCS01_T1_t3_R3	13	68,333	1,871	1,701
TCS01_T1_t3_R4	14	43,754	1,89	1,69
TCS01_T1_t3_R5	15	106,625	1,877	1,095

Anexo 5. Control de digestión enzimática con Dnasas. El control positivo corresponde a una muestra de ADN de hoja de cacao con primers del gen *RUBISCO*.



Anexo 6. Gráficos para la normalización de datos de intensidad de banda para PUB. A. Gráfico de dispersión de los residuales estudentizados, B. Gráfico de cajas y bigotes para los valores de intensidad de banda del gen PUB.



Fuente: elaborado en el programa InfoStat versión 20201

Anexo 7 . Análisis de varianza Kruskal Wallis y comparación de medias para los niveles de expresión del gen NRAMP5.

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Material	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Niveles_Expresión	FEC2	3	0,89	0,19	0,91	1,87	0,4393
Niveles_Expresión	IMC67	3	0,89	0,29	0,90		
Niveles_Expresión	TCS01	3	0,66	0,08	0,63		

Material	Niveles	Expresión	n
TCS01	0,66	3 A	
IMC67	0,89	3 A	
FEC2	0,89	3 A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Fuente: elaborado en el programa InfoStat versión 20201

## Anexo 8. Diferentes pruebas de normalidad para todas las variables objeto de estudio

Normality and Lognormality Tests		A	B	C	D	E	F	G
Tabular results		Fotosíntesis neta	Conductancia estomática	Carbono intercelular	Transpiración	UEAi	Expresión R.	C. Cd Foliar
1	Test for normal distribution							
2	Anderson-Darling test							
3	A2*	0.3675	1.149	0.8140	2.551	0.5046	0.8273	0.9116
4	P value	0.4126	0.0046	0.0319	<0.0001	0.1906	0.0295	0.0158
5	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No	Yes	No	No
6	P value summary	ns	**	*	****	ns	*	*
7								
8	D'Agostino & Pearson test							
9	K2	0.04534	5.784	10.76	22.56	1.936	2.907	2.691
10	P value	0.9776	0.0555	0.0046	<0.0001	0.3799	0.2338	0.2604
11	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes
12	P value summary	ns	ns	**	****	ns	ns	ns
13								
14	Shapiro-Wilk test							
15	W	0.9699	0.9020	0.9246	0.7959	0.9580	0.9322	0.8667
16	P value	0.4223	0.0039	0.0172	<0.0001	0.1862	0.0291	0.0157
17	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No	Yes	No	No
18	P value summary	ns	**	*	****	ns	*	*

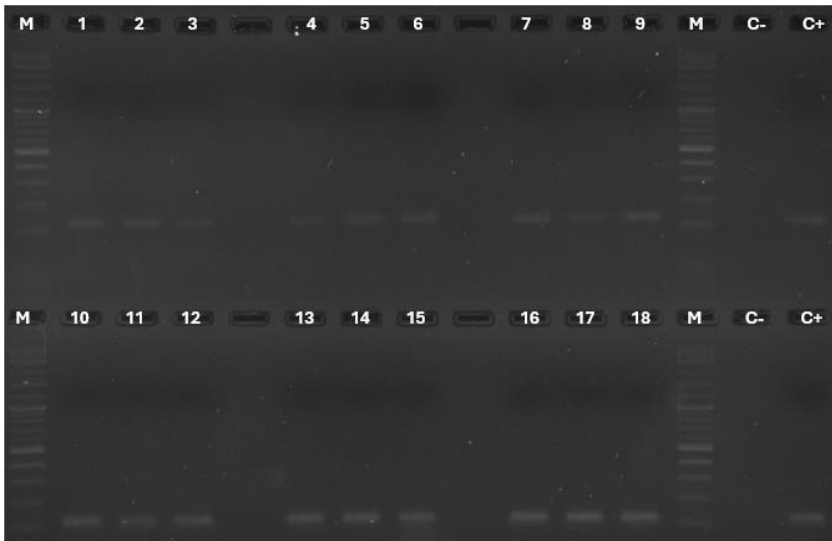
## Anexo 9. Prueba de igualdad de varianzas F

