

Bioproceso reductor de la solubilidad del Cadmio rizosférico

PRODUCTO 3.

Selección de suelos y aislamiento de micorrizas (HA) y hongos saprobios (HS)

2023



Copyright, licencias CC y Disclaimer.

Códigos JEL: Q16

ISBN:

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Todos los derechos reservados; este documento puede reproducirse libremente para fines no comerciales.

FONTAGRO es un fondo administrado por el Banco, pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Se prohíbe el uso comercial no autorizado de los documentos del Banco, y tal podría castigarse de conformidad con las políticas del Banco y/o las legislaciones aplicables. Las opiniones expresadas en esta publicación son exclusivamente de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, de su Directorio Ejecutivo ni de los países que representa.

El presente documento ha sido preparado por Godeas, A., Izaguirre, M.L., García-Romera, I., Scotti, A.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract y Palabras Clave	5
Resumen ejecutivo	6
Introducción	7
Objetivos	8
Metodología	9
Resultados	10
Discusión	20
Conclusiones	22
Referencias Bibliográficas	23

INDICE CUADROS

Cuadro 1. Lista de morfotipos de hongos arbusculares de las muestras analizadas en los suelos sin Cd (S3) y con Cd (S4) colectados en Ecuador.	Error! Bookmark not defined.
Cuadro 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos saprobios por gramo de los suelos sin Cd (S3) y con Cd (S4)	Error! Bookmark not defined.
Cuadro 3. Tasa de crecimiento (cm) de los hongos saprobios de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) en presencia de distintas concentraciones de Cd.....	19

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Altura de las plántulas de cacao nacional crecidas en suelos colectados en plantaciones orgánicas de (A) plátano (S1), y (B) limón (S2), sometidas a los tratamientos con P, melaza, y citoquininas.	Error! Bookmark not defined.
Gráfico 2. Contenido de clorofila en unidades SPAD en plántulas de cacao nacional crecidas en suelos colectados en plantaciones orgánicas de plátano (S1) (A) y limón (S2) (B), y sometidas a los tratamientos con P, melaza, y citoquininas.....	

Error! Bookmark not defined.

Gráfico 3. Diversidad de hongos arbusculares de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).....	12
Gráfico 4. Germinación y cultivo in vitro de propágulos de hongos arbusculares aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).....	13
Gráfico 5. Contenido de glomalina (fracción fácilmente extractable) presente en los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).....	13
Gráfico 6. Imagen de la diversidad fúngica de hongos saprobios de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).....	15
Gráfico 7. Fotografías de distintos hongos saprobios aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).....	16
Gráfico 8. Comportamiento de los hongos saprobios aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd) frente a distintas concentraciones de Cd (0, 10, 50 y 100 ppm).....	17
Gráfico 9. Crecimiento de los hongos saprobios (cm) aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd) frente a distintas concentraciones de Cd (0, 10, 50 y 100 ppm).....	18



Abstract

El empoderamiento del mercado latinoamericano de cacao Nacional fino de aroma se ha visto limitado por los altos contenidos de cadmio (Cd) en las almendras. Proponemos un bioproceso innovador, eficiente y climáticamente inteligente para reducir la bioacumulación del Cd, acompañado por un protocolo de aplicación en territorio. Este product implicará: (a) la identificación de un suelo que bajo manejo orgánico contenga una microbiota capaz de promover el desarrollo de plantas de CN sin necesidad de fertilización sintética, principalmente fósforo (P) y (b) el aislamiento de un consorcio de hongos nativos de suelos en plantaciones de cacao, capaces de disminuir los coeficientes de bioacumulación radicular y aéreo (CBr,a) del Cd.

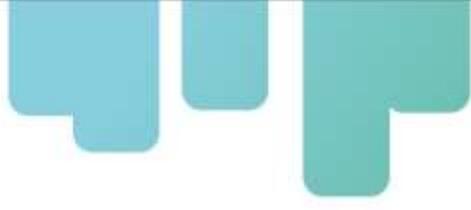
Successful marketing of Latin-American Fine Aroma National cocoa (CN) is hampered by high cadmium (Cd) content in the beans. For this, we will formulate an innovative, highly efficient and climatically intelligent bioprocess to reduce the solubility of Cd in the rhizosphere of CN plants with a protocol suitable for transfer to cocoa farms. At this stage of the Project, this product involved: (a) the identification of a microbiota, native to organically managed soils in Ecuador, capable support the growth of CN plants without the use of synthetic fertilizers, mainly of the P-type, and (b) the isolation of a consortia of soil fungi, native to CN plantations in Ecuador, that have the ability to decrease the aerial and roots coefficients of bioaccumulation (CBr,a) of Cd.

Palabras Clave: Suelo, Cacao, Cadmio, Hongos saprobios, Micorrizas arbusculares.

Resumen Ejecutivo

Para la presente investigación, plántulas de cacao nacional fino y de aroma (CN), crecieron en suelos colectados de (a) plantaciones orgánicas de plátano (S1) y de limón (S2) de Ecuador. La mayor biomasa aérea y radicular en plántulas crecidas en S2, en comparación con S1, fue atribuida a la presencia en S2 de una microbiota más diversa y con mayor biomasa que en S1, capaz de promover el desarrollo de las plántulas a niveles iguales o superiores a los generados por la aplicación de fertilizantes sintéticos.

En paralelo, en suelos de plantaciones orgánicas de CN categorizadas como sin cadmio (Cd) (S3), o con Cd (S4), se determinó la presencia de 1.5 veces más esporas de hongos arbusculares micorrícicos (HA) en la rizósfera de plántulas de cacao creciendo en S3, comparado con los valores en S4. La abundancia de HA se corresponde con los resultados obtenidos en el análisis de glomalina de estos suelos, en donde en S3 se registraron altos valores de glomalina en comparación con S4. Los análisis de morfotipos de las esporas permitieron identificar siete especies de HA en S3 y S4. Se destaca la presencia de *Acaulospora mellea* únicamente en S4, mientras que *A. scrobiculata* y *Glomus brohultii* fueron detectadas en S3 y S4. El mayor número de esporas de ambos suelos fue de la especie morfotipo 1, que no pudo ser identificado probablemente porque sea una especie nueva. El descubrimiento de esporas de *A. mellea* exclusivamente en S4 la convierte en candidata para ser probado este hongo en plantas de CN crecidas en altas concentraciones de Cd. Por otra parte, S3 y S4 mostraron gran número de unidades de colonias de hongos saprobios (HS), mayor en S3. De estas colonias fúngicas se aislaron 46 cepas diferentes que mostraron un comportamiento y crecimiento distinto ante varias concentraciones de Cd, en base al cual se seleccionaron 10 colonias diferentes de hongos saprobios HS. Además, el grado de tolerancia de Cd del hongo de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ), *Phanerochaete chrysosporium*, lo convierte en un hongo interesante para ser incluido en el consorcio de HS que serán evaluados en plantaciones de CN en Ecuador. Estas cepas de HS tanto nativos como de colección son interesantes para formar junto con los HA un consorcio que se utilizará en el bioproceso de inmovilización de Cd en la rizosfera de plantas de CN.



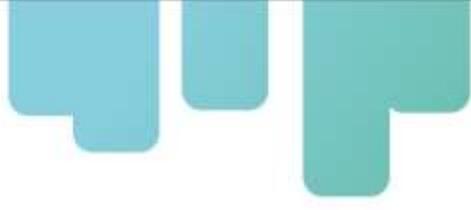
Introducción

El empoderamiento del mercado latinoamericano de cacao Nacional fino y de aroma (CN) se ha visto limitado por contenidos de cadmio (Cd) superiores a 0.8 mg/kg en las almendras (Zhao et al., 2023). Esto ocurre como resultado de los altos contenidos de Cd en los suelos y en los fertilizantes sintéticos, principalmente los fosforados (Umayangani et al., 2021). Desafortunadamente, todos los intentos de limitar la absorción de Cd mediante el uso de distintos patrones o la generación de híbridos y clones de CN con bajas tasas de absorción de Cd, no han dado los resultados esperados por los agricultores (Zarrillo et al., 2018).

Se ha visto, la habilidad que tienen los hongos micorrízicos arbusculares (HA) de reducir la bioacumulación del Cd (Colombo et al., 2020; Ghomsi et al., 2023), mediante un proceso de fitoestabilización de este metal pesado en la rizósfera de las plantas de cacao (Luis-Alaya et al., 2023). En paralelo se demostró la efectividad de hongos saprobios (HS) como biorremediadores en suelos con altos contenidos de metales pesados (Nazir et al., 2023), mediante mecanismos de fitoestabilización, bioabsorción periplásmica, bioacumulación intracelular, biotransformación y producción de sideróforos (Wang et al., 2021), directamente a través de reacciones enzimáticas o indirectamente a través de la producción de metabolitos secundarios (Akhtar et al., 2020). Resultados publicados recientemente por Guerra Sierra et al. (2022) señalan la habilidad del HS *Talaromyces santanderensis* de colonizar plantas de cacao en suelos contaminados con Cd, en Colombia.

A nivel mundial, son numerosos los estudios que confirman la importancia de la microbiota del suelo para el óptimo desarrollo de plántulas de cacao (Quaye et al., 2021; Wigunanda et al., 2023), como potencial biofertilizante (Navarro y Rozo, 2014; Ramírez Marrache et al., 2019), y bioremediador (García-Hernández et al., 2017). Sin embargo, en Ecuador y Venezuela son escasas las investigaciones llevadas a cabo sobre este tema, en una de estas se destaca la detección de grandes poblaciones bacterianas nativas de suelos asociados a plantaciones de cacao en la provincia de Los Ríos en Ecuador (Ponce González, 2019).

Basado en esta información, los objetivos de esta fase del proyecto, en el marco del producto 3, fueron, la identificación de un suelo que bajo manejo orgánico contenga una microbiota capaz de promover el desarrollo de plantas de CN sin necesidad de fertilización sintética, principalmente fósforo (P). Para ello las plántulas de CN fueron tratadas con: (a) P, esencial para el desarrollo de las plántulas al estar involucrado en los procesos metabólicos de mitocondrias y cloroplastos (Lambers, 2022); (b) melaza, enriquecedora del C orgánico del suelo (Pyakurel et al., 2019); y (c) citoquininas, promotoras de la división y expansión celular en primordios radiculares, foliares y caulinares (Li et al., 2021). Además, otro de los objetivos fue el aislamiento y caracterización taxonómica morfológica de HA y HS nativos de suelos con y sin Cd en plantaciones de CN en la Provincia de Manabí (Ecuador), que serán empleados en el bioproceso para reducir el Cd soluble en la rizosfera de plantas de cacao mediante biorreactores y el consorcio de HA y HS seleccionado.



Objetivos

Objetivo general

El objetivo de la actividad es la selección de suelos para el aislamiento, propagación y evaluación de HA (hongos arbusculares) y HS (hongos saprobios) autóctonos para formulación del bioproceso.

Objetivos específicos

Como parte del componente 2 de formulación del bioproceso en biorreactores (TRL 3-4) nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Seleccionar suelos bajo manejo orgánico con microbiota capaz de promover el desarrollo de plantas de CN sin necesidad de fertilización sintética.
- 2) Aislar HA (hongos arbusculares) y HS (hongos saprobios) autóctonos de suelos contaminados con Cd para utilizar en el bioproceso de inmovilización de Cd en la rizosfera de plantas de CN.

Metodología

Para cumplir con el objetivo 1, se crecieron plántulas de CN EET103 en bolsas de plástico negro de 2 kg, rellenas con suelos colectados en el horizonte superficial entre 5 a 30 cm de profundidad, en plantaciones orgánicas de plátano (S1) (1°00'32.8"S 80°23'09.5"W), y de limón (S2) (1°00'26.6"S 80°23'10.4"W), en la provincia de Manabí, Ecuador. Al momento de la siembra en S1 y S2, las bolsas de crecimiento fueron divididas en grupos de diez y los suelos fueron tratados con los siguientes tratamientos: 10 g kg⁻¹ P, 3 mmol de melaza, o 5 μmol de citoquininas. Además, plántulas de CN crecidas en suelos S1 y S2 sin ninguna enmienda sirvieron como controles. En cada tratamiento en S1 y S2, se determinó la altura del tallo de las plántulas con una regla metálica a intervalos de 7 días y hasta las 22 semanas después de la germinación. La determinación del contenido de clorofila se llevó a cabo en hojas maduras totalmente expandidas en plántulas de 22 semanas de edad, con un equipo portátil SPAD Minolta. El programa GraphPad Prims fue utilizado para los análisis estadísticos de los datos que incluyeron la determinación de la media estadística y el error estándar de la media estadística, y una ANOVA de 1 vía para las unidades SPAD con un nivel de significación de $p < 0.05$.