### Prueba F para igualdad de varianzas

Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	prueba
Fotosíntesis	{FEC2}	{IMC67}	12	12	2,29	0,78	2,94	0,0870	Bilateral
Fotosíntesis	{FEC2}	{TCS01}	12	12	2,29	0,25	9,00	0,0010	Bilateral
Fotosíntesis	{IMC67}	{TCS01}	12	12	0,78	0,25	3,06	0,0768	Bilateral
Conductancia estomática	{FEC2}	{IMC67}	12	12	2,0E-04	1,5E-04	1,26	0,7088	Bilateral
Conductancia estomática	{FEC2}	{TCS01}	12	12	2,0E-04	5,1E-04	0,38	0,1275	Bilateral
Conductancia estomática	{IMC67}	{TCS01}	12	12	1,5E-04	5,1E-04	0,30	0,0609	Bilateral
Carbono_intercelular	{FEC2}	{IMC67}	12	12	2500,72	1488,10	1,68	0,4026	Bilateral
Carbono_intercelular	{FEC2}	{TCS01}	12	12	2500,72	1154,37	2,17	0,2156	Bilateral
Carbono_intercelular	{IMC67}	{TCS01}	12	12	1488,10	1154,37	1,29	0,6810	Bilateral
Transpiración	{FEC2}	{IMC67}	12	12	0,30	0,02	15,34	0,0001	Bilateral
Transpiración	{FEC2}	{TCS01}	12	12	0,30	0,11	2,75	0,1080	Bilateral
Transpiración	{IMC67}	{TCS01}	12	12	0,02	0,11	0,18	0,0082	Bilateral
Uso eficiente del agua	{FEC2}	{IMC67}	12	12	0,60	0,79	0,75	0,6458	Bilateral
Uso eficiente del agua	{FEC2}	{TCS01}	12	12	0,60	1,16	0,51	0,2830	Bilateral
Uso eficiente del agua	{IMC67}	{TCS01}	12	12	0,79	1,16	0,68	0,5345	Bilateral
Expresión R.	{FEC2}	{IMC67}	12	12	0,02	0,04	0,39	0,1365	Bilateral
Expresión R.	{FEC2}	{TCS01}	12	12	0,02	0,02	0,90	0,8603	Bilateral
Expresión R.	{IMC67}	{TCS01}	12	12	0,04	0,02	2,28	0,1866	Bilateral
Cd foliar	{FEC2}	{IMC67}	6	6	0,18	0,39	0,48	0,4340	Bilateral
Cd foliar	{FEC2}	{TCS01}	6	6	0,18	0,06	3,24	0,2234	Bilateral
Cd foliar	{IMC67}	{TCS01}	6	6	0,39	0,06	6,80	0,0553	Bilateral

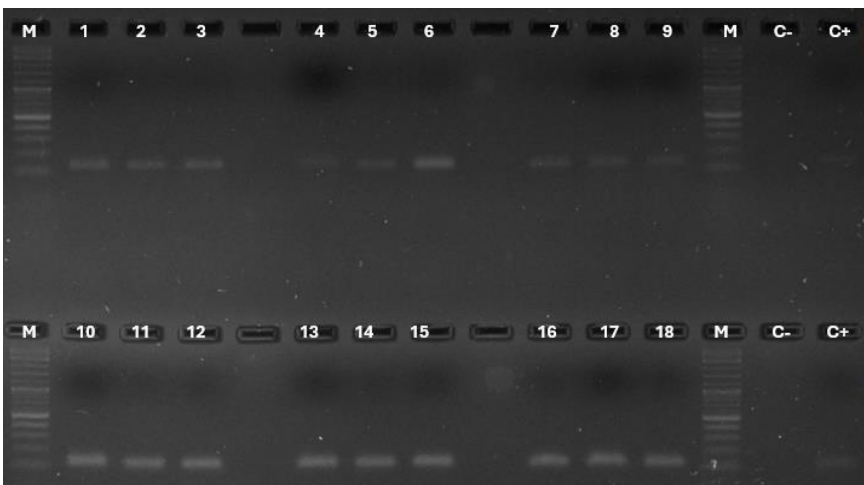
Anexo 10. Geles de PCR de punto final de los 4 tiempos evaluados en los materiales IMC67, FEC2 y TCS01

Tiempo 0 (0 horas)