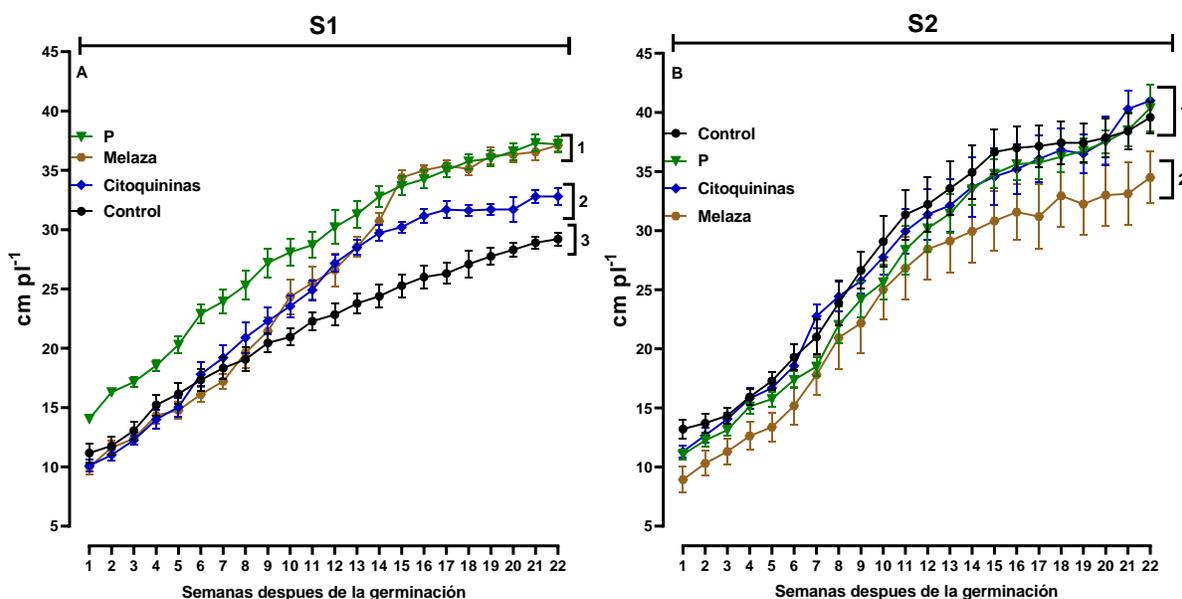
Para cumplir con el objetivo 2, se llevó a cabo el aislamiento de hongos arbusculares (HA) y hongos saprobios (HS) en la rizosfera de plántulas de CN EET103 sembradas en bolsas de plástico de 2 kg conteniendo suelo: (a) sin Cd (S3), colectado en el horizonte superficial de una parcela de CN orgánico en el campus La Teodomira de la UTM, (b) con Cd (S4), de una finca asociada a la Corporación Fortaleza del Valle. El aislamiento de las esporas de HA se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cuenca y Meneses (1996). Los HA se identificaron morfológicamente por el método de tamizado húmedo del suelo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963). Además, se recolectaron propágulos de HA a partir de las muestras de S3 y S4 (esporas de HA y raíces colonizadas de plantas de cacao), los cuales se desinfectaron superficialmente y se incubaron en gotas gelificadas para su germinación, y posterior cultivo in vitro en asociación a raíces transformadas de zanahoria (Silvani et al., 2008). Esto se realizó con el propósito de poner a punto la técnica con esas especies de HA, y así lograr obtener cepas puras y poder evaluar su efecto frente a suelos contaminados con Cd. Por otra parte, se cuantificó el contenido de glomalina (fracción fácilmente extractable) en muestras de S3 y S4, glicoproteína que producida por los HA está asociada al secuestro e inmovilización de metales pesados en el suelo, por lo que es importante como indicador de la salud del suelo (Rodríguez-Rodríguez et al., 2021).

El aislamiento de HS nativos de suelos se realizó según Siles et al. (2014) por el método de dilución seriada, en los medios de cultivos agar extracto malta (MEA) y agar patata dextrosa (PDA) específicos para cultivo de hongos, al que se le adicionó estreptomycinina (12 mg/ml) para evitar el crecimiento de bacterias. Además, se utilizarán alguna cepa de la colección de la Estación Experimental del Zaidín aislada en suelos contaminados con metales pesados como control para los ensayos de tolerancia, a distintas concentraciones de Cd, de los HS nativos de suelos de Ecuador.

Resultados

Las mediciones de altura (Gráfico 1A) realizadas para seleccionar suelos bajo manejo orgánico con microbiota para el crecimiento de plantas de CN sin fertilización inorgánica, permitieron la categorización de las plántulas S1 en tres grupos: (i) grupo 1 con las mayores alturas, constituido por las plántulas S1+melaza y S1+P; (ii) grupo 2 con alturas medias, constituido por las plántulas S1+citoquininas; y (iii) grupo 3, constituido por las plántulas S1 control. Por el contrario, en S2 (Gráfico 1B), las plántulas fueron catalogadas en 2 grupos: (i) grupo 1 constituido por las plántulas S2 control, S2+P, y S2+citoquinina, con las mayores alturas; y (ii) grupo 2 representado por las plántulas S2+melaza, con las alturas más bajas.

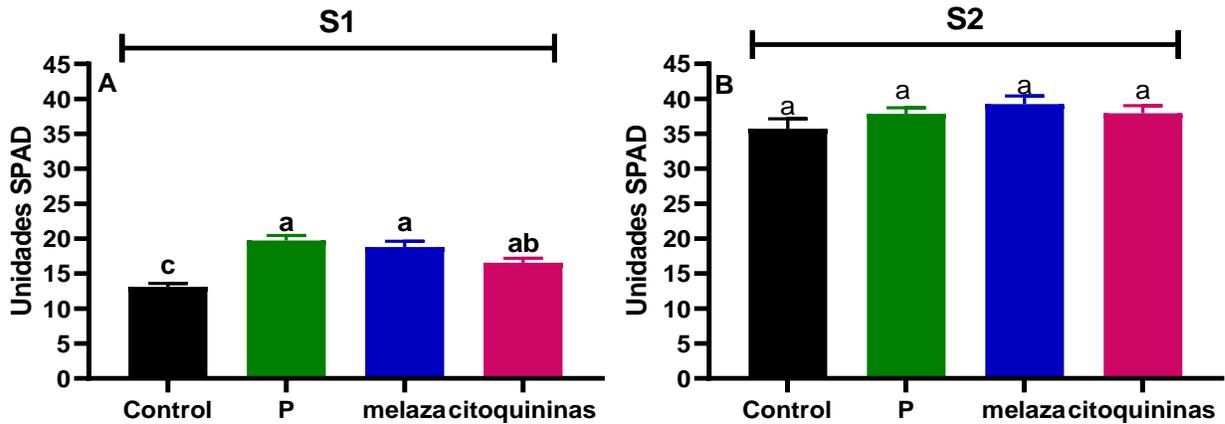
Gráfico 1. Altura de las plántulas de cacao nacional crecidas en suelos colectados en plantaciones orgánicas de (A) plátano (S1), y (B) limón (S2), sometidas a los tratamientos con P, melaza, y citoquininas.



Los datos representan la media estadística de 10 repeticiones \pm el error estándar de la media estadística.

Los contenidos de clorofila en las plántulas S1 fueron, de mayor a menor, en el orden de: S1+P y S1+melaza \geq S1+citoquininas > control (Gráfico 2A). Por el contrario, los contenidos de clorofila en plántulas S2 nos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Gráfico 2B), siendo los valores absolutos 1,75 veces más altos que en las plántulas S1.

Gráfico 2. Contenido de clorofila en unidades SPAD en plántulas de cacao nacional crecidas en suelos colectados en plantaciones orgánicas de plátano (S1) (A) y limón (S2) (B), y sometidas a los tratamientos con P, melaza, y citoquininas.



Las barras indican la media estadística de 10 repeticiones \pm el error estándar de la media estadística. Barras seguidas por la misma letra son estadísticamente similares a $p < 0.05$.

En paralelo y a partir de suelo sin Cd (S3) y en presencia de Cd (S4) se realizó el aislamiento de hongos arbusculares (HA) y se determinó la presencia de 1.5 veces más esporas de HA en S3 comparado con los valores en S4. Los análisis de morfotipos de las esporas permitieron identificar morfológicamente seis especies distintas de HA en el suelo S3 y cuatro en el S4 (Cuadro 1 y Gráfico 3). Se destaca la presencia de *Acaulospora cf. Papillosa*, *Funneliformis geosporus* y *A. excavata* únicamente en S3, mientras que Morfotipo 1, *A. scrobiculata* y *Glomus brohultii* fueron detectadas tanto en S3 como en S4. Hay que destacar la aparición de *A. mellea* solo en suelos en presencia de Cd.

Cuadro 1. Lista de morfotipos de hongos arbusculares de las muestras analizadas en los suelos sin Cd (S3) y con Cd (S4).

S3 (sin Cd)	S4 (+Cd)
Morfotipo 1	
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	
<i>Glomus brohultii</i>	
<i>Acaulospora cf. papillosa</i>	<i>Acaulospora mellea</i>
<i>Funneliformis geosporus</i>	
<i>Acaulospora excavata</i>	

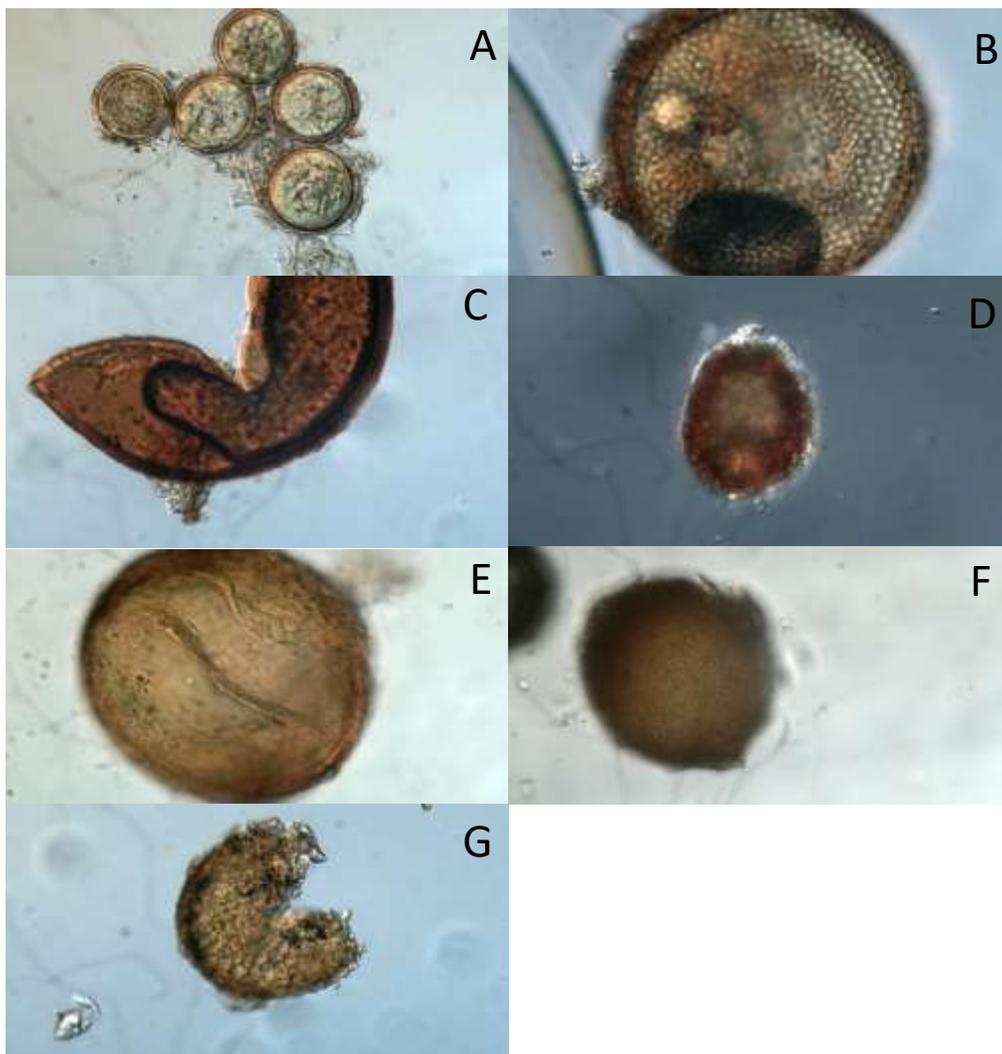


Gráfico 3. Diversidad de hongos arbusculares de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd). A: Morfotipo 1a. *Glomus* sp. nov.; B: *Acaulospora scrobiculata*; C: *Funneliformis geosporus*; D: *Glomus brohultii*; E: *Acaulospora mellea*; F: *Acaulospora* cf. *Papillosa*; G: *Acaulospora excavata*. Observaciones taxonómicas por Dra. Gisela Cuenca.

Asimismo, se propagaron los HA de ambos suelos mediante la confección de cultivos trampa, los cuales son mantenidos en condiciones controladas de invernadero para eventualmente aislar y cultivar in vitro algunas de las cepas en asociación a raíces transformadas. Las esporas de HA recolectadas directamente de las muestras de ambos suelos y raíces de plantas de cacao, se desinfectaron superficialmente y se incubaron a 25°C en oscuridad para su germinación (Gráfico 4). Se logró la puesta a punto del método, lo que permitirá aislar HA a partir de los propágulos obtenidos de los cultivos trampa.

Además, a partir de suelos sin Cd (S3) y en presencia de Cd (S4) se realizó el recuento unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos saprobios (HS), después de cinco días de incubación, en dos medios distintos MEA y PDA. En general el S3 mostró un mayor número de UFC/g de suelo en comparación con los valores detectados en S4 (Cuadro 2), destacando el medio PDA como el más favorable para el crecimiento de las colonias de HS.

Cuadro 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos por gramo de los suelos sin Cd (S3) y con Cd (S4).

Suelos	MEA (UFC/g de suelo)				
	-1	-2	-3	-4	-5
S3	Incontable	16	1	0	0
	Incontable	18	5	0	0
S4	Incontable	12	3	0	0
	Incontable	10	1	0	0
Suelos	PDA (UFC/g de suelo)				
	-1	-2	-3	-4	-5
S3	Incontable	40	4	2	0
	Incontable	33	4	1	0
S4	Incontable	45	4	0	0
	Incontable	31	7	0	0

A continuación, se muestran imágenes de las distintas colonias aisladas según el método de dilución seriada de los suelos S3 y S4 en los dos medios de crecimiento MEA y PDA (Gráfico 6). Cada una de las colonias se separó individualmente para obtener cultivos puros y se consiguieron aislar 46 cepas diferentes de ambos suelos (Gráfico 7).

Gráfico 6. Imagen de la diversidad fúngica de hongos saprobios de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).

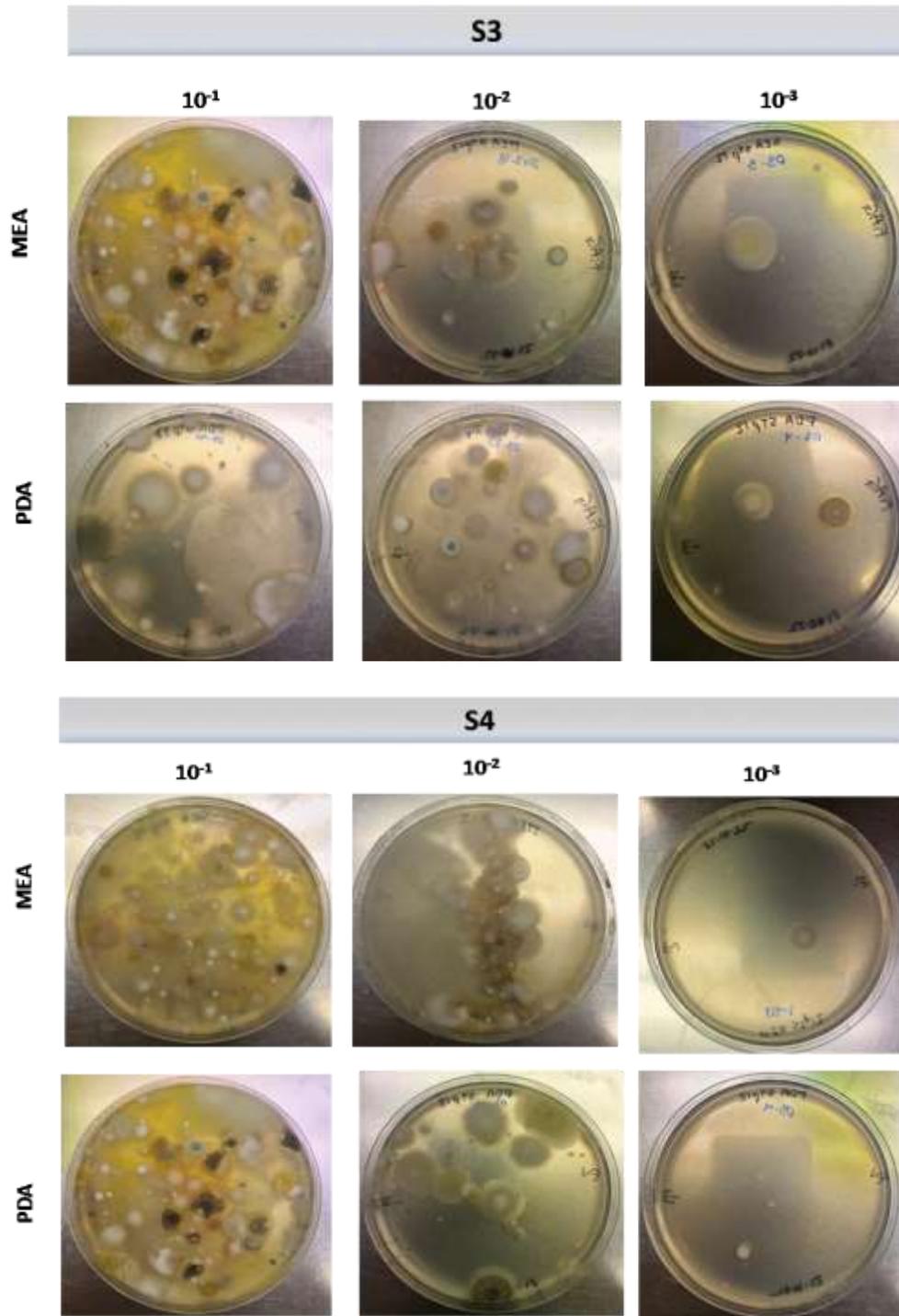
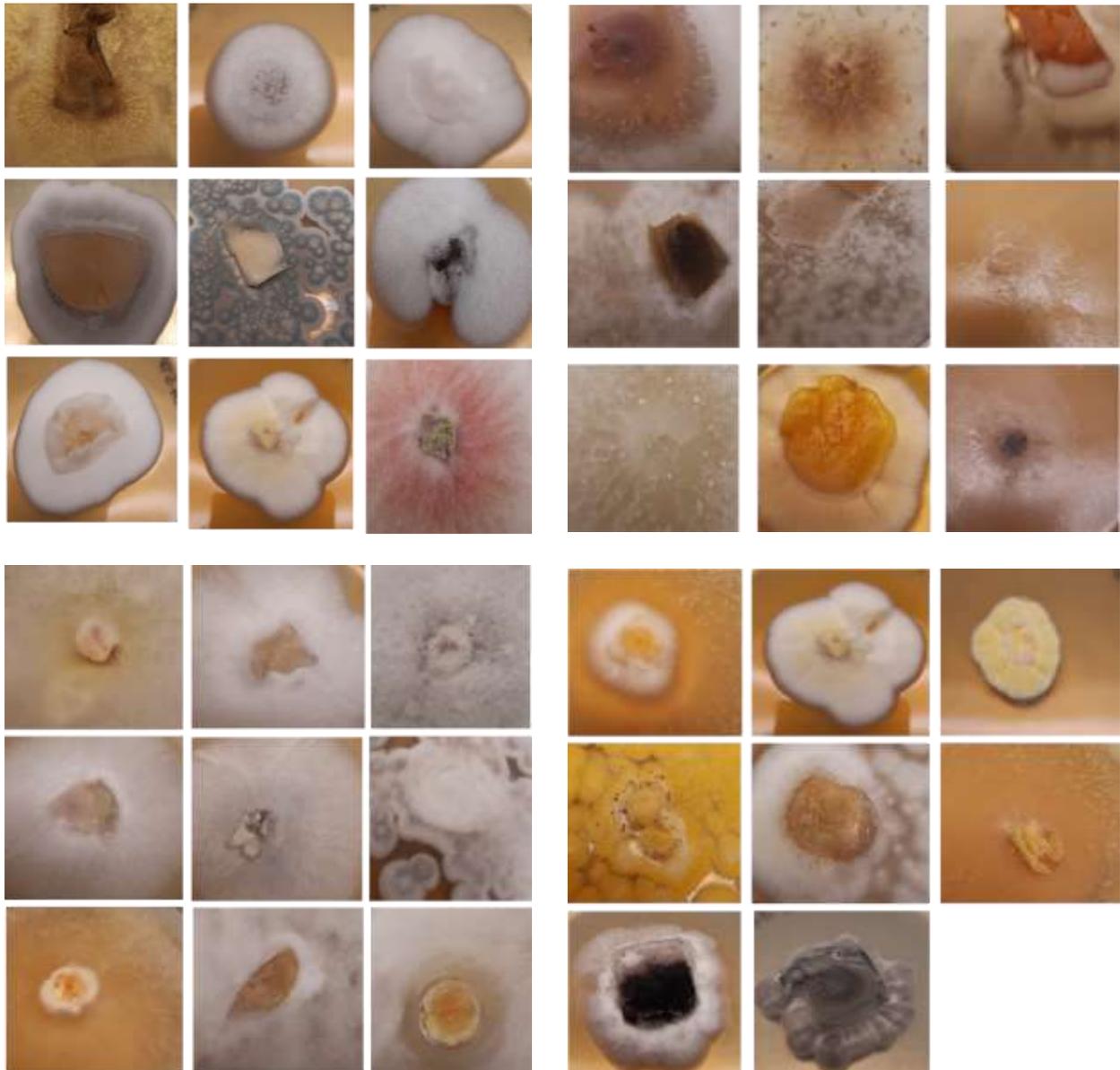


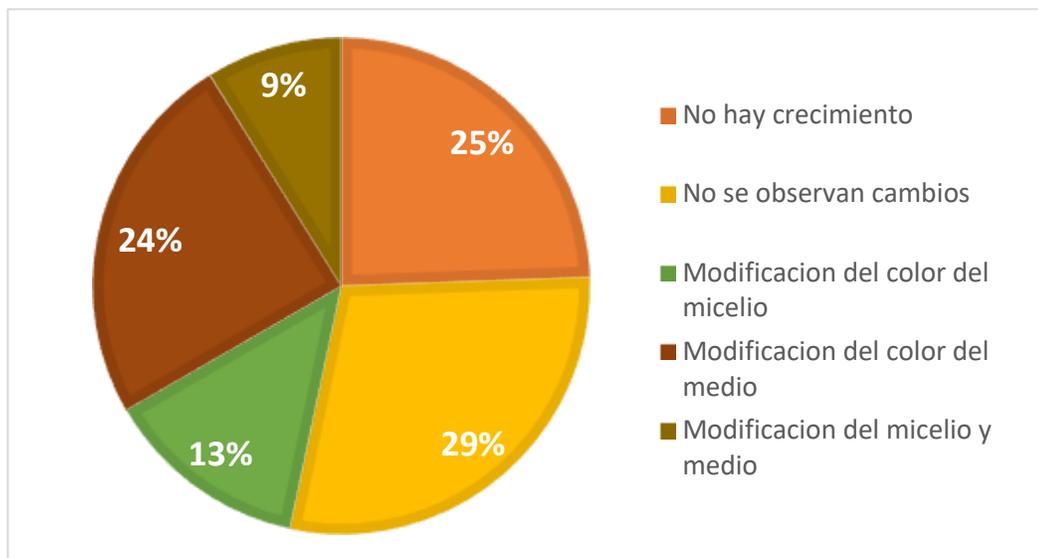


Gráfico 7. Fotografías de distintos hongos saprobios aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd).



De estas 46 colonias, 20 se aislaron del S3 y del suelo con Cd se aislaron 26. Estas colonias se crecieron en presencia de distintas concentraciones de Cd (0, 10, 50 y 100 ppm) para determinar su capacidad de tolerar este metal pesado y se obtuvieron distintos comportamientos tal y como se observa en el Gráfico 8. Se observó que un 25% de las 46 colonias fúngicas no crecieron, en un 29% no se observaron cambios ni en la morfología ni en el color de la colonia y del medio; sin embargo, se observaron modificaciones del color del medio ante la exposición a distintas concentraciones de Cd en un 13% de las colonias aislada y en un 24% de las cepas fúngicas se observaron cambios en el color del medio micelio. Hay que destacar que solo un 9% de las cepas aisladas cambiaron tanto el color del medio como del micelio fúngico ante las distintas concentraciones de Cd.

Gráfico 8. Comportamiento de los hongos saprobios aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd) frente a distintas concentraciones de Cd (0, 10, 50 y 100 ppm).



En este experimento se determinó además el crecimiento de los distintos aislados mediante la medición del diámetro de la colonia y los resultados obtenidos se detallan en el Gráfico 9.



Gráfico 9. Crecimiento de los hongos saprobios (cm) aislados de los suelos S3 (sin Cd) y S4 (con Cd) frente a distintas concentraciones de Cd (0, 10, 50 y 100 ppm).

nº de aislado	No se observan cambios				nº de aislado	Modifica color medio			
	Concentración ppm de Cd					Concentración ppm de Cd			
	0	10	50	100		0	10	50	100
3	5,44	4,51	4,29	2,86	1	4,71	4,49	4,61	3,29
4	5,32	4,32	4,30	4,36	5	4,19	4,06	3,65	3,11
6	4,60	4,27	3,14	1,87	7	5,44	5,44	5,44	4,23
10	5,44	5,44	3,88	0,00	8	4,82	4,33	3,27	2,38
12	5,44	5,44	4,02	3,49	14	5,44	5,44	5,44	3,74
24	5,44	5,44	0,00	0,00	16	5,44	5,44	3,66	1,82
25	5,44	3,00	1,61	2,22	29	5,44	4,35	3,80	2,15
30	5,44	5,44	4,22	0,00	41	4,05	1,81	0,00	0,00
32	5,44	5,44	4,72	2,90	42	4,36	3,14	0,00	0,00
34	4,44	2,64	1,70	0,00	43	4,15	2,00	0,00	0,00
35	5,44	5,44	4,80	4,38	44	3,95	5,44	2,05	1,90
45	3,70	3,10	2,60	2,00	nº de aislado	Modifica color micelio			
46	2,50	1,95	1,75	1,30		Concentración ppm de Cd			
nº de aislado	Modifica color micelio y medio				nº de aislado	0	10	50	100
	Concentración ppm de Cd					2	4,43	4,20	4,09
	0	10	50	100	15	5,44	4,64	4,07	2,98
22	5,44	5,44	5,44	4,45	21	5,44	4,75	3,70	2,55
26	5,44	3,85	3,85	2,20	23	5,44	5,44	2,25	0,00
33	5,44	4,56	2,84	1,57	31	5,44	4,10	4,00	2,15
39	5,44	5,44	2,99	2,23	40	5,44	4,23	0,00	0,00

En base a este crecimiento se seleccionaron 10 cepas fúngica, 4 (nº 4, 12, 32 y 35) entre las cepas que no mostraron cambios con las distintas concentraciones de Cd, 2 (nº 7 y 14) entre las que modificaron el color del medio, 3 (nº 2, 15, 21) del grupo que transformó el color del micelio y una cepa fúngica (nº 22) entre las que cambió tanto el color del micelio como el del medio. Estas 10 cepas se utilizarán como inóculo de los biorreactores que junto con los hongos arbusculares tratarán de disminuir la concentración de Cd en las plantas de cacao.

Además de estos hongos nativos nos planteamos seleccionar algún hongo de la colección de la EEZ aislado de suelos contaminados con metales pesados como control. Se escogieron 8 cepas de hongos de la colección y se crecieron en concentraciones de 10 a 5000 ppm de CdCl₂ en medio MEA tal y como se muestran en el Cuadro 3. De las cepas ensayadas destacó *Phanerochaete chrysosporium* por su tolerancia a concentraciones de Cd de hasta 5000 ppm.

Cuadro 3. Tasa de crecimiento (cm) de los hongos saprobios de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) en presencia de distintas concentraciones de Cd.

Cepa	Concentración CdCl ₂ [ppm]							
	10	50	100	250	500	1000	2500	5000
<i>Trametes versicolor</i>	+++	+++	++	+	----	----	----	----
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	++	++	++	---	---	----	----	----
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+++	++	+++	----	----	----	----	----
<i>Coprinellus radians</i>	+++	++	----	----	----	----	----	----
<i>Coriolopsis rigida</i>	----	----	----	----	----	----	----	----
<i>Aspergillus niger</i>	----	----	----	----	----	----	----	----
<i>Bjerkandera adusta</i>	+++	+++	++	++	----	----	----	----

--: Sin crecimiento; +: crecimiento 0.3 cm; ++: crecimiento 0.6 cm; +++: crecimiento 0.9 cm

Discusión

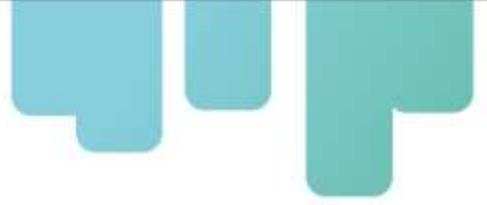
El mayor crecimiento, biomasa aérea y contenido de clorofila foliar de plántulas de CN en S2 se consideran indicadores de la presencia en este suelo de una microbiota capaz de promover el desarrollo de plántulas de CN a niveles iguales o superiores a los inducidos por la aplicación de fertilizantes sintéticos. Estas observaciones pueden ser adscritas a una mayor masa microbiana, altamente diversa taxonómicamente en S2, probablemente compuesta por: (a) HA efectivos en la solubilización del P del suelo, y HS capaces de contrarrestar los estreses abióticos estacionales que afectan los cultivos agrícolas en la Provincia de Manabí, y (b) *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Bacteroidetes* que usualmente colonizan la rizósfera de árboles cítricos (Ngullie et al., 2015) y utilizan para su crecimiento las fitohormonas, ácido salicílico, índol acético y jasmónico exudados al suelo por cítricos como el limón (Vives-Peris et al., 2017). La revisión de la bibliografía no reveló ninguna información sobre la presencia de HA y HS en estos suelos de la costa de Ecuador.

Muy relevante es el descubrimiento de esporas de *Acaulospora mellea* exclusivamente en S4 con Cd. Esta HA tiene la capacidad de disminuir la fitoextracción de metales pesados como el cobre en suelos contaminados con ese elemento (Wang et al., 2007), por lo cual se considera como una excelente candidata para ser incluida en el consorcio de HA que serán probados en plantas de CN crecidas en altas concentraciones de Cd. También importante es la presencia en S3 y S4 de las especies generalistas: (i) *Acaulospora scrobiculata*, capaz de atenuar la toxicidad causada en plantas por altos contenidos de cromo (Akhtar et al., 2019) y manganeso (García et al., 2020) en los suelos, y (b) *Glomus brohultii* que actúa como biorremediador en suelos contaminados con arsénico (Wu et al., 2009). El morfotipo 1 puede ser una especie nueva debido a que no pudo ser identificado que presentó el mayor número de esporas aisladas de S3 y S4, lo cual facilitaría su uso como inóculo de HA en suelos con Cd y sin Cd. La abundancia y/o diversidad de especies de HA fue superior en S3, lo que se corrobora con una mayor producción de glomalina que en S4. Se ha reportado en varios trabajos que la abundancia de la glomalina se relaciona con un buen estado de salud de los suelos (Liu et al., 2022).

Los resultados obtenidos durante esta investigación demostraron que se aislaron 46 cepas fúngicas en los suelos nativos S3 sin Cd y S4 con Cd. De estas, 10 cepas de HS seleccionadas tras un proceso de evaluación por sus habilidades de crecimiento en presencia de Cd, se consideran unos excelentes candidatos para ser probados en plantas de CN con altas concentraciones de este metal. De hecho, se ha descrito que la inoculación fúngica es fundamental en la protección de las plantas frente a la toxicidad de metales pesados (Gramss & Hans, 2014; Fazli et al., 2015) y, en concreto, para la protección de plantas de cacao frente a Cd (Guerra sierra et al., 2022). Por otra parte, la capacidad de crecimiento del hongo de la colección de la EEZ aislado de suelo, *Phanerochaete chrysosporium*, en medios de cultivo enriquecidos con hasta 5000 ppm de Cd, lo convierte en un hongo interesante para ser incluido en el consorcio de HS que serán evaluados en plantaciones de CN en Ecuador. Se ha descrito que la inoculación con esta especie permite la neutralización de ciertos metales pesados y entre ellos el Cd a través de la quelación y su gran



capacidad de biosorción (Chen et al., 2019; Huang et al., 2019).



Conclusiones

(1) La alta actividad biológica de la microbiota nativa de S2, equivalente a la aplicación de P, eliminará la necesidad de aplicar fertilizantes fosforados, considerados como una fuente externa de Cd a las plantaciones de CN.

(2) Los hongos arbusculares *Acaulospora mellea*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus brohultii* y el morfotipo 1 son buenos candidatos para la inmovilización de Cd en la rizosfera de plantas de cacao nacional.

(3) La presencia de 10 cepas nativas de hongos saprobios aisladas de S3 sin Cd y S4 en presencia de Cd y la alta tolerancia al Cd del hongo de la colección de la Estación Experimental del Zaidín, *P. chryso sporium*, incrementa la posibilidad de conseguir hongos saprobios altamente eficientes en la inmovilización de Cd en la rizósfera de cacao nacional.

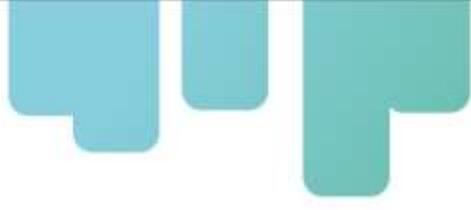
Referencias Bibliográficas

- Akhtar, O., Kehri, H. K., & Zoomi, I. (2020). Arbuscular mycorrhiza and *Aspergillus terreus* inoculation along with compost amendment enhance the phytoremediation of Cr-rich technosol by *Solanum lycopersicum* under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110869. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110869>
- Akhtar, O., Mishra, R., & Kehri, H. K. (2019). Arbuscular mycorrhizal association contributes to Cr accumulation and tolerance in plants growing on Cr contaminated soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 63-70. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0914-4>
- Chen, Y., Chen, Y., Li, Y., Wu, Y., & Zeng, Z. (2019). Changes of heavy metal fractions during co-composting of agricultural waste and river sediment with inoculation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 37815, 120757. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120757>
- Colombo, R. P., Benavidez, M. E., Bidondo, L. F., Silvani, V. A., Bompadre, M. J., Statello, M., ... & Godeas, A. M. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal highly polluted soil in the Riachuelo river basin. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.001>
- Cuenca, G., & Meneses, E. (1996). Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. *Plant and Soil*, 183, 315-322. <https://doi.org/10.1007/BF00011447>
- Fazli, M.M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: Their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>
- García, K. G. V., Mendes Filho, P. F., Pinheiro, J. I., do Carmo, J. F., de Araújo Pereira, A. P., Martins, C. M., ... & Oliveira Filho, J. D. S. (2020). Attenuation of manganese-induced toxicity in *Leucaena leucocephala* colonized by arbuscular mycorrhizae. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231, 1-15.
- García-Hernández, M. A., Villareal-Chiu, J. F., Garza-González, M. T. (2017). Tetrallophilic fungi research: an alternative for its use in the bioremediation of hexavalent chromium. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 2023-2038. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13762-017-1348-5#citeas>
- Gerdemann, J. W. & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Ghomsí, P. G. T., Eke, P., Kepngop, L. R. K., Kamdem, T. H. W., Nguemngang, L. C. M., Nya, V. D., ... & Fekam, F. B. (2023). Propagation host affects the mycorrhiza-mediated cd toxicity alleviation in cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings and restoration of soil aerobic mesophyll microflora. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(2), 2694-2707. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01226-2>
- Gramss, G., & Hans, B. (2014). Non-symbiotic ground fungi mobilize soil (heavy) metals and

- promote their plant uptake. *Trends in Environmental Science*, 297, 326. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-21408-0_19
- Guerra Sierra, B. E., Arteaga-Figueroa, L. A., Sierra-Pelaéz, S., & Alvarez, J. C. (2002). *Talaromyces santanderensis*: A new cadmium-tolerant fungus from cacao soils in Colombia. *Journal of Fungi* 8, 1042. <https://doi.org/10.3390/jof8101042>
- Huang, Z., He, K., Song, Z., Zeng, G., Chen, A., Yuan, L., Li, H., & Chen, G. (2019). Alleviation of heavy metal and silver nanoparticle toxicity and enhancement of their removal by hydrogen sulfide in *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 224, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.190>
- Lambers, H. (2022). Phosphorus acquisition and utilization in plants. *Annual Review Plant Biology* 73, 17-42. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>
- Luis-Alaya, B., Toro, M., Calsina, R., Ogata-Gutiérrez, K., Gil-Polo, A., Ormeño-Orrillo, E., & Zúñiga-Dávila, D. (2023). Evaluation of the presence of arbuscular mycorrhizae and cadmium content in the plants and soils of cocoa plantations in San Martín, Peru. *Diversity*, 15(2), 246. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2099192>
- Li, S. M., Zheng, H. X., Zhang, X. S., Sui, N. (2021). Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports* 40, 271-282. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02612-1>
- Liu, S., Wang, Q., Qian, L., Zhang, B., Chen, X., Hong, H., Wu, S., Liu, J., Yan, C., Lu, H. (2022) Mapping the scientific knowledge of glomalin-related soil protein with implications for carbon sequestration. *Ecosystem Health and Sustainability*, 8, 1. <https://doi.org/10.1080/20964129.2022.2085185>
- Lujian, L., Le, H., Hualong, H., Hanyi, L., Xilin, X., Bo, Y., Shanle, L., Haoliang, L., Jingchun, L., Chongling, Y. (2023). Sequestration of strontium, nickel, and cadmium on glomalin-related soil protein: Interfacial behaviors and ecological functions. *Science of The Total Environment* 881, 163461. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163461>.
- Navarro, A., & Rozo, L. (2014). Evaluation of potential biofertilizer diazotrophs bacteria isolated from cocoa crop (*Theobroma cacao* L.). *Plant Cell Reports* 36, 1971-1984. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41033>
- Nazir, A., Sarfraz, W., Allah, D., Khalid, N., Farid, M., Shafiq, M., ... & Naeem, N. (2023). Synergistic impact of two autochthonous saprobic fungi (*A. niger* and *T. pseudokoningii*) on the growth, ionic contents, and metals uptake in *Brassica juncea* L. and *Vigna radiata* L. under tannery solid waste contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 12, 1-13. <https://doi.org/10.1080/15226514.2023.2166457>
- Ngullie, E., Singh, A. K., Sema, A., & Srivastava, A. K. (2015). Citrus growth and rhizosphere properties. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 46, 1540-1550. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1043460>
- Ponce González, D. M. (2019). Evaluación de las poblaciones microbiológicas predominantes en suelos asociados a cacao en la zona de Buena Fe. *Universidad Técnica Estatal de Quevedo*. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3688>



- Pyakurel, A., Dahal, B. R. & Rijal, S. (2019). Effect of molasses and organic fertilizer in soil fertility and yield of spinach in Khotang, Nepal. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*, 7, 49-53. <http://dx.doi.org/10.3126/ijasbt.v7i1.23301>
- Quaye, A. K., Doe, E. K., Amon-Armah, F., Arthur, A., Dogbatse, J. A., & Konlan, S. (2021). Predictors of integrated soil fertility management practice among cocoa farmers in Ghana. *Journal of Agricultural and Food Research*, 5, 100174. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100174>
- Ramírez Marrache, K., Florida Rofner, N., & Escobar Mamani, F. (2019). Indicadores químicos y microbiológicos del suelo bajo aplicación de microorganismos eficientes en plantación de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 6, 21-28. http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v6n2/v6n2_a04.pdf
- Rodríguez-Rodríguez, R.R., Kimmelmeier, K., de Fátima Pedroso, D., Araújo Pinto, F., dos Santos, J.M., Gastauer, M., Fróis Caldeira, C., Ramos, S.J., Siqueira, J.O., Carbone Carneiro, M.A. (2021). Native arbuscular mycorrhizal fungi respond to rehabilitation in iron ore mining areas from the Eastern Brazilian Amazon. *Pedobiologia*, 89, 150768. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150768>.
- Siles, J., Rachid, C., Sampedro, I., García-Romera, I., & Tiedje, J. (2014). Microbial diversity of a Mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. *Plos One*, 9, e103035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>
- Silvani, V.A., Fracchia, S., Fernández, L., Pérgola, M., Godeas, A.M. (2008). A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1259-1263. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.022>
- Umayangani, C., Malaviarachchi, W., Hettiarachchi, R., & Yapa, N. (2021). Different sources of phosphorus fertilizers and soil amendments affected the phosphorus and cadmium content in soil, roots and seeds of maize (*Zea mays* L.). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(4), 640-645. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i4.640-645.3513>
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2017). Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. *Plant Cell Reports*, 36, 1971-1984. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2214-0>
- Wang, F. Y., Lin, X. G., & Yin, R. (2007). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia*, 51(2), 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.02.003>
- Wang, S., Dai, H., Wei, S., Skuza, L., & Chen, Y. (2021). Effects of Cd-resistant fungi on uptake and translocation of Cd by soybean seedlings. *Chemosphere*, 291, 132908. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132908>
- Wigunanda, I. W. S. A., Rai, I. N., & Wiraatmaja, I. W. (2023). Growth and yield response of organic cocoa (*Theobroma cacao* L.) to mycorrhizal biofertilizer prototype and pruning. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 158-165. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2023.22.2.0048>
- Wu, F. Y., Ye, Z. H., & Wong, M. H. (2009). Intraspecific differences of arbuscular mycorrhizal fungi in their impacts on arsenic accumulation by *Pteris vittata* L. *Chemosphere*, 76(9), 1258-1264. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.020>

- 
- Zarrillo, S., Gikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I. et al. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2, 1879. <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0697-x#citeas>
- Zhao, D., Wang, P., & Zhao, F. J. (2023). Dietary cadmium exposure, risks to human health and mitigation strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 53(8), 939-963. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2099192>

Instituciones Participantes

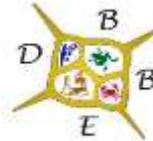


CONICET



UBA

I B B E A



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org