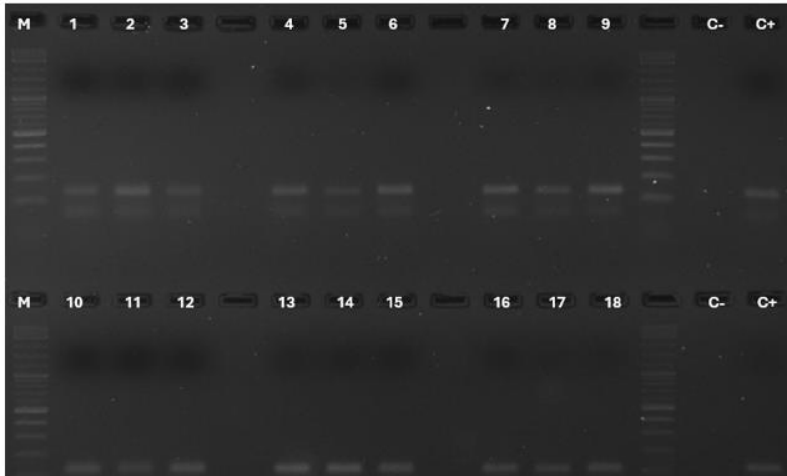
Muestra	Consecutivo TO NRAMP 5	Consecutivo TO PUB
IMC67_R1	1	10
IMC67_R2	2	11
IMC67_R3	3	12
FEC2_R1	4	13
FEC2_R2	5	14
FEC2_R3	6	15
TCS01_R1	7	16
TCS01_R2	8	17
TCS01_R3	9	18

Tiempo 1 (24 horas)



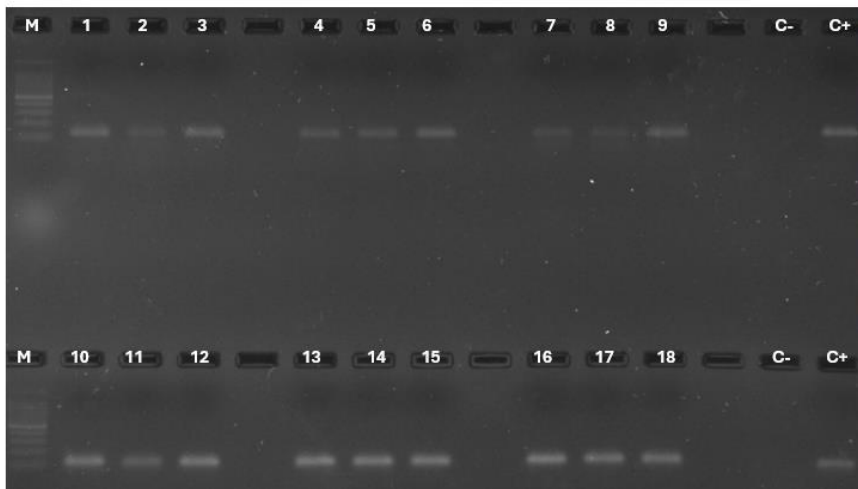
Muestra	Consecutivo T1 NRAMP 5	Consecutivo T1 PUB
IMC67_R1	1	10
IMC67_R2	2	11
IMC67_R3	3	12
FEC2_R1	4	13
FEC2_R2	5	14
FEC2_R3	6	15
TCS01_R1	7	16
TCS01_R2	8	17
TCS01_R3	9	18

Tiempo 2 (48 horas)



Muestra	Consecutivo T2 NRAMP 5	Consecutivo T2 PUB
IMC67_R1	1	10
IMC67_R2	2	11
IMC67_R3	3	12
FEC2_R1	4	13
FEC2_R2	5	14
FEC2_R3	6	15
TCS01_R1	7	16
TCS01_R2	8	17
TCS01_R3	9	18

Tiempo 3 (72 horas)



Muestra	Consecutivo T3 NRAMP 5	Consecutivo T3 PUB
IMC67_R1	1	10
IMC67_R2	2	11
IMC67_R3	3	12
FEC2_R1	4	13
FEC2_R2	5	14
FEC2_R3	6	15
TCS01_R1	7	16
TCS01_R2	8	17
TCS01_R3	9	18

Anexo 11. Prueba t y comparación de medias para contenidos de cadmio (ppm) en la lámina foliar de los 3 materiales de cacao.

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
C. Cd Foliar	18	0,62	0,44	0,40	0,84	5,97	<0,0001

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,22170

Error: 0,0452 gl: 20

Material	Medias	n	E.E.	
IMC67	0,80	8	0,08	A
FEC2	0,62	8	0,08	A B
TCS01	0,53	8	0,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )