



**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**

**MAYRA ANDREINA OSORIO ZAMBRANO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BOGOTA, COLOMBIA**

**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**

**MAYRA ANDREINA OSORIO ZAMBRANO**

**Trabajo de Grado para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Tutor**

**WILSON TERÁN, Ph.D**

**Co-Tutor**

**LOYLA RODRIGUEZ PEREZ Ph.D**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BOGOTA, COLOMBIA**

**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**

**MAYRA ANDREINA OSORIO ZAMBRANO, Ing. Msc.**

**APROBADO**



---

***Wilson Terán, Ph.D***

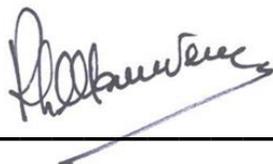
**Tutor**



---

***Wilmer Tezara, Ph.D***

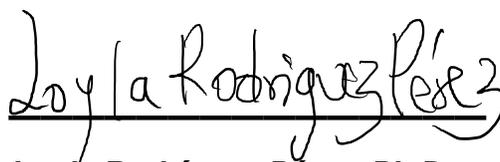
**Jurado**



---

***Philippe Monneveux, Ph.D***

**Jurado**



---

***Loyla Rodríguez Pérez, Ph.D***

**Co-Tutor**



---

***Roxana Yockteng, Ph.D***

**Jurado**

---

***Alejandra Covarrubias, Ph.D***

**Jurado**

---

***Juan Carlos Melgar, Ph.D***

**Jurado**

**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**

**MAYRA ANDREINA OSORIO ZAMBRANO, Ing. Msc.**

**APROBADO**

---

***Wilson Terán, Ph.D***

**Tutor**

---

***Loyla Rodríguez Pérez, Ph.D***

**Co-Tutor**

---

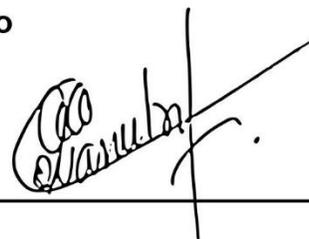
***Wilmer Tezara, Ph.D***

**Jurado**

---

***Roxana Yockteng, Ph.D***

**Jurado**



---

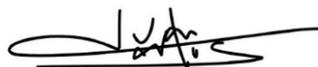
***Philippe Monneveux, Ph.D***

**Jurado**

---

***Alejandra Covarrubias, Ph.D***

**Jurado**



---

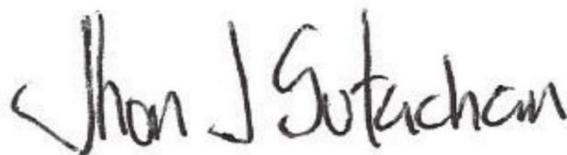
***Juan Carlos Melgar, Ph.D***

**Jurado**

**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**

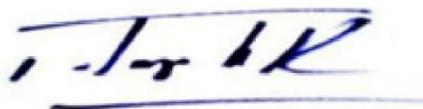
**MAYRA ANDREINA OSORIO ZAMBRANO**

**APROBADO**



---

**Jhon Jairo Sutachan Rubio, Ph.D**  
**Director de Posgrados**  
**Facultad de Ciencias**



---

**Alba Alicia Trespalcacios Rangel, Ph.D**  
**Decana**  
**Facultad de Ciencias**

**Bogotá, D.C**

**2021**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución No 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

*A Eugenio, Marco Antonio, Alix, Maralix, Fabio y Juan Esteban  
Por ser mi motor, mi soporte, mi luz, mi aliciente  
Por procurar siempre mi bienestar  
Por su confianza, paciencia y compañía*

*A las mujeres madres como mi abuela Aura Peralta y mis tías Iliá y Miriam  
que luchan cada día sin desfallecer superando toda dificultad  
ustedes son mi mejor ejemplo e inspiración*

*A mi papá (Q.E.P.D) por tu amor, dedicación, y enseñanzas  
Por ti y mi madre Alix  
nunca dejaré de luchar por mis sueños*

## **Agradecimientos**

El autor agradece sinceramente a todas las personas que participaron de diversas formas en el desarrollo de esta investigación, igualmente al soporte brindado por las instituciones involucradas.

Al profesor Wilson Terán por la oportunidad, acompañamiento, asesoría y enseñanzas. A la profesora Loyla Rodríguez por sus orientaciones, dedicación y compromiso. A la profesora Pilar Márquez por su apoyo y orientación en el ámbito académico y personal. A la profesora María Ximena Rodríguez por sus comentarios y recomendaciones constructivos y motivadores en el seminario de Biotecnología del Programa del Posgrado. A todos los profesores y compañeros del seminario que durante el desarrollo de la investigación enriquecieron mi proceso académico e investigativo.

A Darwin Castillo porque su interés de aprendizaje contribuyó en el desarrollo de partes fundamentales del proyecto. A Charles Sánchez por su soporte en gestiones administrativas y los momentos de debate académico.

A Cristian Bayona por sus aportes y orientaciones en el manejo del IRGA en campo. Al señor Rodrigo Centeno y su esposa Martha por su apoyo durante el trabajo de campo.

A mi esposo Eugenio Santaella por su confianza, comprensión, paciencia y apoyo incondicional en el ámbito académico, profesional y personal a lo largo de esta gran experiencia. A mi hijo Marco Antonio por su paciencia y sacrificios. A mi madre Alix por su soporte, amor y confianza. A mi hermana Maralix por su fe en mí y apoyo incansable. A mi cuñado Fabio porque siempre estuvo ahí. A mi sobrino Juan Esteban porque me motiva a tratar de mejorar cada día.

A la Pontificia Universidad Javeriana por la oportunidad de crecimiento académico y profesional en el Doctorado en Ciencias Biológicas. A los profesores, y compañeros de los laboratorios de Biología Molecular vegetal y Fisiología por la colaboración brindada durante el Doctorado.

A Geoambiente SAS, especialmente al señor Rafael Sierra por el uso de las instalaciones de la Estación Bambusa durante la fase experimental de la investigación.

Al programa CABANA por el soporte y oportunidad para la realización de la pasantía internacional en el Instituto de Bioinformática del Laboratorio de Biología Molecular Europeo EMBL-EBI en Cambridge, Reino Unido. A la Dra. Irene Papatheodorou, por la oportunidad de estar en el equipo de Gene expression y aprender de ellos. A los doctores Pablo Moreno y Jhonathan Maning por sus orientaciones y consejos en el análisis bioinformático. A todos los miembros del equipo por su acogida. A Ian Willis, manager del programa CABANA por su cordialidad y acompañamiento. A los

compañeros del programa CABANA por las experiencias. A Julieth Murillo, Mindy Muñoz y Valeria Faggioli por su amistad y apoyo a nivel personal y académico.

A la Gobernación del Departamento Norte de Santander y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Minciencias) por otorgarme del beneficio de crédito educativo condonable para la realización de mis estudios doctorales.

# Abreviaturas

## Abreviaturas y símbolos

Ψ

T

g

AF

ddt

dds

A

E

g<sub>s</sub>

C<sub>i</sub>

EUA<sub>i</sub>

H<sub>2</sub>O

CRA

EL

CVA

ETR

F<sub>o</sub>

F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>

ΦPSII

PSII

DPV

HR

Peso seco

Peso fresco

Peso turgente

Msr

Mst

Msh

Msto

CC

DH

D26

D52

DDR

D59R

DFFF (PPFD)

PMP

Log<sub>2</sub>FC

LSD

ANOVA

FDR

RFA

ABA

## Término

Potencial hídrico foliar

Temperatura

Gramo

Área foliar

Días después de tratamiento

Días después de siembra

Fotosíntesis neta

Transpiración

Conductancia estomática

CO<sub>2</sub> intercelular

Eficiencia de uso de agua intrínseca

Contenido relativo de agua

Pérdida de electrolitos

Contenido volumétrico de agua

Tasa de transporte de electrones

Fluorescencia basal

Eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II

Rendimiento cuántico del fotosistema II

Fotosistema II

Déficit de presión de vapor

Humedad relativa

Peso seco

Peso fresco

Peso turgente

Masa seca raíz

Masa seca tallo

Masa seca hoja

Masa seca total

Capacidad de campo

Déficit hídrico

Día 26

Día 52

Días después de rehidratación

Día 59

Densidad de flujo fotónico

Fotosintético

Punto de marchitez permanente

logaritmo en base 2 del factor de cambio

Diferencia menos significativa

Análisis de varianza

Tasa de falsos descubrimientos

Radiación fotosintéticamente activa

Acido abscísico

## Unidad

MPa

°C

g

cm<sup>2</sup>

días

días

μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>

μmoles CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>

%

%

%

μmoles e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

kPa

%

g

g

g

g

g

g

g

g

días

días

días

días

μmoles fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

## Tabla de Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Capítulo 1. Introducción y Objetivos</b> .....	<b>1</b>
1.1 Objetivo General .....	7
1.2 Objetivos específicos .....	7
1.3 Preguntas de Investigación .....	7
<b>Capítulo 2. Marco Teórico</b> .....	<b>8</b>
2.1 El cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	9
2.1.1 Descripción botánica de <i>T. cacao</i> .....	9
2.1.3 Importancia económica.....	13
2.1.4 Ecofisiología del cultivo de cacao .....	14
2.2 Dinámica del agua en el suelo y la planta .....	16
2.3 Estrés por déficit hídrico en las plantas .....	18
2.4 Efectos del déficit hídrico en las plantas.....	19
2.5 Mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico .....	26
2.6 Respuesta del cacao al déficit hídrico .....	41
2.7 Plataformas de Secuenciación de nueva generación: Aplicación en estudios de Transcriptómica .....	43
<b>Capítulo 3. Marco Metodológico</b> .....	<b>50</b>
3.1 Fase 1. Caracterización fisiológica .....	51
3.2 Fase 2. Caracterización Molecular. Transcriptómica .....	53
3.2.1 Identificación genes candidatos de tolerancia.....	55
<b>Capítulo 4. Caracterización de la respuesta fisiológica de siete clones de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) de interés comercial al estrés por déficit hídrico</b> .....	<b>56</b>
4.1 Abstract.....	57
4.2 Introduction .....	58
4.3 Materials and methods.....	59
4.3 Results.....	66
5.3 Discussion.....	75
5.6 Concluding remarks.....	83

<b>Capítulo 5. Caracterización de la respuesta fisiológica de tres híbridos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) al estrés déficit hídrico .....</b>	<b>85</b>
5.1 Resumen .....	86
5.2 Introducción .....	87
5.3 Materiales y Métodos.....	89
5.4 Resultados.....	92
5.5 Discusión .....	100
5.6 Conclusiones.....	106
<b>Capítulo 6. Perfil transcriptómico dos clones de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) con respuestas contrastantes al déficit hídrico .....</b>	<b>107</b>
6.1 Resumen.....	108
6.2 Introducción .....	109
6.3 Materiales y Métodos.....	111
6.4 Resultados.....	113
6.5 Discusión .....	139
6.6 Conclusiones.....	154
<b>Capítulo 7. Discusión General .....</b>	<b>156</b>
<b>Capítulo 8. Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>163</b>
8.1 Conclusiones .....	164
8.2 Recomendaciones .....	165
<b>Capítulo 9. Bibliografía.....</b>	<b>167</b>
<b>Capítulo 10. Anexos .....</b>	<b>201</b>

## Índice de Tablas

<b>Table 4- 1</b> Cacao commercial clones used in this study .....	<b>60</b>
<b>Table 4- 2</b> Cacao Orthologous genes related to the antioxidant system evaluated in this study .....	<b>65</b>
<b>Table 4- 3</b> Leaf water potential ( $\Psi$ ) of the seven cacao clones under different water status. ....	<b>67</b>
<b>Table 4- 4</b> Changes in leaf relative water content (RWC) and electrolyte linkage (EL) at D26 in the seven cacao clones. ....	<b>68</b>
<b>Tabla 6- 1</b> Factores de Transcripción inducidos bajo déficit hídrico en el clon EET8.....	<b>130</b>
<b>Tabla 6- 2</b> Detalle de los genes diferencialmente expresados (GDE) con mayor factor de cambio (Top 40) entre los genes comunes y específicos de cada clon relacionados con la respuesta de tolerancia al Déficit hídrico.....	<b>132</b>
<b>Tabla 6- 3</b> Propuesta de genes candidatos de tolerancia en la respuesta al DH de acuerdo con reportes de literatura y que están relacionados con los genes de la Tabla 6-2 en los mecanismos de respuesta a DH. ....	<b>135</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1.3- 1</b> Principales productores de cacao a nivel mundial .....	<b>13</b>
<b>Figura 2.7- 1.</b> Flujo de trabajo para el análisis bioinformático de datos de secuenciación de ARN empleando genoma de referencia. ....	<b>45</b>
<b>Figura 3- 1</b> Fases metodológicas.....	<b>51</b>
<b>Figura 3- 2</b> Flujo de trabajo para el análisis bioinformático de los datos de la secuenciación del ARN empleando el genoma de referencia de <i>T.cacao</i> Criollo Belice. ....	<b>54</b>
<b>Figure 4- 1</b> Variation in microclimatic conditions during measurements.....	<b>62</b>
<b>Figure 4- 2</b> Variation in soil and plant water content. ....	<b>63</b>
<b>Figure 4- 3</b> Changes in photosynthesis and gas exchange parameters of the seven cacao clones under different water status.. ....	<b>70</b>
<b>Figure 4- 4</b> Changes in maximum chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) (A) and (B) relative quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) of cacao clones under different water status.. ....	<b>71</b>
<b>Figure 4- 5</b> Effect of water deficit on the transcriptional expression of oxidative stress markers.. ....	<b>72</b>
<b>Figure 4- 6</b> Effect of water deficit on the transcriptional expression of genes encoding antioxidant enzymes.....	<b>73</b>
<b>Figure 4- 7</b> Effect of water deficit on the transcriptional expression of genes encoding fermentative metabolism enzymes .....	<b>74</b>
<b>Figura 5- 1</b> Variación en A) el contenido volumétrico de agua del suelo y B) el potencial hídrico foliar antes del amanecer de 3 clones de cacao en los diferentes estados hídricos.....	<b>90</b>
<b>Figura 5- 2</b> Plantas de los 3 clones de cacao en los diferentes estados hídricos el día de máximo estrés (D52).....	<b>91</b>
<b>Figura 5- 3</b> Variación en las variables climáticas durante el tiempo de experimentación.....	<b>93</b>

<b>Figura 5- 4</b> Cambios en el contenido volumétrico de agua del suelo.....	<b>94</b>
<b>Figura 5- 5</b> Cambio en los parámetros de intercambio de gases de tres clones de cacao sometidos a estrés por déficit hídrico y rehidratación.....	<b>96</b>
<b>Figura 5- 6</b> Cambio en los parámetros de la actividad fotoquímica de tres clones de cacao sometidos a estrés por déficit hídrico y rehidratación.....	<b>97</b>
<b>Figura 5- 7</b> Parámetros de crecimiento de tres clones de cacao sometidos a déficit hídrico y rehidratación.....	<b>99</b>
<b>Figura 5- 8</b> Sistema Radicular de tres clones de cacao sometidos a déficit hídrico y rehidratación .....	<b>100</b>
<b>Figura 6- 1</b> Calidad de las secuencias. ....	<b>114</b>
<b>Figura 6- 2</b> Análisis de componentes principales del perfil transcriptómico de los clones EET8 y TSH565 bajo condición control (CCE; CCT) y de déficit hídrico (DHE; DHT).....	<b>114</b>
<b>Figura 6- 3</b> Cambios en la expresión de los genes de los clones de cacao EET8 y TSH565 bajo condición control (CCE; CCT) y de déficit hídrico (DHE; DHT).....	<b>115</b>
<b>Figura 6- 4</b> Volcano plot de los perfiles transcriptómicos de EET8 y TSH 565 en respuesta a déficit hídrico.. ....	<b>116</b>
<b>Figura 6- 5</b> Cantidad de genes diferencialmente inducidos y reprimidos de forma significativa en los clones EET 8 y TSH 565 en respuesta al déficit hídrico.. .....	<b>117</b>
<b>Figura 6- 6</b> Cambio en la expresión de los genes entre clones bajo el tratamiento de déficit hídrico.....	<b>118</b>
<b>Figura 6- 7</b> Comparación entre genes diferencialmente inducidos y reprimidos de forma significativa entre los clones EET 8 y TSH 565 en respuesta al déficit hídrico.....	<b>119</b>
<b>Figura 6- 8</b> Categorías GO enriquecidas por los genes comunes inducidos entre los clones TSH565 y EET8 en respuesta al DH.....	<b>120</b>
<b>Figura 6- 9</b> Cambio en la expresión de los genes enriqueciendo la categoría regulación de la expresión génica, epigenética. ....	<b>121</b>

<b>Figura 6- 10</b> Categorías GO representadas en los genes comunes reprimidos entre los clones TSH565 y EET8 en respuesta al DH. ....	<b>121</b>
<b>Figura 6- 11</b> Categorías GO y rutas metabólicas enriquecidas por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH.....	<b>122</b>
<b>Figura 6- 12</b> Ruta de señalización MAPK enriquecida por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH.....	<b>123</b>
<b>Figura 6- 13</b> Ruta de transducción de señales mediada por hormonas enriquecida por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH. ....	<b>124</b>
<b>Figura 6- 14</b> Categorías GO representadas en los genes reprimidos en el clon TSH565 en respuesta al DH. ....	<b>125</b>
<b>Figura 6- 15</b> Categorías GO y rutas metabólicas enriquecidas por los genes inducidos en el clon EET8 en respuesta al DH. ....	<b>125</b>
<b>Figura 6- 16</b> Categorías GO representadas en los genes reprimidos en el clon EET8 en respuesta al DH. ....	<b>126</b>
<b>Figura 6- 17</b> Diferencia en la respuesta al tratamiento de déficit hídrico entre los clones EET8 y TSH 565 (EET8_DH_vs_TSH565_DH).....	<b>127</b>
<b>Figura 6- 18</b> Cambios en los perfiles de expresión de los genes diferencialmente expresados de forma significativa con un factor de cambio $\log_2FC \geq 2$ (inducido) y $\log_2FC \leq -2$ (reprimido) entre clones .....	<b>128</b>
<b>Figura 6- 19</b> Representación esquemática de la señalización dependiente e independiente de ABA durante la respuesta a estrés por déficit hídrico en cacao.. ..	<b>140</b>
<b>Figura 7- 1</b> Modelo de respuesta al DH del clon TSH 565.....	<b>159</b>
<b>Figura 7- 2</b> Modelo de respuesta al DH del clon EET 8.. ..	<b>162</b>

## RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol perenne tropical nativo de la cuenca Amazónica de América del Sur, de gran importancia económica debido a que, de sus frutos, se obtienen las semillas que son la materia prima de la industria chocolatera. Su cultivo representa el principal sustento económico de pequeños agricultores de varias regiones productoras de África, América Central y América del Sur. El cacao es sensible a los cambios en los patrones meteorológicos generados por el calentamiento global, y en los próximos decenios se prevé que la mayoría de las zonas de cultivo serán afectadas por el cambio climático con el aumento de la incidencia de los períodos de limitación hídrica en el suelo. Se caracterizó la respuesta de *T. cacao* al estrés por déficit hídrico empleando dos aproximaciones la fisiología y la transcriptómica. 1) Se llevó a cabo la caracterización fisiológica de la respuesta al déficit hídrico de siete clones evaluando los parámetros fisiológicos de relaciones hídricas, intercambio de gases y actividad fotoquímica del PSII. Para esto, las plantas fueron sometidas a dos tratamientos: riego a capacidad de campo y déficit hídrico por suspensión de riego hasta que el potencial hídrico de las hojas ( $\Psi$ ) alcanzó valores entre -3.0 a -3.5 MPa. Alcanzado este punto de máximo estrés, se reanudó el riego y se evaluó su recuperación. De esta caracterización se seleccionaron los clones EET8 e ICS60, por ser los más contrastantes en cuanto a sus parámetros fotosintéticos, junto con el clon TSH565 que mantuvo el mayor  $\Psi$  a pesar de la limitación hídrica. Estos clones fueron sometidos a una segunda evaluación fisiológica de la respuesta al estrés donde, además de los parámetros fisiológicos empleados en la primera caracterización, se evaluaron parámetros de crecimiento. Los resultados mostraron que EET8 fue el más afectado, presentando el  $\Psi$  más bajo, así como una mayor reducción en la fotosíntesis neta y afectación en el aparato fotosintético, lo que se reflejó en la mayor reducción en su crecimiento. En contraste, el clon TSH565 tuvo la mayor eficiencia en el uso del agua y la menor afectación en el aparato fotosintético y por lo tanto en el crecimiento. Con estos dos clones se realizó la 2) Caracterización molecular a nivel transcriptómico de la respuesta al déficit hídrico, para identificar genes candidatos de tolerancia a este estrés en cacao. Se empleó la secuenciación de ARN (RNAseq) a partir de ARNm total foliar de los clones mencionados. El análisis de expresión diferencial entre la condición de estrés y su respectivo control permitió identificar un número similar de genes diferencialmente expresados entre los dos clones, muchos de ellos compartidos, así como otros específicos de la respuesta de cada clon. El análisis de enriquecimiento funcional y de rutas metabólicas permitió evidenciar que la respuesta de tolerancia al estrés observada en el clon TSH565, estuvo relacionada con su capacidad para activar de forma específica genes de

respuesta a estrés, y de respuesta a estímulos, sobresaliendo la activación de rutas de señalización hormonal como la del ABA, la fosforilación de proteínas, o las categorías de unión a ácidos nucleicos y de funciones catalíticas, las cuales reflejan un importante proceso de reprogramación tanto de la expresión génica, como metabólica. El clon EET8 también toleró el déficit hídrico, las categorías funcionales enriquecidas estaban relacionadas con procesos metabólicos muy diversos, de biosíntesis y de respuesta a estímulos abióticos, bióticos y químicos. Además, en este clon se encontraron reprimidos algunos genes relacionados con la estabilidad del aparato fotosintético, las reacciones lumínicas de la fotosíntesis y el transporte de electrones en el fotosistema I, confirmando lo observado a nivel fisiológico en cuanto a afectación del aparato fotosintético debido al estrés. Se evidenciaron mecanismos comunes y específicos de respuesta a DH entre clones, permitiendo proponer un modelo de respuesta mediante la integración con las respuestas observadas a nivel fisiológico. Finalmente, esta caracterización integrada, permitió identificar una selección de genes candidatos que podrían estar relacionados con la tolerancia de *T. cacao* al déficit hídrico. Estos resultados representan un primer aporte al conocimiento de la respuesta transcriptómica del cacao al déficit hídrico, y el primer reporte de la caracterización de los mecanismos fisiológicos y moleculares de su tolerancia a este estrés abiótico. La caracterización de la respuesta de clones híbridos de importancia comercial, pero, sobre todo, el recurso genómico generado, así como los genes candidatos de tolerancia identificados, en espera de su validación, constituyen un insumo valioso para los programas de mejoramiento del cacao, en búsqueda de materiales más tolerantes a las nuevas condiciones climáticas.

**Palabras clave:** Déficit hídrico, perfil transcriptómico, tolerancia, sequía, fotosíntesis, intercambio de gases, estrés oxidativo, fluorescencia de la clorofila

## ABSTRACT

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a tropical evergreen tree native to the Amazon basin of South America, of great economic importance since the seeds are obtained from its fruits, which are the raw material for the chocolate industry. Its cultivation represents the main economic livelihood of small farmers in several producing regions in Africa, Central and South America. Cacao is sensitive to changes in weather patterns caused by global warming, and in the coming decades most growing areas are expected to be affected by the climate change with increased incidence of water-limited periods in the soil. The response of *T. cacao* to water deficit using two approaches: physiology and transcriptomics. 1) The physiological characterization of the response to water deficit of seven clones was carried out by evaluating the physiological parameters of water relations, gas exchange and photochemical activity of PSII. For this purpose, the plants were subjected to two treatments: irrigation at field capacity and water deficit by irrigation suspension until the leaf water potential ( $\Psi$ ) reached values between -3.0 to -3.5 MPa. Once this point of maximum stress was reached, irrigation was resumed, and recovery was assessed. From this characterization, clones EET8 and ICS60 were selected, as they were the most contrasting in terms of photosynthetic parameters, together with clone TSH565, which maintained the highest  $\Psi$  despite the water limitation. These clones were subjected to a second physiological evaluation of stress response where, in addition to the physiological parameters used in the first characterization, growth parameters were evaluated. The results showed that EET8 was the most affected, presenting the lowest foliar  $\Psi$ , as well as a greater reduction in net photosynthesis and impairment in the photosynthetic apparatus, which was reflected in the greatest reduction in growth. In contrast, clone TSH565 had the highest water use efficiency and the least impairment of the photosynthetic apparatus and thus growth. 2) Molecular characterization at the transcriptomic level of the response to water deficit was carried out with these two clones, to identify candidate genes for tolerance to this stress in cacao. RNA sequencing (RNAseq) was used from total leaf mRNA of the two the clones. Differential expression analysis between the stress condition and the respective control identified a similar number of differentially expressed genes between the two clones, many of them shared, as well as others specific to the response of each clone. Functional enrichment and metabolic pathways analysis suggested that the stress tolerance response observed in the TSH565 clone was related to its ability to specifically activate stress response genes and stimulus response genes, with the activation of hormonal signaling pathways such as ABA, protein phosphorylation, nucleic acid binding and catalytic functions, which reflect an important process of reprogramming of both gene expression and metabolic functions. The EET8 clone also tolerated water deficit, the enriched functional categories were related to very diverse metabolic processes,

biosynthesis, and response to abiotic, biotic, and chemical stimuli. In addition, some genes related to the stability of the photosynthetic apparatus, the light reactions of photosynthesis and electron transport in photosystem I, were found to be repressed in this clone, confirming what was observed at the physiological level in terms of the effect on the photosynthetic apparatus due to stress. Common and specific mechanisms of response to DH among clones were evidenced, allowing us to propose a response model by integrating the responses observed at the physiological level. Finally, this integrated characterization allowed the identification of a selection of candidate genes that could be related to the tolerance of *T. cacao* to water deficit. These results represent a first contribution to the knowledge of the transcriptomic response of cocoa to water deficit, and the first report on the characterization of the physiological and molecular mechanisms of its tolerance to this abiotic stress. The characterization of the response of cocoa clones of commercial importance, but, above all, the genomic resource generated, as well as the candidate tolerance genes identified, pending validation, constitute a valuable input for cocoa improvement programs, in search of materials that are more tolerant to the new climatic conditions.

**Key words:** Drought, Water deficit, Chlorophyll fluorescence, Gas exchange, Photosynthesis, Oxidative stress, Water potential, transcriptomic profile, tolerance

# Capítulo 1. Introducción y Objetivos

A nivel global, algunos modelos climáticos han proyectado un continuo incremento en las temperaturas, así como cambios en la distribución espacial y temporal de las precipitaciones, producto del aumento en la emisión de gases de efecto invernadero, que podría ocasionar un aumento de la aridez superficial y sequías, debido a la reducción de las precipitaciones y al incremento de la demanda evaporativa [1–3]. Por tal razón, se prevén sequías severas y generalizadas en los próximos 30 a 90 años en diferentes regiones del mundo, particularmente en el subtropical [4]. También, en las regiones tropicales, la intensificación del cambio climático ocasionaría efectos negativos en la agricultura, debido a una mayor incidencia del déficit hídrico del suelo [5].

*T. cacao* es un cultivo de gran importancia económica con un crecimiento marcado en su demanda y producción en las últimas décadas pues de sus semillas se obtiene la materia prima para la creciente industria alimentaria del chocolate así como para otros tipos de industrias, con nuevos países consumidores emergentes, que, conjuntamente, han contribuido a expandir el mercado [6,7]. El cacao es, después del café y el azúcar, el tercer producto agrícola de exportación más importante a nivel mundial, y uno de los que más beneficia económicamente a algunas de las zonas más pobres del mundo [8,9], por lo que en los países productores, se considera un cultivo generador de riqueza o bienestar.

Las principales zonas productoras de cacao están situadas en regiones tropicales de África, Asia, Centroamérica y Suramérica [10], en las que algunas investigaciones han encontrado que la producción y rendimiento de este cultivo pueden verse afectados por el impacto del cambio climático [11–14]. Esto, porque la producción de cacao se da en un sistema agrícola de bajos insumos, con escasas prácticas agronómicas, que depende de las precipitaciones como aporte hídrico, lo que incrementa su vulnerabilidad a las condiciones climáticas cambiantes [5,15]. Por esta razón, se hace imperioso generar conocimiento acerca de los rasgos fisiológicos y las bases moleculares de la respuesta o tolerancia de este cultivo a un estrés abiótico como el déficit hídrico.

Colombia, es el tercer productor de cacao en Latinoamérica, siendo uno de los renglones de exportación con mayor crecimiento en los últimos años. Este cultivo es de gran relevancia para los programas sociales implementados por los últimos gobiernos y que buscan aliviar la pobreza rural, promover la paz en zonas postconflicto y sustituir los cultivos ilícitos [16]. Además, el cacao colombiano ha sido clasificado a nivel internacional como fino de sabor y aroma, el cual representa solo el 5% de la producción mundial y el de mayor demanda para la industria chocolatera internacional, beneficiando a numerosas familias de pequeños agricultores, quienes son los principales encargados de su producción [8,17]. Sin embargo, en el país se registran bajas producciones que han sido asociadas a la edad avanzada de las plantaciones, a la incidencia de enfermedades que está ligada al inadecuado manejo fitosanitario, la escasa implementación de prácticas agronómicas y tecnificación del cultivo y la afectación por el cambio climático.

Además, la falta de recurso genético mejorado, junto con la ineficiente disponibilidad del recurso hídrico acrecienta la situación [3,8,15,18]. Adicionalmente, el escenario climático para el país y el mundo predice un incremento en la incidencia de los períodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo, debido a los cambios pluviométricos, que podrían ocasionar una reducción de las áreas cultivadas [13,14,19,20]. Actualmente es escasa la información o investigación sobre la tolerancia al déficit hídrico de los principales clones empleados comercialmente en el país, pues solo en un estudio publicado, se evaluaron algunos aspectos fisiológicos de tres de los 23 clones recomendados para los proyectos de desarrollo cacaotero [21,22].

No obstante, la afectación ocasionada por el déficit hídrico del suelo y las respuestas de tolerancia y susceptibilidad del cacao a esta condición se han venido caracterizando para algunos genotipos y en zonas específicas de producción, principalmente a nivel fisiológico, con unos pocos estudios enfocados también en la evaluación de la respuesta a nivel morfológico, bioquímico y molecular [23–28]. De esta forma, se conoce que el cacao es afectado negativamente por el déficit hídrico del suelo, que se presenta cuando la disponibilidad de agua es inferior a la capacidad de campo, lo que puede ser consecuencia de las precipitaciones insuficientes, de la no aplicación de riego, las variaciones en la temperatura del ambiente y suelo, la aplicación excesiva de sales minerales y la alta radiación, entre otros factores [13,14,19,20]. Bajo esta condición, la tasa de transpiración sobrepasa la tasa de absorción de agua por parte de las raíces, afectando el contenido de agua en los tejidos, al igual que los procesos metabólicos, ocasionando estrés en el cultivo [26,29]. Si se considera que la lluvia se ha mencionado como el factor ambiental más importante que influye en el rendimiento del cacao [5,30], el cual requiere una precipitación media entre 1.400 y 2.000 mm anuales<sup>-1</sup>, y que precipitaciones inferiores a 1.200 mm anuales<sup>-1</sup> ocasionan déficit hídrico en el suelo y una reducción de su crecimiento y rendimiento, la alteración en la distribución de las precipitaciones podría conllevar al incremento en la incidencia de los períodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo, causando una reducción de las áreas cultivadas de cacao puesto que además se reporta que la distribución anual de las precipitaciones es más importantes que la cantidad total anual [5,31].

Entre los países productores o consumidores que reportan estudios acerca de los efectos del déficit hídrico en genotipos de *T.cacao* se encuentran: Brasil [23,27,32–34], Venezuela [24,26,35–38], Ecuador [39,40], Reino Unido [41], India [42–48], Ghana [49–52], Indonesia [28,53–56], Colombia [21], Estados Unidos [57–61], y Nigeria [62]. En la mayoría de estos estudios se ha evaluado la respuesta a este tipo de estrés mediante la medición de diferentes parámetros fisiológicos de relaciones hídricas ( $\Psi$ , CRA), intercambio de gases ( $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i$ ,  $E$ ,  $EUA_i$ ), y actividad fotoquímica ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ , ETR), tanto en cultivos establecidos en campo, como en plantas jóvenes en vivero reportándose la reducción de los parámetros evaluados en las plantas sometidas al tratamiento de déficit [21,24,35,36,63,64]. En algunas de estas investigaciones se reporta la disminución en la tasa fotosintética de las

plantas ya sea en estado vegetativo o reproductivo, así como la afectación en la retención de cojines florales, de mazorcas jóvenes y maduras, y el llenado de las almendras, lo que finalmente tiene impacto negativo en el rendimiento del cultivo del cual se han reportado reducciones de hasta un 89% [6,26,65–68].

En estos estudios se describen algunos de los mecanismos de respuesta de *T. cacao* para contender el estrés por déficit hídrico, como el mecanismo de ajuste osmótico [11,23,26,36,53,55,56], así como la existencia de variabilidad genotípica en el desempeño fotosintético de esta especie y en la respuesta a déficit hídrico [24,36,43,69] y diferentes niveles de tolerancia a la sequía [37,44]. A nivel morfológico se ha encontrado la reducción de diferentes parámetros de crecimiento como el área foliar, la masa seca por órganos y total, y en la partición de asimilados, evidenciable mediante el cambio en la relación raíz/parte aérea [27,32,34,62]. En relación con la evaluación de la respuesta a nivel bioquímico, se ha evaluado el cambio en la actividad de las enzimas SOD, CAT, POX, GPX y PPO, encontrándose un incremento significativo en su actividad en respuesta al DH. Además se observó incremento en el contenido de ASH, prolina y compuestos fenólicos lo que se relacionó con un menor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fue asociado con una respuesta de tolerancia a la sequía [27,28,46,48,53]. Adicionalmente, a nivel molecular se evaluó la expresión de algunos genes de biosíntesis de poliaminas [25], reportándose su inducción en respuesta al déficit hídrico, por lo que se propusieron como candidatos para el mejoramiento genético de la tolerancia de *T. cacao* a este tipo de estrés. Finalmente, la expresión de los genes NCED y PP2C involucrados en la ruta de señalización dependiente de ABA y dos genes de proteínas de biosíntesis del fotosistema II (PsbA y PsbO), se encontraron reprimidos en genotipos de cacao tolerantes a la sequía [27].

Aunque a nivel fisiológico se ha evaluado la respuesta de *T. cacao* a la sequía, la información a nivel molecular de los mecanismos que soportan la respuesta de esta especie al estrés hídrico es muy escasa o prácticamente inexistente [25,27,70]. A pesar de contar con genomas de referencia secuenciados desde hace más de una década, a la fecha, y a nuestro saber y entender, no existen aún estudios que hayan empleado aproximaciones de genómica funcional como la secuenciación del ARN (RNAseq), para dilucidar la respuesta a este estrés abiótico en cacao [71–74]. Bajo este contexto, y considerando la complejidad de los mecanismos que se activan en respuesta al estrés por déficit hídrico, el gran poder de resolución de la transcriptómica, al abordar el primer paso de la expresión génica y fenotípica, aportaría información crucial para el entendimiento de dichos mecanismos que, además de complejos y diversos, poseen tanto una base genética como epigenética, articulando los diferentes niveles de la biología de una planta de forma integrada: molecular, bioquímico, morfológico y fisiológico.

Estos mecanismos están fundamentados en una respuesta de aclimatación, cuya base molecular consiste en una reprogramación de la expresión génica para la activación de diversas vías de señalización, factores de transcripción, genes reguladores, y múltiples genes efectores que determinan los distintos tipos o niveles

de respuesta al estrés [75,76]. A su vez, estas respuestas son variables entre una especie y otra y dependen de la duración e intensidad del estrés, y por ende, aún son poco entendidas en muchos cultivos como el cacao [77,78]. Al respecto, se han reportado diversos genes que se expresan en respuesta a la sequía por intermediación del ácido abscísico (ABA). El ABA se ha considerado como el fitorregulador del estrés puesto que participa en la vía señalización y transducción de señales, activando numerosos genes efectores por medio de una compleja red regulatoria génica y que, además, está involucrado en la regulación del cierre estomático como primera respuesta de las plantas al déficit hídrico para reducir la pérdida de agua por transpiración [79].

Este cierre estomático, sin embargo, reduce el intercambio gaseoso y la asimilación de CO<sub>2</sub>, lo que conlleva a la generación y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) principalmente en el cloroplasto y la mitocondria, con el consecuente daño oxidativo a los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y el aparato fotosintético [80,81]. Para contrarrestar el daño ocasionado y equilibrar los niveles de ROS, la reprogramación génica conlleva a la activación de los genes del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, proteínas de estabilización de las membranas, acuaporinas y otros genes implicados en la respuesta a estrés que contribuyen a la tolerancia. En esta respuesta, se han identificado genes conservados, así como específicos de cada especie. Dentro de los genes conservados se encuentran por ejemplo las proteínas de choque térmico (HSP), y proteínas LEA, que han sido empleadas en el mejoramiento genético de la tolerancia al estrés, no obstante, la respuesta a sequía es compleja y pese a su estudio principalmente en organismos (*Arabidopsis thaliana*) y cultivos modelo (arroz y maíz) no ha sido completamente dilucidada [82–86].

Así pues, la complejidad de los mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico, así como la integración de diversas rutas que determinan las respuestas fenotípicas de interés agronómico en cacao, requieren de la utilización de aproximaciones integradas que, al incluir plataformas de genómica funcional, generen nuevo conocimiento que logren acercarse cada vez más a las especificidades de la respuesta fenotípica y sus bases biológicas, permitiendo anticipar la búsqueda de soluciones y alternativas para los crecientes desafíos de la agricultura derivados del cambio climático [75]. El conocimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos, como base de la respuesta fisiológica de las plantas al estrés por déficit hídrico, permitirá a su vez la identificación de genes candidatos de tolerancia que puedan ser usados en programas de mejoramiento genético [11,87,88].

Teniendo en cuenta que las especies vegetales son catalogadas como tolerantes por su capacidad para responder a la condición de estrés y por su capacidad de recuperación después de rehidratación, tolerar estas condiciones adversas o recuperarse de los efectos asociados a la pérdida del equilibrio hídrico es de inmensa importancia en términos de mejoramiento y bajo el contexto de cambio

climático, en donde la búsqueda de alternativas para una agricultura que se adapte a las nuevas condiciones se vuelve uno de los desafíos para las próximas décadas [5,11,89].

Por esto, la presente investigación es también pionera y relevante para el sector cacaotero de Colombia, por lo que se espera que los resultados signifiquen un insumo importante para el desarrollo de investigaciones derivadas y encaminadas a entender y mejorar la tolerancia del cacao en las variedades más sembradas en el país.

En este estudio se llevó a cabo la caracterización de la respuesta al déficit hídrico en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) de importancia comercial para Colombia, y se identificaron genes candidatos de tolerancia. Para esto, se realizó la caracterización de la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico en siete clones híbridos de cacao (Capítulo 4). Seguidamente, se caracterizó la respuesta fisiológica al estrés por déficit hídrico en los tres clones de cacao que mostraron las respuestas más distantes (Capítulo 5). Luego, se caracterizó la respuesta transcripcional al estrés por déficit hídrico de dos clones con los fenotipos más contrastantes a nivel fisiológico y se identificaron genes candidatos de tolerancia en respuesta a estrés (Capítulo 6) . Estos resultados permitieron proponer un posible modelo de respuesta al DH para los clones de cacao evaluados y que presentaron los fenotipos más contrastantes (Capítulo 7).

## **1.1 Objetivo General**

Caracterizar la respuesta fisiológica, morfológica y molecular al estrés por déficit hídrico en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) e identificar genes candidatos de tolerancia

## **1.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar la respuesta fisiológica y morfológica al estrés por déficit hídrico en siete clones diferentes de cacao
- Caracterizar la respuesta molecular a nivel transcriptómico al estrés por déficit hídrico de dos clones con las respuestas fisiológicas más contrastantes
- Identificar una selección de genes candidatos de tolerancia a estrés por déficit hídrico

## **1.3 Preguntas de Investigación**

- ¿Existen diferencias en la respuesta fisiológica, y morfológica al estrés por déficit hídrico entre clones de cacao producidos comercialmente en Colombia?
- ¿Cómo difieren los mecanismos de respuesta molecular al estrés por déficit hídrico en cacao con respecto a lo conocido en plantas modelo?

## **Capítulo 2. Marco Teórico**

## 2.1 El cacao (*Theobroma cacao* L.)

### 2.1.1 Descripción botánica de *T. cacao*

La planta de *T. cacao* es un árbol leñoso, semicaducifolio, con hábito de crecimiento perenne. Presenta alturas inferiores a los 5 metros [90].

Presenta un tallo erecto del cual se ramifican 4 a 5 ramas con crecimiento horizontal que forman una horqueta o abanico. En el exterior, los tallos están cubiertos por una corteza oscura. Presenta hojas alternas de forma obovado-elípticas con longitud entre 20 a 35 cm y entre 4 a 15 cm de ancho [7]. El color de las hojas cambia durante la ontogenia debido a la acumulación de clorofilas, antocianinas y compuestos fenólicos que fluctúan durante la expansión foliar. Además, las hojas presentan estomas en la epidermis del envés [91]. Las flores producidas por *T. cacao* se forman de tejidos meristemáticos ubicados por encima de las cicatrices de las hojas del tallo principal y de las ramas leñosas. De las yemas axilares de los tallos se forman los denominados cojines florales dentro de los cuales se pueden diferenciar hasta 50 flores. Por su parte, cada flor está formada por 5 sépalos, 5 pétalos, 10 estambres y un ovario superior formado por cinco carpelos unidos. A pesar de que las flores se producen en gran número sólo unas pocas se convierten en fruto [66]. En esta especie, la polinización natural ocurre con ayuda de insectos.

El fruto de cacao es una drupa de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de ancho en cuyo interior se desarrollan de 30 a 60 semillas que están cubiertas por una pulpa azucarada y mucilaginosas [90]. El pericarpio del fruto (mazorca) es de color verde o rojizo cuando es inmaduro y cambia a colores amarillos o naranjas cuando maduran y la forma varía de acuerdo con cada grupo genético. El proceso desde su antesis hasta la maduración de frutos puede durar 150 días o más [65,66].

Las semillas que constituyen el órgano con importancia económica de la especie tienen de 2 a 3 cm de largo, son semejantes a una almendra, de color chocolate o purpúreo y sabor amargo con una cáscara carnosa y gruesa. La pulpa que las rodea contiene alrededor de 10-15% de azúcar [66]. Son ricas en proteínas, en materia grasa, así como en almidón y poseen un alto valor nutritivo. Tanto el color y forma de la semilla cambian acorde con el grupo genético [6].

La propagación de plantas de *T. cacao* puede ser por semillas y vegetativa. Cuando es por semillas se realiza en viveros o jardines clonales [92], aunque las semillas tienen periodo de viabilidad cortos y las plántulas obtenidas son altamente variables genéticamente, por lo que en países como Colombia se emplean las semillas para obtener el patrón de siembra por injerto [15]. En cuanto a la propagación vegetativa se realiza por diferentes métodos siendo la injertación el más recomendado para establecimiento de plantaciones comerciales, debido a que se logra una mayor producción, en menor tiempo y con un producto de mejor calidad, siempre y cuando se implementen adecuadas prácticas de manejo agronómico del cultivo [93].

Además, con este tipo de propagación se conservan las características de la planta madre que se desean reproducir sin la variabilidad asociada al uso de semillas. En este caso la selección del patrón o porta-injerto es muy importante al igual que la copa o la variedad que se quiere reproducir. El patrón ampliamente recomendado por su vigor, alta resistencia a enfermedades producidas por microorganismos del suelo y habilidad combinatoria es el IMC 67, también se recomiendan en Colombia los patrones P7, PA-46, y caucasia 39 y 43 [94].

### 2.1.2 Origen, distribución y clones empleados en Colombia

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol frutal diploide ( $2n=2x=20$ ) con un genoma relativamente pequeño (411Mb- 494Mb) que pertenece a la familia Malvaceae [72]. Es nativo de los bosques húmedos tropicales de Sudamérica entre las regiones del Amazonas y el Orinoco [7,95]. Hallazgos recientes en el sureste de Ecuador demuestran su uso desde la época precolombina por tres líneas independientes de evidencia arqueológica: granos de almidón de cacao, residuos de teobromina absorbida y ADN antiguo, de hace aproximadamente 5300 años atrás; este hallazgo a la vez revela a la región del alto Amazonas como el centro de domesticación del cacao más antiguo hasta ahora identificado [96]. También se ha descrito el uso de la semilla de *T. cacao* por los Mayas y los Aztecas, que la tostaban y molían para elaborar una bebida a la que denominaban *xocolatl*; hoy conocida como chocolate [66]. Actualmente las semillas o almendras de cacao no solo son utilizadas para la elaboración del chocolate, sino que además constituyen la materia prima para otros tipos de industrias por su calidad nutricional y gran versatilidad en los productos que pueden ser elaborados a partir de ellas como aceites, licor, manteca de cacao, pasta de cacao, cacao en polvo entre otros [6,7].

La diversidad genética del cacao se clasifica de acuerdo con su centro de origen y distribución geográfica, rasgos morfológicos, etno-botánicos, calidad física y sensorial en tres grupos principalmente: *criollos*, *forasteros* y *trinitarios*. No obstante, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación que consta de 10 grupos genéticos (Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional, Guyana) obtenidos de un análisis de genotipado con marcadores moleculares tipo microsatélites en el que se emplearon 1241 individuos de diversos orígenes geográficos y colecciones por lo que se considera que esta clasificación refleja con mejor precisión la diversidad genética disponible con fines de mejoramiento genético [97].

Los cacaos de tipo *criollo* son originarios del norte de América del sur y América Central, se dispersaron a través de los Andes hacia Venezuela, Colombia y Ecuador y hacia el norte a Centroamérica y México [65,98]. Son árboles de lento crecimiento, poco vigorosos y susceptibles a plagas y enfermedades. Producen frutos de forma variable (alargados y amelonados) de ápice acuminado y con pericarpio rugoso ó liso, ligeramente lignificados, de color rojo en estado maduro y verde en estado

inmaduro. El *criollo* se referencia como cacao fino debido al sabor y aroma que le confiere su alta calidad organoléptica, lo que lo hace especialmente interesante para los mercados más exigentes, como la industria de chocolates finos [65]. No obstante, solo el 5% de la producción mundial corresponde a este tipo de cacao debido a que es susceptible a patógenos y a estrés abiótico y presenta bajos rendimientos [7,66].

Por su parte los cacaos *Forasteros* proceden del Alto Amazonas, bajo Amazonas, Orinoco y Guyana [7,98] y se distribuyeron hacia el continente africano, constituyendo el tipo de cacao más cultivado a nivel mundial. Los árboles de este grupo genético presentan follaje grande y se describen como vigorosos, resistentes a enfermedades y altamente productivos. De acuerdo con la morfología del fruto, se clasifican como *calabacillo*, cuyos frutos tienen surcos superficiales y *amelonado* con fruto en forma de melón y la superficie casi lisa, poco rugoso y de surcos poco profundos [7,98]. El 70% de la producción a nivel mundial corresponde a este grupo genético, siendo los principales países productores Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún [7]. Sin embargo, debido a que su sabor no tiene la calidad del cacao criollo sus granos se comercializan a granel y a menudo son mezclados con granos de criollo para mejorar e intensificar su sabor [99].

El cacao *Trinitario* es originario de Trinidad y Tobago y procede de los cruces naturales entre criollos y forasteros [97]. Son heterogéneos, altamente variables con un amplio rango de caracteres morfológicos y fisiológicos por lo que las características del fruto pueden ser semejantes a las de los criollos y forasteros [90,100]. Tiene mayor sabor y aroma que el forastero y es más resistente a enfermedades que el criollo, razón por la que constituye la base para realzar el sabor del chocolate y representa el 10-15% de la producción mundial. Se ha reportado que este tipo de cacao sustituyó al cacao *criollo* por su resistencia a enfermedades y productividad en países como Venezuela [99]. Igualmente, híbridos de este tipo con características agronómicas deseables, se han propagado vegetativamente con el fin de preservar sus rasgos genéticos y fenotípicos como tamaño, productividad, y vigor entre otros [101]. Así mismo, considerando principalmente la productividad, resistencia a enfermedades y sus características organolépticas, estos clones se han distribuido en diversos países con fines comerciales [7].

En Colombia, por ejemplo, el cultivo de cacao se ha establecido empleando cacaos nativos, materiales genéticos híbridos provenientes de cruces entre clones trinitarios y amazónicos y, recientemente, clones altamente productivos que son empleados con el fin de reemplazar los cultivos envejecidos e incrementar el área sembrada en el país [15]. Estos clones se seleccionan con base en las recomendaciones de material genético clonal y patrones de injertación para el aprovechamiento comercial, definido por el Consejo Nacional Cacaotero (acuerdo N° 003 de julio de 2002), el cual está constituido principalmente por materiales híbridos trinitarios, dentro de los cuales los más sobresalientes son algunos ICS (Imperial College Selection), TSH (Trinidad selected hybrids), CCN51 (Colección Castro Naranjal),

EET (Estación Experimental Tropical) y materiales regionales como el FEAR 5 (Fedecacao Arauquita 5) [22].

Los ICS son los materiales trinitarios altamente recomendados para la siembra de mayor distribución y utilización a nivel mundial que fueron obtenidos por F.J. Pound entre 1933 y 1935 con el fin de obtener materiales resistentes a la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*). De éstos, el ICS 1 e ICS 95 se hibridaron con cacaos del alto Amazonas provenientes del Perú para desarrollar los TSH, los cuales constituyeron los nuevos híbridos resistentes a esta enfermedad. Estos clones se consideran como finos de sabor y aroma por la industria del chocolate, por lo que este programa de mejoramiento se reconoce como uno de los más exitosos en la historia del cultivo [102].

Igualmente, el clon CCN 51 desarrollado por H. Castro en los años sesenta, cruzando los materiales ICS 95 con el IMC 67 (Iquitos Mixed Calabacillo) y el Oriente 1 (material Amazónico ecuatoriano), es un recurso genético muy aprovechado en Ecuador y otros países de Latinoamérica. Este clon es altamente productivo, resistente a enfermedades y precoz, ya que inicia la producción a los 2 años luego de ser trasplantado a campo, no obstante, aunque su sabor es aceptable; no tiene la calidad del cacao fino y de aroma [103]. Otros materiales procedentes de Ecuador son los EET seleccionados de plantaciones nacionales como parte de un proyecto de mejoramiento que buscó la obtención de variedades más productivas, resistentes a enfermedades y con características de sabor fino y de aroma [104].

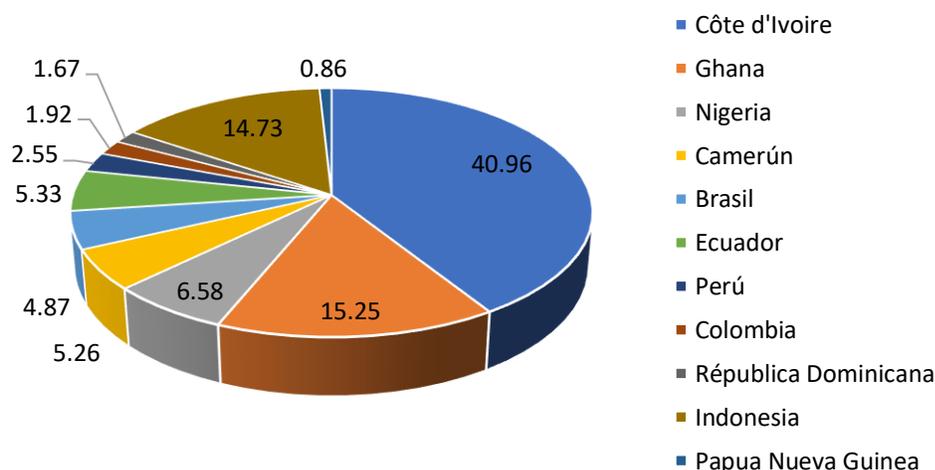
Finalmente, producto de un programa de selección en plantaciones locales de los departamentos Santander, Arauca y Antioquia, Fedecacao recomendó el clon FEAR 5 para su siembra comercial en el país por su resistencia a enfermedades, productividad, cualidades físicas y organolépticas [6,16].

Los materiales descritos poseen importancia económica para diversos países productores en el mundo, debido a su productividad, calidad y resistencia a enfermedades. La calidad de sus semillas los hace competitivos y relevantes para la industria de chocolatería y confitería, de la cosmética, de los productos farmacéuticos así como para la industria de productos bioactivos [6]; es de resaltar que sólo la cadena productiva cacao-chocolate genera miles de millones de dólares a nivel mundial [105].

### 2.1.3 Importancia económica

La producción mundial de *T. cacao* involucra aproximadamente 6 millones de pequeños productores de países en desarrollo de África, Asia, Latinoamérica y Oceanía (Figura 2.1.3-1) [5,105] que, entre 2018 y 2019 produjeron 5.3 millones de toneladas, con proyección de incremento en la producción en 2 millones de toneladas para el año 2020 [17,106].

A nivel de Latinoamérica Colombia ocupa el tercer lugar en producción de cacao, pues el cultivo es económicamente rentable para los agricultores debido a su alto valor para la exportación, especialmente del cacao fino de aroma que representa el 95% del cacao producido en el país [107]. El 90% de la producción de cacao en el país es obtenida por 65.341 familias de pequeños productores que en promedio siembran tres hectáreas cada una [107]. En el año 2019 se alcanzó una producción de 59.740 toneladas en un área sembrada de 183.487 Ha [107]. Esta producción aportó el 15% del cacao fino de sabor y aroma del total obtenido principalmente por países de Latinoamérica constituyendo entre el 5 al 8% de la producción mundial del cacao de este tipo [108]. En adición, en Colombia el cacao es cultivado en zonas de conflicto y de cultivos ilícitos por lo que su utilización ha sido fomentada y financiada con recursos públicos y privados o de índole internacional mediante la implementación de proyectos productivos que buscan fortalecer el desarrollo rural aportando oportunidades que mejoren las condiciones económicas de los productores en el marco del post-conflicto [15,107,109,110], y cuyo fin es aumentar la producción y el área sembrada; favoreciendo la exploración de nuevos nichos de mercado, especialmente los de exportación a países de mayor consumo y demanda de cacao [93].



**Figura 2.1.3- 1 Principales productores de cacao a nivel mundial.** Proporción (%) de cacao en grano producido por los principales países productores el año 2019. Elaboración propia basado en FAOSTAT (2021).

Los mayores consumidores en el mercado internacional de productos de cacao, son los países de Europa, seguidos por Estados Unidos y países de Asia y Oceanía [108]. Aunque se prevé que la demanda de cacao para el año 2025 se incremente, el potencial de expansión del sector cacaotero puede ser afectado por problemas asociados con la cadena de suministros, al igual que por la reducción en el rendimiento del cultivo, debido a la edad fisiológica de las plantaciones, el incremento en la temperatura en regiones de cultivo en los países productores e incluso la pobreza que afecta a la mayoría de los productores del cultivo [111].

En Colombia, la baja productividad del cacao se ha relacionado con tres condiciones particulares: 1) la avanzada edad de la mayoría de plantaciones, que las hace improductivas; 2) el inadecuado manejo fitosanitario de los cultivos que, asociado con condiciones generadas por el cambio climático y la ausencia de recurso genético mejorado, ha contribuido a incrementar la incidencia de enfermedades fúngicas; y 3) la baja ó ineficiente disponibilidad del recurso hídrico cuya tendencia es a aumentar como resultado del cambio climático [3,5,8,13,15,18]

#### **2.1.4 Ecofisiología del cultivo de cacao**

El hábitat natural de *T. cacao* son los bosques lluviosos tropicales de Sudamérica, por lo que ha sido establecido en regiones tropicales húmedas, con condiciones de sombra parcial no uniformes [65]. Morfológica y fisiológicamente la planta de cacao es afectada por factores ambientales como la altitud, la temperatura, la humedad relativa, la luminosidad, el tipo de suelo, y disponibilidad de agua en el suelo. La altitud recomendada para el cultivo esta entre los 400 y los 800 msnm; aunque en Colombia se establecen plantaciones entre los 100 y los 1400 msnm [90,95]. Debido a su cultivo en regiones tropicales y subtropicales, el rango de temperaturas soportadas por el cacao es mayor al de su hábitat natural [112]. Así, la temperatura media anual requerida para el crecimiento de esta especie se encuentra entre los 18 y los 28 °C, reportándose un rango en la temperatura base para el crecimiento vegetativo según el genotipo de entre 18 y 20.8 °C. Como temperatura óptima para la fotosíntesis se han documentado valores entre los 25°C y 35 °C [5,113], encontrándose que temperaturas por debajo de los 10 °C afectan el crecimiento [90,91]. Además, la humedad relativa requerida por las plantas de cacao se reporta en un rango entre 70 y 80%, considerándose bajas las HR comprendidas entre 50 y 60% y altas de 90 a 95% [65,95].

Respecto a la irradiancia de luz, se reporta que el cacao puede tolerar un entorno con baja intensidad de luz debido a su hábitat natural de sotobosque, por lo que el uso de esta debe ser muy eficiente [5,95]. Tradicionalmente el cacao se cultiva en sistemas agroforestales acompañado de especies que reducen la incidencia de la radiación solar [35,52,114–116] por lo que usualmente se han considerado como plantas tolerantes a la sombra [91,114] con una saturación de la tasa fotosintética (A) a bajas densidades de flujo fotónico fotosintético (200 – 300  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

1). Sin embargo, existen reportes de cultivos de cacao en plena exposición solar en los que la capacidad fotosintética de las plantas es mayor que en aquellos cultivados a bajas intensidades [114,115,117,118]. Se menciona que bajo este tipo de siembra el cultivo es más demandante de agua y nutrientes, pero es más productivo recomendándose en los casos donde existe la capacidad de incorporar tecnologías modernas y fertilización para el manejo de este [95,119,120]. Mientras que, el cultivo con sombreado permitiría un desempeño fisiológico y agronómico con producciones moderadas con menor inversión tecnológica [95]. Por lo que, se plantea que probablemente el *T. cacao* es una especie con la capacidad de aclimatarse a las condiciones ambientales en las cuales se encuentra y que esto permite que sea cultivado en sistemas de plena exposición solar [95,118].

En relación con el tipo de suelo, se reporta que las plantas de cacao crecen en diferentes tipos de suelos que sean profundos, livianos y ricos en nutrientes como los franco arenosos, franco limosos o franco arcillosos con un rango de pH entre 5.5 y 7.5 (óptimo 6.5) por lo que las plantas pueden tolerar suelos ligeramente ácidos o alcalinos. Estos deben ser bien drenados durante la época de lluvia y con buena retención de humedad durante el periodo seco, así como con alto contenido de materia orgánica que le permita retener humedad y aportar elementos minerales al cultivo [15,90]. Se ha documentado que aunque el cacao se puede cultivar en monocultivo, el sistema agroforestal en donde se cultiva en conjunto con otras especies (café, plátano, frutales, maderables) tiene la ventaja de permitir al agricultor la generación de ingresos alternativos, mientras se contribuye en la conservación del suelo y el ambiente puesto que estos sistemas son generadores de oxígeno y biomasa [15,90].

Finalmente, las precipitaciones son el factor ambiental de mayor relevancia en el cultivo del cacao pues garantizan la disponibilidad de agua en el suelo [31,95]. Es fundamental para el rendimiento de esta especie, que las lluvias estén distribuidas uniformemente durante todo el ciclo de crecimiento de las plantas con un promedio total entre 1500 a 2000 mm de agua por año [65,90]. Se reporta que menos de 1200 mm de agua por año y menos de 100 mm al mes en un periodo seco ocasiona déficit hídrico en el suelo y reduce el crecimiento y rendimiento del cultivo [5,31,95]. Igualmente, se ha documentado que las plantas jóvenes de cacao son sensibles a los cambios en el contenido de humedad del suelo y el estado hídrico de la planta sin poder recuperarse si se alcanzan niveles críticos de estrés por déficit hídrico [5,121].

Teniendo en consideración que la aplicación de riego en las plantaciones de cacao no es una práctica común, lo que hace que el cultivo dependa de las lluvias, la reducción de las precipitaciones podría ocasionar periodos de sequía prolongados que conlleven a una afectación en el crecimiento y la producción de las plantas [5,66]. Se reporta que la limitante hídrica es un problema actual de las regiones productoras de cacao por lo que la duración y severidad de los periodos secos se han convertido en un desafío para este cultivo que no está habituado a estas

condiciones ambientales pues difieren de su hábitat natural en la cuenca Amazónica [5,11].

## 2.2 Dinámica del agua en el suelo y la planta

El agua constituye más del 50% del peso fresco de la biomasa vegetal de las plantas leñosas e influye directa o indirectamente en los procesos fisiológicos [88]. Entre las funciones que cumple el agua en las plantas se incluyen: es el medio de soporte en el que tienen lugar todas las reacciones bioquímicas, permite la difusión y el flujo de solutos y es necesaria para el transporte y distribución de nutrientes minerales y metabolitos, y cumple funciones a nivel estructural y funcional [122]. Considerando la importancia del agua para las plantas el contenido hídrico dentro de la planta al igual que su flujo constante entre tejidos y órganos es de vital importancia para llevar a cabo todas las funciones fisiológicas, así como para que las plantas puedan responder a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico [123].

El transporte de agua a través de los diferentes compartimentos del continuo suelo-planta-atmósfera (SPA) depende de factores como: - el contenido y la disponibilidad de agua y el potencial hídrico ( $\Psi$ ), - los mecanismos que utiliza la raíz para extraer el agua disponible del suelo utilizando las rutas simplasto, apoplasto y transmembrana, - el gradiente de potencial hídrico entre el suelo, la planta y la atmósfera, - los mecanismos que utiliza la planta para el ascenso de agua y iones minerales por el xilema y para el movimiento del agua entre órganos en crecimiento y la transpiración [88,122].

El agua disponible en el suelo es absorbida por las raíces y aprovechada en procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de la plantas de acuerdo con la especie vegetal y el estado de desarrollo. Es así que para el adecuado funcionamiento de las células, tejidos y órganos, la planta requiere absorber volúmenes de agua contenidos en el suelo a capacidad de campo, lo que ocurre por osmosis en respuesta al gradiente de potencial hídrico [122]. El  $\Psi$  determina el intercambio de agua entre las diferentes partes de la planta, así como entre esta y el suelo [24,26,41,60,68]. Además, indica la cantidad de agua contenida dentro de los compartimentos de la célula y se mide como la energía libre del agua por unidad de volumen o capacidad de un sistema para realizar un trabajo [122,141].

La capacidad de campo (CC), una propiedad del suelo bajo la cual el  $\Psi$  es cercano a cero y las plantas pueden absorber con facilidad el agua. Se considera que un suelo está a capacidad de campo cuando se ha drenado por gravedad (aproximadamente 48 horas) luego de haber sido regado a saturación. Por el contrario, a medida que el suelo pierde agua el potencial hídrico se vuelve más negativo pudiendo llegar al punto de marchitez permanente (PMP) el cual constituye el contenido hídrico del suelo con el cual las plantas pueden marchitarse. Aunque el PMP depende de las plantas se considera que este punto se alcanza a

potenciales hídricos del suelo por debajo de -1.5 MPa. Además, se reporta que el agua que se encuentra entre la CC y el PMP se considera como el agua disponible para ser utilizada por la planta, aunque esta no es uniforme [88,122].

De esta forma un suelo a capacidad de campo tendrá un  $\Psi$  alto (cercano a cero; -0.5 MPa) el cual se reduce continuamente entre el suelo y las hojas (-0.8MPa), pues el agua se mueve hacia las regiones con bajo potencial hídrico o menor energía. Así, durante la extracción de agua por la raíz, el flujo masivo de esta a larga distancia desde la epidermis hasta la endodermis puede ocurrir por diferentes rutas; la ruta apoplástica en la que el agua y los minerales son transportados a través de la pared celular, los espacios de aire intercelulares y el xilema, sin cruzar membranas [88,122]. Mientras que, en la ruta del simplasto, el agua y los minerales se transportan de una célula a otra y al interior del citoplasma celular a través de los plasmodesmos, poros ubicados en la membrana plasmática encargados de conectar el espacio existente entre las células de los tejidos atravesando las paredes celulares. Una vez en el xilema, los minerales y el agua son transportados en sentido ascendente por acción capilar e igualmente impulsados por el gradiente de potencial hídrico y la corriente transpiratoria [123,124].

Por otra parte, en el transporte transmembranario, el agua entra secuencialmente de una célula a otra atravesando al menos dos membranas por cada célula, lo cual es de vital importancia para mantener la turgencia intracelular y el equilibrio del agua en cada nivel de organización [122,125]. En este tipo de transporte están implicadas las acuaporinas (AQPs) que forman parte de la superfamilia de proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (MIPs). Estas proteínas son transportadores transmembranarios que conforman canales proteicos para facilitar y regular el movimiento del agua y otras moléculas pequeñas (glicerol, urea,  $\text{CO}_2$ , ROS,  $\text{NH}_3$ ) a través de las membranas [126,127]. Las AQPs pueden regular la absorción de agua mediante la reducción o el incremento del flujo hídrico, abriéndose o cerrándose e incluso modulando su cantidad con cambios en la expresión génica [88,128]. Las MIPs se dividen en 5 subfamilias de acuerdo con la similitud en la secuencia de aminoácidos y de la localización intercelular. La subfamilia denominada PIPs (proteínas intrínsecas de la membrana plasmática) forma canales en la membrana plasmática y se reporta que intervienen en el incremento de la conductividad hidráulica de la raíz y las hojas [129], mientras que las TIPs (Proteínas intrínsecas del tonoplasto) forman canales en la membrana vacuolar (tonoplasto) funcionando como reguladores del flujo intracelular del agua y por lo tanto del turgor celular. Estas AQPs se han relacionado con el movimiento de agua como sustrato principal y se ha mencionado su implicación en la respuestas de las plantas al estrés por déficit hídrico, así como en procesos de osmorregulación, transpiración, y elongación celular. Además, debido a su importante función reguladora de las relaciones hídricas en las plantas, las AQPs son blancos potenciales de manipulación genética para el desarrollo de cultivos tolerantes al estrés [123].

Es así que, la E y el gradiente de  $\Psi$  tienen un rol fundamental en el movimiento del agua [122,125]. Igualmente, a través del continuo SPA el transporte del agua se

lleva a cabo en respuesta a fuerzas físicas en donde la presión hidrostática negativa generada por la transpiración de las hojas induce el movimiento del agua por el xilema impulsada por el gradiente de potencial hídrico. En ambientes secos y cálidos, las temperaturas son altas y la HR baja por lo que la demanda evaporativa de la atmosfera se incrementa y con ella la transpiración ocasionando la pérdida de agua en la planta; [122] bajo estas condiciones se produciría una reducción del contenido de agua en el suelo y si este no es rehidratado, podría producirse su desecación y la planta no podría extraer el agua necesaria para su desarrollo y morir [95].

Además, el transporte del agua en la planta también es impulsado por el crecimiento [130]. En este caso, el aflojamiento de la pared celular con la que comienza el crecimiento induce la relajación de la tensión de la pared, generando la reducción del potencial hídrico necesario para la absorción de agua y la expansión volumétrica de la célula. La célula en crecimiento es capaz de absorber agua constantemente debido a que la relajación de la pared celular mantiene a la célula ligeramente fuera del equilibrio en el potencial hídrico para mantener el flujo de agua [131].

Así pues, la disponibilidad de agua en el suelo es un factor determinante para el óptimo funcionamiento de las plantas, así como la capacidad y fuerza de este para retener la humedad contra la acción de la gravedad. No sólo el  $\Psi$  influye en el movimiento del agua desde el suelo a la planta, sino que también la conductividad hidráulica está implicada en la facilidad y velocidad del movimiento del agua y está depende del tipo de suelo y del contenido hídrico de este [88].

### **2.3 Estrés por déficit hídrico en las plantas**

El estrés vegetal se relaciona con la exposición de una planta a un factor externo (biótico ó abiótico) que en exceso o en déficit puede generar reducción en la tasa metabólica o del crecimiento y desarrollo y consecuentemente del rendimiento [132,133]. Son diversos los factores abióticos que pueden generar estrés en las plantas, no obstante, el estrés por déficit hídrico se presenta comúnmente y es considerado como uno de los principales factores limitantes de la producción de los cultivos [134–136]

Así pues, el estrés por déficit hídrico es la reducción en el contenido de agua de una célula ó tejido por debajo del contenido hídrico máximo, cuando la célula está completamente hidratada. Bajo este tipo de estrés, la tasa de transpiración excede la tasa de absorción de agua por parte de las raíces de las plantas, afectando el contenido de agua en las células y tejidos, al igual que los procesos metabólicos asociados [137,138]. Este estrés se presenta cuando la disponibilidad de agua en el suelo es inferior a la capacidad de campo como resultado de: precipitaciones insuficientes, suspensión y aplicación insuficiente de riego, bajas y altas temperaturas, o de la aplicación excesiva de sales minerales o fertilizantes.

Igualmente, cuando hay suficiente cantidad de agua en el suelo pero la planta no ha desarrollado las estrategias morfo-fisiológicas para absorberla se presenta el tipo de estrés conocido como sequía fisiológica o pseudo-sequía [139].

Con frecuencia la productividad de los cultivos es limitada por la ocurrencia de periodos de sequía ó por la insuficiente implementación de sistemas de riego que no garantizan las necesidades hídricas de las plantas. Como consecuencia de la insuficiente cantidad de agua en el suelo, el potencial hídrico se reduce a valores negativos no adecuados para las plantas y se genera plasmólisis celular, marchitamiento de órganos y hasta la muerte de las plantas acorde con los niveles de estrés y de sensibilidad y tolerancia de las especies vegetales al estrés por déficit hídrico. La tolerancia a este tipo de estrés ha sido evaluada a través del potencial hídrico, considerándose plantas tolerantes al estrés por déficit hídrico aquellas que a pesar de esta condición logran mantener altos  $\Psi$ .

Igualmente, el contenido relativo de agua (CRA) es un importante indicador del estado del hídrico dentro de órganos de la planta como la hoja, debido a que representa la cantidad de agua contenida en esta con respecto al volumen máximo que puede llegar a contener, también muestra si hay balance entre el suministro de agua en la hoja y la tasa de transpiración [88]. Debido a que está implicado en la absorción y el transporte de agua para mantener el volumen celular, el CRA puede reducirse bajo condiciones de baja disponibilidad de agua en el suelo [68,140]. Por esta razón, este parámetro también es empleado para determinar el estado hídrico de la planta bajo condiciones de estrés por déficit hídrico, puesto que, considera el efecto del ajuste osmótico realizado por la planta bajo esta condición como mecanismo de conservación de la hidratación de los tejidos. Algunos autores reportan que plantas tolerantes a este tipo de estrés tienen contenidos relativos de agua mayores con respecto a aquellas que no son tolerantes [87]. Sus valores oscilan entre 98% para hojas completamente expandidas de plantas bajo condición de irrigación y 30 – 40% para hojas secas y marchitas, sin embargo esto depende del genotipo, siendo típico que en torno al marchitamiento inicial se encuentren valores de 60-70% [132].

## **2.4 Efectos del déficit hídrico en las plantas**

En términos generales, bajo condiciones de déficit hídrico cuando el potencial hídrico del suelo es inferior al óptimo acorde con la especie vegetal, la planta experimenta reducción del crecimiento, desarrollo y rendimiento como resultado de la baja disponibilidad de agua requerida para que la planta pueda cumplir con los procesos asociados con: la captación y asimilación de iones minerales esenciales, la división, elongación y diferenciación celular, la fotosíntesis, la respiración, la translocación y acumulación de fotoasimilados entre los órganos vegetales incluyendo la modificación de la relación raíz/parte área por incremento del

crecimiento radical y la disminución del área y masa fresca foliar. Además se presenta la abscisión de órganos como hojas, flores y frutos, cierre estomático, y reducción en el intercambio gaseoso, lo que afecta el crecimiento y reduce el rendimiento [134].

### **Crecimiento y desarrollo; traslocación y acumulación de fotoasimilados.**

Cuando se presenta estrés por déficit hídrico, el potencial hídrico del suelo es bajo y la reducción en el crecimiento se da por la inhibición de procesos como la elongación celular y la síntesis de proteínas [125]. Bajo esta condición la tasa de expansión de las hojas se reduce mientras que la tasa de elongación de la raíz es menos afectada. Así, el transporte de asimilados hacia las raíces se incrementa, probablemente por la reducción del crecimiento de las hojas, lo que reduce el área foliar y con ella la superficie de evaporación e incrementa el crecimiento de las raíces. La disminución en el crecimiento de la parte aérea es consecuencia del cierre estomático regulado por el ácido abscísico (ABA), que busca evitar la pérdida de agua por transpiración a expensas de la reducción en la asimilación del CO<sub>2</sub> que reduce la tasa fotosintética.

### **Rendimiento.**

Al igual que el crecimiento, el rendimiento de los cultivos está regulado no sólo por las condiciones ambientales y por el genotipo sino por la disponibilidad de agua y nutrientes [88]. Así de todos los recursos que necesitan las plantas para su crecimiento y funcionamiento, el agua es el factor más limitante para la productividad agrícola, puesto que para producir un kilogramo de materia seca se pueden llegar a necesitar varios centenares de litros de agua [122]. Por lo tanto, bajo condiciones de estrés por déficit hídrico la limitante hídrica origina reducciones considerables en el rendimiento. En el caso del cultivo de cacao se ha documentado que el déficit hídrico del suelo ocasiona del 10 al 89% en el rendimiento de las mazorcas debido a que el agua proporcionada por las lluvias es el factor ambiental más importante que influye en el rendimiento del cultivo [5,11,14,55].

### **Captación de Minerales; División, elongación y diferenciación celular.**

Igualmente, bajo condiciones de déficit hídrico se reduce la concentración de nutrientes esenciales para el crecimiento de los brotes debido a la disminución en la absorción de estos nutrientes por la afectación en la tasa de difusión de ellos a través de la raíz. Esto, porque en un suelo seco, el aire sustituye al agua en los poros, haciendo que la ruta desde la masa del suelo a la superficie de la raíz se alargue. Por lo tanto, el potencial hídrico reducido en el suelo afecta la movilidad de los iones pues se restringe fuertemente su absorción incluso por encima de la absorción del agua. A su vez esta reducción en el suministro de nutrientes a la raíz reduce la síntesis de citoquininas y su exportación a las hojas, disminuyendo el

crecimiento de éstas. Las citoquininas promueven la división y expansión celular en las hojas, retrasan la senescencia, aumentan la capacidad fotosintética e incrementan la expansión de la hoja, por lo que bajo DH con la reducción en el suministro de nutrientes y la síntesis de citoquininas, los productos de la fotosíntesis se acumulan en las hojas haciéndose disponibles para su traslocación a las raíces.

## **Fotosíntesis**

Como se mencionó anteriormente, el agua es indispensable para todos los procesos fisiológicos de las plantas al igual que para su crecimiento y metabolismo. Se reporta que durante la fotosíntesis para fijar un kilogramo de carbono, las plantas deben transportar cientos de litros de agua, a través de las rutas apoplástica, la simplástica y la transmembrana [88,141].

De igual forma el proceso fotosintético requiere de la energía proporcionada por la luz solar la cual como partícula está compuesta por fotones que al ser absorbidos por pigmentos que componen los centros de reacción y las antenas colectoras de luz pueden impulsar una transformación física o química. Dentro del espectro electromagnético, la radiación lumínica utilizada por las plantas para fotosíntesis es la fracción denominada radiación fotosintéticamente activa (RFA) ubicada en el rango de longitudes de onda entre los 400 a los 700 nm que puede expresarse en términos de energía ( $\text{Watts m}^{-2}$ ) o en cuantos ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Cuando la RFA se expresa en términos de cuantos (cantidad de energía por unidad de área y de tiempo) se denomina densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF). De esta forma, durante el proceso de fotosíntesis la energía de la luz es utilizada para la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua con liberación de  $\text{O}_2$  [88,122].

El proceso fotosintético consta de dos tipos de reacciones coordinadas e interrelacionadas, las lumínicas y la de fijación o reducción del carbono. La etapa de absorción y conversión de la energía lumínica ocurre en los tilacoides, y la etapa de fijación de carbono ocurre en el estroma de los cloroplastos. En la primera etapa la energía lumínica es convertida en energía química por dos unidades funcionales denominadas fotosistemas [125,142]. La luz es absorbida por las antenas cosechadoras de luz (LHC, "light harvesting complexes") las cuales están conformadas por complejos pigmento-proteínas encargadas de transferir la energía de excitación a los centros de reacción de los fotosistemas, donde la energía es transformada mediante el transporte de electrones a través de una secuencia de reacciones de oxido-reducción entre moléculasceptoras y donadoras de electrones. El resultado de las reacciones lumínicas es el almacenamiento de la energía en las moléculas NADPH (poder reductor) y ATP (poder de enlace) requeridas en la etapa de reducción de carbono, en donde estos productos son utilizados para la asimilación del  $\text{CO}_2$  atmosférico mediante el ciclo de la reducción fotosintética del carbono (ciclo de Calvin) que conlleva a la síntesis de triosas fosfato

las cuales son compuestos precursores de diferentes tipos de moléculas orgánicas de importancia para las plantas [88,122,143]. En esta segunda etapa, la enzima rubisco (ribulosa -1,5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa) es la encargada de la fijación del CO<sub>2</sub> en el ciclo de Calvin, y, puede catalizar tanto la carboxilación como la oxigenación del sustrato RuBP (ribulosa 1,5-bifosfato) utilizando CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> respectivamente. En condiciones atmosféricas normales el ratio de carboxilación/oxigenación de la rubisco es 3:1, no obstante, en condiciones de bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> al interior del mesófilo de la hoja como las ocasionadas por el cierre estomático en respuesta al déficit hídrico, incrementa la concentración de O<sub>2</sub> y con ella la actividad oxigenasa de esta enzima en un proceso llamado *Fotorrespiración*. En él se consume O<sub>2</sub> y se emite CO<sub>2</sub>, además, es dependiente de la luz y utiliza la energía producida en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis [88,122].

El proceso fotosintético es afectado por ciertos factores asociados con las condiciones ambientales a las cuales están expuestas las plantas, como la luz, la temperatura, la humedad del aire, la disponibilidad hídrica y de nutrientes en el suelo, al igual que los niveles de CO<sub>2</sub> [88]. Respecto a este último, el suministro de CO<sub>2</sub> es crucial para este proceso debido a que este gas es el principal sustrato de la fotosíntesis; no obstante, antes de llegar al sitio de carboxilación por la rubisco en el mesófilo de las hojas, el CO<sub>2</sub> debe enfrentarse a las distintas partes de la hoja que representan resistencias foliares a la difusión de este gas, y dentro de ellas la conductancia estomática tiene un efecto predominante [88,125]. Por lo tanto, la apertura y cierre de estomas constituye la primera limitación para la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico que se denomina *limitación estomática de la fotosíntesis* [144]. Si no se presenta limitación por otros factores el incremento en la concentración de CO<sub>2</sub> se traducirá en el aumento de la tasa fotosintética. Sin embargo, la difusión del CO<sub>2</sub> a través de los estomas tiene un costo para la planta, puesto que la apertura estomática implica la pérdida de agua en forma de vapor durante la transpiración; aproximadamente de 100 a 1000 moléculas de agua se pierden por cada molécula de CO<sub>2</sub> que se fija y reduce en la fotosíntesis, lo que se constituye un factor crítico para las plantas en ambientes desfavorables [88]. Por lo que, bajo condiciones de déficit hídrico, el control estomático es de gran importancia para regular la pérdida de agua por la transpiración, no obstante, la fotosíntesis y con ella el crecimiento de la planta se reduce por la limitación en la difusión del CO<sub>2</sub>, a la vez que se incrementa la fotorrespiración por el aumento en la utilización del O<sub>2</sub> por la Rubisco.

Igualmente, el proceso fotosintético puede verse afectado por limitaciones de tipo *no estomáticas* que son de carácter bioquímico o fotoquímico y que se acentúan con la severidad del estrés por déficit hídrico [95,145]. Estas están relacionadas con la actividad de la enzima Rubisco, la limitación por regeneración de RuBP, y la limitación por la disponibilidad de NADPH y ATP (limitación por luz – transporte de electrones y reacciones lumínicas) [88,146]. La limitación por la actividad de la Rubisco se presenta cuando los niveles de CO<sub>2</sub> al interior del mesófilo son bajos (lo que ocurre bajo condiciones de déficit hídrico), puesto que el CO<sub>2</sub> y la RuBP son los

sustratos de esta enzima en el ciclo de Calvin y bajo esta condición la regeneración de RuBP se daría más rápidamente de lo que podría ser utilizada por la Rubisco. Al contrario, cuando se incrementan los niveles de CO<sub>2</sub> también aumenta la tasa fotosintética y la RuBP es utilizada por la Rubisco con mayor velocidad a la que puede ser generada, presentándose así una limitación debida a la regeneración de este sustrato (RuBP). A su vez, esta limitación está relacionada con la disponibilidad de NADPH y ATP puesto que la tasa de regeneración de la RuBP está dada por la tasa de producción de estas coenzimas en las reacciones lumínicas ocurridas en los tilacoides cuya generación es limitada por la luz [88,122,144]. Bajo DH el desbalance en el suministro y utilización del CO<sub>2</sub> conlleva a la acumulación de energía de excitación que no alcanza a ser incorporada en estos procesos, o la sobre reducción de los transportadores de la cadena transportadora de electrones, lo que puede conducir a fotoinhibición o daño en el aparato fotosintético.

Debido a lo anterior, el exceso de energía debe ser disipada: lo que ocurre es que durante la captación de la energía de la luz por las LCH de los fotosistemas I y II, las clorofilas presentes en los complejos antenas adoptan un estado de *singlete excitado* o *excitón*, pudiendo transferir la energía de excitación a los centros de reacción de los fotosistemas y generar un transporte de electrones que oxida el H<sub>2</sub>O y produce energía química que es almacenada en los compuestos NADPH y ATP necesarios para el ciclo de Calvin. No obstante, en condiciones de DFFF moderado (como en las horas del medio día) las plantas pueden experimentar fotoinhibición dinámica en donde la utilización de los cuanta se reduce sin modificar la tasa fotosintética [147] pero cuando las condiciones climáticas son extremas como un déficit hídrico severo se puede generar fotoinhibición crónica como resultado de un exceso de energía de excitación que debe ser disipado para prevenir el daño al aparato fotosintético y los efectos de la reducción de la actividad fotosintética por inactivación de los fotosistemas I y II [143].

En los cloroplastos la energía de excitación puede disiparse por las vías fotoquímica y no fotoquímica. La vía fotoquímica primaria se relaciona con la transferencia de energía de excitación entre las LCH y las clorofilas de los centros de reacción de los fotosistemas, es decir la fase fotoquímica de la fotosíntesis o de las reacciones lumínicas en las que la energía producida es consumida en la asimilación de CO<sub>2</sub> (ciclo de Calvin), este proceso utiliza alrededor del 97% de los fotones absorbidos [148]. Igualmente, se reporta que otros procesos como la fotorrespiración, y la reacción de Mehler también contribuyen a la disipación de energía debido a que consumen el NADPH y ATP acumulados [88,146]. De forma complementaria, la vía no fotoquímica comprende básicamente la disipación de la energía de excitación en forma de calor, que utiliza el 2.5% de los fotones absorbidos y el restante 0.5% de la energía de excitación se disipa como un fotón visible de menor energía denominado como *fluorescencia*. Estos tres procesos ocurren de forma simultánea por lo que el incremento en la eficiencia de uno de ellos ocasionará una reducción en la eficiencia de los otros dos [148]. Debido a que la emisión de la fluorescencia ocurre principalmente en el PSII, los cambios en su emisión son indicadores del

estado de este fotosistema por lo que la evaluación cuantitativa de la fluorescencia proporciona información sobre la tasa de transporte de electrones, el rendimiento y eficiencia cuántica del PSII (entre otros), al igual que de la ocurrencia de la fotoinhibición en el aparato fotosintético. Como el déficit hídrico afecta el funcionamiento de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis y por ende del PSII modificando la emisión de la fluorescencia, los cambios en esta han sido empleados para evaluar la respuesta y afectación de las plantas por este tipo de estrés [148,149]. Algunos de los parámetros empleados para obtener información acerca del funcionamiento del PSII se mencionan a continuación:

*Fluorescencia Basal ( $F_o$ ):* Es el nivel mínimo de fluorescencia que se registra luego de someter a la hoja a un pulso débil de luz modulada no actínica ( $0.1 \mu\text{moles de fotones m}^2/\text{s}$ ) para garantizar que la Quinona A permanezca completamente oxidada, es decir que los centros de reacción estén oxidados o abiertos al máximo, para que al someter seguidamente la hoja a un pulso corto de luz actínica de alta densidad de flujo fotónico (varios miles de  $\mu\text{moles de fotones m}^2/\text{s}$ ) la quinona A se reduzca al máximo y se obtenga la fluorescencia máxima ( $F_m$ ), en la cual la quinona A estaría completamente reducida por lo que se hace referencia a que los centros de reacción del PSII estarían cerrados.

*Eficiencia máxima del quantum del PSII ( $F_v/F_m$ ):* El rendimiento o eficiencia cuántica de un proceso hace referencia al número de moléculas que experimentan el proceso dividido por el número de fotones absorbidos por el sistema, en este caso el ratio entre la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_o$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) es usado para estimar el rendimiento cuántico máximo de la reducción de la Quinona A. Es decir, el número de fotones absorbidos por el PSII cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos (oxidados) y que son utilizados para la reducción de la QA. Este coeficiente refleja una correlación con el porcentaje de centros de reacción funcionales del PSII, por lo que se considera que su reducción es un indicativo de la pérdida de función a nivel del aparato fotosintético. Su reducción se ha asociado a procesos de foto protección [149,150].

*Tasa de transporte de electrones (ETR):* Es la tasa de transporte de electrones que se mueven a través del PSII [149,151].

*Rendimiento cuántico fotoquímico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ):* este coeficiente indica la proporción de luz absorbida que es dirigida al PSII para impulsar el proceso fotoquímico, reflejando la eficiencia de las antenas colectoras de luz para atrapar luz, por lo que su disminución implicaría que las antenas colectoras redujeron su capacidad de captura por sobre reducción de los centros de reacción del PSII e incremento en la densidad de flujo fotónico. Se reporta que existe una relación directa entre este y el rendimiento en la asimilación de carbono en condiciones normales, debido a que la mayoría de los electrones en el fotosistema II se utilizan en el proceso fotosintético. Sin embargo, bajo condiciones de estrés dicha relación no podría establecerse de forma directa particularmente en plantas C3 por las altas

tasas de fotorrespiración y otros desvíos de la transferencia de electrones, como la reacción de Mehler y el flujo cíclico de electrones en los fotosistemas [149,151].

## **Respiración**

En el proceso de la respiración principalmente los carbohidratos sintetizados mediante la fotosíntesis son oxidados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  a través de un conjunto de reacciones celulares en donde la energía liberada es transformada principalmente en ATP y utilizada para el crecimiento de la planta, el mantenimiento de las estructuras existentes, el transporte de metabolitos y iones, la regeneración de proteínas y los procesos de reparación. Además, este proceso genera compuestos de carbono intermediarios que son precursores de diversos compuestos de gran importancia para las plantas [88,122]. Se ha documentado que la tasa respiratoria es proporcional a la tasa de crecimiento, así cuanto más rápido sea este último mayor será la proporción de respiración destinada al crecimiento. Esto, porque la respiración puede ser de dos tipos, de crecimiento y de mantenimiento. El primero refleja los costos de carbono asociados a la producción de ATP (energía metabólica) utilizado durante la biosíntesis y la generación de biomasa (crecimiento) y el segundo refleja los gastos de energía que no están destinados al incremento en la biomasa, como el mantenimiento en la estructura de las membranas, el recambio enzimático, y la incorporación y transporte de nutrientes [88].

Se ha reportado que, bajo condiciones limitantes del crecimiento, las raíces pueden respirar el 70% de los fotoasimilados que reciben de la parte aérea para promover el crecimiento de estas y explorar mayor volumen de suelo, aumentando así la captación de agua y nutrientes, en este caso la respiración se destinaría a procesos de mantenimiento de las raíces. También el recambio de proteínas y el mantenimiento de los gradientes de solutos representan un alto costo de mantenimiento para las plantas por lo que factores como el déficit hídrico que producen un incremento en la concentración o recambio de proteínas, así como el aumento de la permeabilidad de las membranas conllevarían al incremento en la respiración de mantenimiento. Así pues, aunque el déficit hídrico puede incrementar la demanda por la energía respiratoria, cuando el carbono usado para el crecimiento se reduce más que el ganado para la fotosíntesis, la exposición prolongada a este tipo de estrés puede ocasionar que la respiración se reduzca debido a la disminución en la asimilación del carbono y el metabolismo asociado al bajo crecimiento en esta condición. Así mismo, en las hojas la reducción de la respiración se presenta con la disminución en el potencial hídrico asociado con el bajo requerimiento de energía para el crecimiento o la exportación de fotoasimilados [125].

## **Estrés oxidativo**

Tal como se ha mencionado, en consecuencia al estrés por déficit hídrico la capacidad fotosintética de las plantas se reduce y la absorción de energía lumínica excede la tasa de utilización de esta, generándose una sobre reducción de los transportadores de la cadena de electrones con la consecuente acumulación de energía de excitación no disipada, que favorece el incremento de la fotorrespiración, así como la oxidación del  $O_2$  en la reacción de Mehler (cadena de transporte de electrones) conllevando a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), (mejor conocidas por sus siglas en inglés como ROS) que pueden conllevar a daño oxidativo en el PSII, ocasionado *estrés oxidativo* [88,152].

Las ERO son moléculas pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareados, que son citotóxicas y afectan negativamente el metabolismo debido a que pueden oxidar componentes celulares como lípidos de membrana, proteínas, y ácidos nucleicos ocasionando la peroxidación de lípidos de membrana, la destrucción de proteínas y posibles mutaciones [81,95,153]. Igualmente, se reportan que las ERO pueden inhibir los procesos de reparación del PSII, particularmente la síntesis de la proteína D1 [125].

Estas moléculas pueden ser de radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y las no-radicales como es el caso del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y pueden producirse tanto en condiciones normales como en condición de estrés en diversos lugares de la célula como el peroxisoma (fotorrespiración), los cloroplastos, las mitocondrias, y el citoplasma [154]. Su nivel de producción difiere entre condiciones, siendo bajo en condiciones no estresantes con un incremento drástico en condiciones de estrés que altera la homeostasis celular. También, se ha descrito su participación en la vía de transducción de señales que controlan los procesos de crecimiento, desarrollo, respuestas a estrés abiótico y muerte celular programada [155]. En la ruta de transducción de señales influyen en la activación de canales de cationes ( $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ) y actúan como segundos mensajeros que desencadenan una cascada de procesos biológicos como el cierre estomático, el crecimiento de los pelos radicales y la adquisición de tolerancia a estrés biótico y abiótico [81]

## **2.5 Mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico**

La respuesta de las plantas al estrés depende de diversos factores como el tipo de estrés, la duración e intensidad, el genotipo y el estado fenológico. Cuando la respuesta de la planta es rápida y reversible, es decir transitoria se considera como una *aclimatación* y se relaciona con mecanismos metabólicos de tolerancia para sobreponerse a las condiciones estresantes. Mientras que cuando la respuesta está relacionada con modificaciones que se manifiestan continuamente en la fisiología y

morfología de la planta pues son permanentes y por lo tanto heredables, se trata de una *adaptación* la cual se da por procesos de presión de selección durante varias generaciones [88,137,156].

La respuesta al estrés por déficit hídrico es compleja, e implica la activación de genes relacionados con los mecanismos moleculares, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos responsables de las alteraciones estructurales y funcionales fenotípicas (aclimatación) que permiten a las plantas acomodarse a las condiciones estresantes [85,157–159]. Así, por ejemplo, bajo condiciones de déficit hídrico el marchitamiento de las hojas disminuye tanto la pérdida de agua como la exposición a la luz incidente reduciendo el estrés. Además, bajo esta condición ocurren cambios en el ciclo celular, en el sistema endomembranas y en la arquitectura de la pared celular conducente a una mayor tolerancia al estrés. A nivel bioquímico, el metabolismo es alterado para la producción de compuestos osmoreguladores que contribuyen en la sobrevivencia al estrés y a nivel molecular ocurren eventos que vinculan desde la percepción de la señal de estrés con las respuestas genómicas que conllevan a la tolerancia [122].

En términos generales la respuesta al estrés ocurre en cuatro fases: en la primera fase que corresponde al estado de *alarma*, las plantas reaccionan ralentizando o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas y reduciendo su actividad fotosintética. En esta fase se activan mecanismos de defensa cuyo propósito es adecuar el metabolismo a las condiciones estresantes, activar mecanismos de reparación del aparato fotosintético, así como la ocurrencia de cambios necesarios a nivel morfológico para lidiar con el estrés. Para esto la señal de estrés debe ser percibida y amplificadas en una señal intracelular que luego es integrada en rutas de señalización y transducción de señales que terminan con la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés cuyos productos son los responsables de los mecanismos que les permiten a la planta superar esta condición. En muchos casos con esta respuesta de alarma, la planta logra volver a un nuevo equilibrio en donde se supera el estrés y la alarma desaparece. De esta forma, se considera que la planta entra en la fase de *resistencia*, en la cual el metabolismo celular se ha acomodado a las nuevas condiciones alcanzando un nuevo estado fisiológico para la condición de estrés, en la que se encuentra siendo ese el grado de resistencia máxima que puede lograr, pero si la situación estresante permanece durante un período de tiempo excesivo, se produce el agotamiento de la capacidad de resistencia y la planta puede entrar en la fase de *agotamiento* irreversible que puede terminar con su muerte, pero si por el contrario, el estrés termina la planta puede entrar en una fase de *regeneración* de las funciones fisiológicas acorde con las condiciones en las que se encuentra [137,160,161].

De acuerdo con Basu et al., [162] las plantas han evolucionado para desarrollar una serie de adaptaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares que les permiten soportar el estrés causado por condiciones extremas de déficit hídrico, lo cual se

evidencia por la gran diversidad de las especies vegetales cultivadas en regiones con condiciones de sequía severa [134].

Básicamente, los mecanismos o estrategias activados por las plantas para hacer frente al estrés por déficit hídrico se dividen en dos tipos entre los que se encuentran el aplazamiento de la desecación también conocido como *mecanismo de evitación* y la *tolerancia a la desecación*. El primero consiste en la capacidad de las plantas de mantener la hidratación de los tejidos a través del mantenimiento de un alto potencial hídrico en los mismos mediado principalmente por el ajuste osmótico. Entre este se encuentran especies vegetales que maximizan la absorción de agua a través de sistemas radicales profundos (*derrochadores*) y otras que minimizan la pérdida de agua por cierre rápido de estomas y sensibilidad a la reducción del potencial hídrico, paredes celulares poco elásticas, hojas con menor área foliar y bajas tasas de transpiración (*ahorradores*) [162]. El segundo mecanismo conocido como de *Tolerancia a la desecación* se relaciona con la capacidad de mantener o reanudar la actividad metabólica normalmente durante la deshidratación y en donde predominan, aparte del ajuste osmótico, cambios morfoanatómicos (crecimiento radical, abscisión de hojas), además de mecanismos defensivos y de reparación celular, que le permiten a la planta conservar la homeostasis incluso a bajos potenciales tisulares de agua [137,160,163]. Algunos autores refieren un tercer mecanismo denominado *escape* en el que las plantas completan su ciclo vital antes que se presente el déficit hídrico severo, durante el cual la progenie se encontraría en forma de semilla, incluyendo aquí aquellas especies capaces de entrar en dormancia vegetativa parcial en el período de estrés [137,164].

A nivel fisiológico, la respuesta de evitación ante un estrés moderado involucra la activación de cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento para mitigar la falta de agua y utilizarla más eficientemente, como la limitación específica de la expansión foliar, el crecimiento del sistema radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, la senescencia parcial de tejidos, el desarrollo de órganos de almacenamiento de agua y el cierre de estomas a expensas de la disminución de la fotosíntesis e incluso se estimula la abscisión de hojas como mecanismo extremo para evitar la deshidratación. Además, en los tejidos radicales, se activan otros fitoreguladores como el ácido giberélico y las auxinas, fitoreguladores que estimulan el crecimiento y elongación de las raíces con la finalidad de que la planta logre aumentar su capacidad de captación de agua [29,75,85]. Sin embargo, cuando a pesar de estos ajustes, la percepción del estrés se mantiene por la severidad del déficit hídrico, las mismas vías de señalización activadas en la fase de alarma activan otra serie de genes responsables de la expresión de proteínas protectoras y acumulación de metabolitos para la protección contra el daño celular que conducen a la tolerancia a la deshidratación [75,76,137,161,165]. La síntesis y traslocación del ABA cumple un rol fundamental en la mediación de ambos mecanismos de respuesta, puesto que participa en las vías de activación de los genes efectores de la respuesta al estrés por déficit hídrico, así como en la regulación del cierre estomático [75,88].

### 2.5.1 Tolerancia al estrés por déficit hídrico: Rol del ABA en la respuesta

Como se mencionó anteriormente, la activación de los mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico inicia con la percepción del estímulo estresante por parte de proteínas osmosensoras o sensores hidráulicos localizados en la membrana plasmática (AHKs, WAKs, RLKs, PERKs) que detectan estímulos físicos derivados del cambio de turgencia en las células por la pérdida de agua y se induce la síntesis de ABA, el cual por la ruta de señalización y transducción de señales dependiente de este fitorregulador determina la percepción de la señal por parte de los receptores de membrana y transduce dicha señal por vías de señalización celular en las que intervienen proteínas quinasas como AthK1, fosfolipasas, y mensajeros secundarios como el calcio y ROS entre otros. Los mensajeros secundarios participan en la nivelación de la concentración intracelular de  $Ca^{+2}$  y activan proteínas quinasas encargadas de desencadenar una cascada de fosforilación y desfosforilación de proteínas que terminan activando la expresión transcripcional de genes de respuesta a estrés por medio de la activación de factores de transcripción de las familias AREB (ABRE – binding proteins) o ABFs (ABRE- binding factors) que interactúan con elementos *cis* reguladores del tipo ABRE (ABA-responsive element), mientras que en por una ruta de señalización independiente de ABA se activan factores de transcripción del tipo DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) cuyos elementos *cis* reguladores son los DREB1y2/CBF (DRE-binding protein/C-repeat binding factor). Estos factores de transcripción y elementos reguladores se encuentran altamente conservados en diferentes especies de plantas [76,85,161] y los productos de sus genes blanco de activación son los encargados de los mecanismos directos de protección celular (proteínas efectoras), así como, de la regulación transcripcional de genes (proteínas reguladoras) involucrados en la respuesta a estrés [166]. (se amplía la información en la siguiente sección)

El ABA es un sesquiterpenoide cuyo proceso biosintético a partir de la zexantina ocurre en cinco pasos entre los plastidios y el citoplasma en donde intervienen las proteínas ABA1, ABA4, NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase), ABA2 y ABA3, por otra parte, su catabolismo por degradación oxidativa es mediado por la familia de citocromos P450 CYP707A (Abscisic acid 8'-hydroxylase 2) o por conjugación con glucosa [75,167]. EL ABA es considerado como el fitorregulador del estrés pues su concentración incrementa hasta 50 veces en respuesta a la sequía [122]. Este fitorregulador interviene en la mediación de una respuesta “rápida” o de corto tiempo, así como, en la respuesta “lenta” o de largo tiempo al estrés. La respuesta rápida se efectúa en las hojas de las plantas en donde promueve el cierre estomático como un mecanismo fisiológico para evitar la deshidratación de los tejidos por evapotranspiración. Se reporta que esta respuesta ocurre en segundos o pocos minutos por la activación de los canales de aniones tipo S y la inhibición de los canales de influjo de  $K^{+}$  como los KAT1. Mientras que, la respuesta lenta ocurre en el transcurso de algunos minutos u horas y está relacionada con la vía de

señalización y transducción de señales que involucra los factores de transcripción tipo AREB que conduce a la tolerancia a sequía [168,169]. En estas respuestas los transportadores de la membrana plasmática pertenecientes a la familia NTR1/PTR y que son miembros de los transportadores ABC (ATP-binding cassette) cumplen un rol fundamental en el transporte del ABA dentro y fuera de las células, el ABA se exporta desde los tejidos vasculares donde es sintetizado y es importado hasta las células guarda donde facilita el cierre estomático [75,79,167].

De esta forma, los niveles de ABA en las células guarda incrementan en respuesta al estrés por déficit hídrico activando el gen SLAC1 (S-type anion channel 1) a través de su fosforilación por la proteína quinasa independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  OST1/SnRK2 (open stomata 1/SNF1-related protein kinases 2s) así como por las proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia CPK. Básicamente una vez el ABA se une a los receptores intracelulares PYL/PYR/RCARs/ (pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like/regulatory component of ABA receptors), incrementa su interacción e inhibición de las proteínas PP2Cs (protein phosphatase 2Cs), lo que permite la activación de las proteínas quinasas OST1/SnRK2 y otros mecanismos de señalización como ROS y  $\text{Ca}^{2+}$  que junto con las quinasas dependientes de calcio activan los canales de aniones, canales permeables de  $\text{Ca}^{2+}$ , y canales de eflujo de  $\text{K}^+$  inhibiendo las bombas de  $\text{H}^+$  y los canales de influjo de  $\text{K}^+$ . Esta salida de iones de las células guarda además de la pérdida de agua a través de las acuaporinas ocasionan una reducción del turgor de estas células y se produce el cierre estomático que evita la pérdida de agua durante la sequía [167,170]. A parte de los canales de aniones, las quinasas fosforilan factores de transcripción de genes de respuesta a estrés cuyos productos (proteínas y moléculas) son capaces de prevenir el daño ocasionado por este. Al contrario, en ausencia o bajas concentraciones de ABA las PP2Cs se activan e inhiben la activación de OST1/SnRK2 y de canales de aniones como el SLAC1 [75,79].

Además, se reporta la implicación del ABA en la regulación de la conductividad hidráulica ( $L_p$ ) y el crecimiento de las raíces durante el estrés por déficit hídrico. Se considera que en la regulación de la conductividad hidráulica el ABA está involucrado a través de la regulación de la actividad de las acuaporinas puesto que para facilitar la absorción de agua durante la fase temprana de sequía es necesario el incremento de la permeabilidad del agua, mientras que en una sequía más prolongada la alta permeabilidad puede resultar en la pérdida de agua de los tejidos de la raíz al suelo [79]. Igualmente, se reporta que la conductividad hidráulica de la raíz podría afectar las relaciones hídricas en la hoja pues se ha observado que la reducción de la  $L_p$  en la raíz resulta en la disminución en mayor proporción de esta en la hoja [79,171]. En relación con el crecimiento de la raíz se ha reportado que los niveles endógenos de ABA lo promueven, lo que permite a la raíz crecer a niveles más profundos para incrementar la absorción de agua durante el déficit hídrico. También se reporta que el ABA puede interactuar con otros fitorreguladores de crecimiento y rutas de señalización (ROS, etileno, auxinas) para ajustar la arquitectura de la raíz [167].

Debido a la implicación del ABA en diferentes procesos clave del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la respuesta a estrés, el tiempo y alcance de la vía de señalización dependiente de este fitorregulador son regulados mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la ubiquitinación [172]. Así, la abundancia de las proteínas de los componentes claves en la vía de señalización es regulada mediante la ubiquitinación en el núcleo que conduce a una degradación dependiente del proteosoma 26S, mientras que la ubiquitinación en la membrana plasmática conlleva a una degradación vacuolar [167]. Por lo tanto, los receptores de ABA, al igual que los factores de transcripción activados por la vía dependiente de este fitorregulador y otras proteínas sufren degradación proteosómica por diferentes ligasas ubiquitinas como las ligasas E3 de dominio RING RLS1, RGLG1/5 y KEG al igual que por las ligasas E3 UBOX PUB12/13 [167]. Se ha reportado la sobreexpresión de varios genes de E3 ligasas en genotipos tolerantes de Té sugiriéndose un posible rol de adaptación al estrés por déficit hídrico mediante el control de la señalización dependiente de ABA. Además, se mencionó la posible implicación de las E3 ligasas en la regulación del tráfico de acuaporinas a la membrana plasmática en los genotipos tolerantes como un mecanismo de regulación del nivel de acuaporinas durante la sequía mediado por la ubiquitina [173].

### **2.5.2 Principales genes implicados en la tolerancia al déficit hídrico**

Se considera que los genes inducidos durante la condición de estrés funcionan principalmente en la protección de las células frente al déficit hídrico para la producción de metabolitos de crucial importancia en esta respuesta, así como en la regulación de los genes implicados en las rutas de transducción de señales en la respuesta al estrés por déficit hídrico [86,174]. En la sección anterior se describieron diversos genes relacionados en algunos procesos en los cuales el ABA está implicado, a continuación, se mencionan otros genes involucrados en mecanismos y procesos con un rol fundamental en la respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico.

**Transportadores.** De gran relevancia en la respuesta de adaptación de las plantas al estrés por déficit hídrico es el sistema de transporte a través de la membrana plasmática el cual se produce de forma pasiva o activa dependiendo de la necesidad energética. El transporte pasivo se produce mediante canales y portadores, mientras que el activo depende de transportadores primarios y secundarios los cuales requieren la hidrólisis del ATP y el gradiente de iones respectivamente para que se produzca el paso de solutos a través de las membranas [170]. Como se mencionó anteriormente, la regulación del cierre estomático depende del transporte de ABA (transportadores ABCG) y del movimiento de iones osmoreguladores a través de la membrana de las células guarda, así como del movimiento del agua mediado por los canales de agua formados por las acuaporinas. Además, el

transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  es igualmente relevante en esta respuesta, así como en el desencadenamiento de la ruta de señalización inducida por el déficit hídrico y el ABA en donde se incrementa la producción de ROS como el peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el calcio se acumula en el citoplasma gracias a los canales permeables de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en el tonoplasto y la membrana plasmática. Los genes pertenecientes a las familias TPC1 (Two-pore channel 1), CNGC (cyclic nucleotide-gated channel) y GLR (glutamate receptor-like) codifican estas proteínas requeridas para el transporte de calcio.

De igual forma, los canales de aniones S- type (slow-activated sustained) como el SLAC1 y R-type (rapid-transient) como el QUAC1/ALMT12 (quick anion channel 1/aluminium-activated anion channel 12) están implicados en la depolarización de la membrana plasmática, mientras que la inhibición de los canales de potasio (KAT1/KAT2) y la ATPasa  $\text{H}^+$  previene la hiperpolarización de la membrana plasmática. Se reporta a la familia de transportadores ABC como reguladores centrales de los canales permeables de calcio así como de los canales de aniones tipo-S en la membrana plasmática de las células guarda [170]. Igualmente, el eflujo de potasio impulsado por la depolarización de la membrana es facilitado por los canales GORK (guard cell outward-rectifying  $\text{K}^+$ ) cuya inhibición ocasiona defectos en el eflujo de potasio y una tasa reducida de cierre estomático. Además, se reporta que las proteínas KUPs ( $\text{K}^+$  uptake permeases) localizadas en la membrana plasmática de las células guarda, en las células de la punta de la raíz y en los tejidos vasculares actúan como simportador de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  y su sobreexpresión en Arabidopsis se asocia con la tolerancia a sequía [76].

Los transportadores de la familia ABC tipo G también están implicados en el transporte de cera y cutina dos componentes claves de la cutícula de las plantas, la cual es un componente de la pared celular que cubre todas las partes aéreas de estas. La cutícula protege la planta de condiciones ambientales desfavorables como la sequía, específicamente mediante la limitación de la transpiración no estomática [170]. El incremento en la acumulación de ceras cuticulares se ha asociado con tolerancia a sequía y respuesta a ABA [175,176]. En relación con el transporte de los componentes de la cutícula, el tráfico de cera y precursores de cutina se da desde el retículo endoplasmático (RE) a través de la membrana celular y la pared celular hasta la superficie de la planta, y, el movimiento de cera dentro de la célula requiere un tráfico de vesículas mediado por redes del aparato de Golgi [177,178]. Este flujo de los componentes cuticulares se da a través de la membrana plasmática mediante algunos miembros de la familia de transportadores ABC, los que en asociación con miembros de la familia LTP (lipid transfer proteins) crean un ambiente para el eflujo de cera [179].

Igualmente, durante el estrés por déficit hídrico la regulación de la absorción de agua por las raíces, al igual que el incremento en el crecimiento de esta, son estrategias de las plantas para hacer frente a esta condición, que son activadas mediante la promoción del crecimiento de la raíz a través de la asociación del ABA con las auxinas, y de la regulación de la conductividad hidráulica en donde el ABA

interactúa con las acuaporinas. En el primer caso, diversas familias de transportadores actúan como reguladores del transporte de auxinas y los cambios morfológicos de la raíz [170]. Así por ejemplo, a pesar de que las moléculas de auxinas pueden entrar a las células de forma pasiva éstas también son transportadas por la actividad simporte- $H^+$  de las permeasas de la membrana plasmática de la familia AUX1/LAX (Auxin resistant 1/like AUX1), mientras que algunos transportadores de la familia ABC subclase B están implicados en el influjo y eflujo de auxinas, al igual que las proteínas integrales de membrana de la familia PIN (PIN-FORMED) que actúan como exportadores de este fitorregulador de crecimiento vegetal [180]. Además, el transporte de auxinas puede ser modulado por la traslocación de  $K^+$  con lo que las plantas pueden controlar la apertura estomática y los cambios en la morfología de la raíz [170]. Así mismo, el flujo del agua a través de la superficie de la raíz es mediada por el ABA y la sequía mediante cambios en la conductividad hidráulica de la raíz la cual se reduce en condiciones de déficit hídrico para prevenir la pérdida de agua por transpiración, proceso en el cual las acuaporinas especialmente las PIP y TIP expresadas en las raíces y también en las hojas tienen un rol relevante. La expresión de estas acuaporinas puede inducirse o reprimirse en respuesta a déficit hídrico, así por ejemplo las PIP se han encontrado reprimidas bajo esta condición lo que se atribuye a reducir la pérdida de agua, por el contrario, la sobreexpresión de las TIP se ha asociado con la tolerancia a sequía por el incremento en la elongación de la raíz traducido en el aumento de la absorción de agua y una alta permeabilidad del agua en el tonoplasto [181,182].

Por otra parte, los altos niveles de los solutos osmoreguladores bajo condiciones de estrés se alcanzan mediante la alteración del metabolismo o el transporte, puesto que el movimiento y distribución fuera y dentro de las células de estos compuestos es regulado por transportadores de membrana como, por ejemplo, los transportadores de prolina que pertenecen a las subfamilias AAP (amino acid permease), LHT (lysine-histidine transporters) y ProT (proline transporter), esta última implicada también en el transporte de GB; y en el caso de los azúcares se referencian como las principales familias de transportadores los MST (monosaccharide/polyoltransporters), SUT/SUC (sucrose transporters/carriers) y SWEET [170,183].

De igual relevancia en la respuesta al estrés, el tráfico endomembranas está ligado con las rutas de señalización en las cuales se encarga de suplir la demanda de cambios acelerados en el proceso celular para asegurar la entrega correcta de las moléculas de carga implicadas en la respuesta a estrés [184]. De esta manera, los receptores de membrana, las enzimas, los fitorreguladores de crecimiento y los canales iones se movilizan dentro de las células para ser entregados en a sus destinos celulares o extracelulares cuya entrega es mediada por portadores vesiculares/tubulares que se forman en las membranas de los donantes y empaquetan selectivamente la carga al igual que la maquinaria de proteínas necesarias para una correcta selección. Estos portadores se forman por la actividad

de las proteínas de revestimiento citosólico que son reclutadas en sus membranas objetivo y deforman esas membranas en forma de botones o vesículas. Es la interacción específica entre las subunidades de revestimiento reclutadas y las secuencias peptídicas cortas en las proteínas carga las que dirigen la incorporación de la carga en la vesícula [185]. Las rutas de tráfico de la membrana inician en el RE y luego pasan por el aparato de Golgi y por la red trans-Golgi (TGN) para su posterior clasificación en la membrana plasmática y apoplasto o a los endosomas y vacuolas/lisosomas a través de: la ruta secretora biosintética, la ruta endocítica y la ruta de transporte vacuolar. De esta forma en la ruta secretora se transportan las proteínas recientemente sintetizadas desde el RE a la membrana plasmática y el espacio extracelular, mientras que la ruta endocítica funciona en la recirculación de los factores extracelulares y localizados en la membrana plasmática entre esta última y los compartimentos endosomales, y ,en la ruta vacuolar se da el transporte de las proteínas recientemente sintetizadas a la vacuola [186]. Algunos genes que codifican proteínas con diferentes funciones en el tráfico endomembranas se han identificado por su participación en la respuesta a diversos tipos de estrés como el ocasionado por el déficit hídrico. Así por ejemplo el gen SYP121 participa en la entrega de proteínas carga a la membrana plasmática como la acuaporina PIP2;7 e interactúa con los canales de K<sup>+</sup> y regula su actividad para promover la absorción de K<sup>+</sup> o los genes FREE1 y VPS23a implicados en la interacción con los receptores PYL de ABA para mediar su clasificación vacuolar y degradación. Revisar [184] para mayor información.

**Factores de transcripción.** Los FT son un grupo de proteínas reguladoras que se unen de forma específica a elementos *cis* reguladores del ADN, denominados *enhancers* o *silencers*, localizados tanto en la cercanía de los promotores de los genes, como en forma mucho más alejada, activando o reprimiendo la expresión de sus genes blanco. Estas proteínas contienen un dominio de unión al ADN y un dominio de activación transcripcional por lo que el primero permite la unión específica con los elementos *cis* reguladores de los genes blanco, mientras que el segundo media la regulación transcripcional por interacción proteína/proteína, bien sea de forma directa con el complejo de preiniciación de la RNAPolimerasa II eucariótica, o en asociación con otras proteínas del denominado complejo mediador [187]. La red reguladora génica determinada por los FT cumple un rol importante en las vías de regulación jerárquica y específicas de respuesta a estrés, por lo que se han podido proponer algunos FT como reguladores “master” de la respuesta a estrés y sus genes han sido empleados exitosamente en mejoramiento biotecnológico de la tolerancia al estrés [85,187]. En el caso del estrés por déficit hídrico, se han identificado seis principales familias o subfamilias de FT encargados de regular la expresión de los genes implicados en esta respuesta: MYB, MYC, DREB/CBF, ABF/AREB, NAC, y WRKY, así como algunos elementos *cis* reguladores localizados en las regiones reguladoras de los genes de respuesta estrés, siendo los principales involucrados en la vía independiente y dependiente de

ABA los DRE/CRT y los ABRE, respectivamente, aunque existen otros elementos *cis* como los elementos acoplados 1 y 3 (CE1,3- coupling elements<sub>1,3</sub>) que son similares a los ABRE [75,76,86,174]. No obstante, estos FT también tienen un rol crucial en la interacción entre las vías de respuesta a otros tipos de estrés como el frío y el calor reportándose, entrecruzamiento entre la ruta de señalización mediada por ABA y otros factores de señalización en la respuesta a estrés, así como la implicación de otros fitoreguladores de crecimiento como el ácido jasmónico (JA), el etileno, las auxinas, las giberelinas (GA), las citoquininas, las estrigolactonas y los brasinoesteroides (BR) [85,188–192]. Es de gran interés la aplicación de técnicas de ingeniería genética para incrementar la tolerancia a estrés en plantas, siendo la manipulación de genes reguladores como los FT, una estrategia prometedora para modular la expresión de un gran set de genes implicados en esa respuesta [193].

Así, por ejemplo, los FT AREB/ABF (ABA-responsive element binding protein/ABRE binding factor) actúan en la regulación de la expresión génica dependiente de ABA, cuyos genes de respuesta a déficit hídrico son regulados por los elementos *cis* ABRE (ABA-responsive element) y que, para funcionar, requieren estar en proximidad con otras copias de ABRE o con los elementos CE. Además, estos FT son una subfamilia de la familia de factores de transcripción bZIP (basic leucine zipper) que se expresan principalmente en respuesta a ABA y estrés osmótico [85,192]. Se ha reportado que la sobreexpresión de FTs del tipo AREB incrementa la tolerancia a sequía, así como la sensibilidad al ABA [194–196]. Por su parte los FT DREB/CBF (Dehydration-responsive element binding protein 1/C-repeat binding factor) actúan en la regulación de la expresión de genes de respuesta a sequía independientemente del ABA mediante su unión a los elementos *cis* reguladores DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) ubicados en las regiones reguladoras de los genes de respuesta a la deshidratación. Los DREB/CBF son una subfamilia de la familia de factores de transcripción AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive element-binding factor) en las que se identificó dos grupos en *Arabidopsis* DREB1/CBF y DREB2. De estos, se observó que el DREB1/CBF mejora la tolerancia a sequía, salinidad y congelamiento, aunque su expresión constitutiva ocasiona defectos en el crecimiento a menos que este bajo el control del gen del promotor RD29A [85,192]. Se reporta que este FT confiere tolerancia a diferentes tipos de estrés como sequía, salinidad y frío en diversas especies como arroz, papa, sorgo, tabaco y tomate, mientras que el DREB2 se ha encontrado inducido en respuesta a estrés osmótico y confiere tolerancia a la desecación [86,197,198]. Así mismo, las proteínas NAC (NAM, ATAF, CUC) son FT específicos de plantas con una variedad de funciones en el desarrollo y la respuesta a estrés por lo que aquellos que se han implicado en esta respuesta y en la tolerancia se han clasificado como SNAC (stress-responsive NAC) y se pueden unir a la secuencia NACR (NAC recognition sequence). Se reporta que la sobreexpresión de genes de este tipo en *Arabidopsis* y arroz mejoran la tolerancia a sequía y salinidad [157,199,200], al igual que en tabaco [201] y también en arroz a estrés producido por calor, altas temperaturas y estrés oxidativo [202]. Además, se reporta que los FT MYC y MYB regulan la expresión génica en respuesta a ABA bajo condiciones

de déficit hídrico [192], así como que los FT MYB tienen un dominio de unión al ADN conservado llamado MYB que se caracteriza porque tiene una a tres secuencias imperfectas de aminoácidos repetidas (R1,R2,R3) a partir de las cuales se clasifican en R1-MYB, R2R3-MYB y R1R2R3-MYB. Estos FT también están implicados en la respuesta a sequía, salinidad, frío y deshidratación [187,203]. Recientemente se ha reportado que la sobreexpresión de un FT del tipo R2R3-MYB (SiMYB56) del mijo (*Setaria italica*) una especie con alta tolerancia a sequía incrementó la tolerancia a este estrés en plantas de arroz en estado vegetativo y reproductivo [204] al igual que la sobreexpresión del gen de arroz OsMYB6 confiere tolerancia a sequía y salinidad en esta especie cuyas plantas mostraron mayor contenido de prolina, así como altas actividades de las enzimas CAT y SOD [205]; similarmente [206] encontraron que la sobreexpresión del GmMYB84 incrementa la tolerancia a sequía en soya proponiendo su interacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y enzimas antioxidantes para controlar el crecimiento de la raíz tanto en condiciones normales como de déficit hídrico. Por otra parte, los FT MYC pertenecen a la familia de FT bHLH (basic-helix-loop-helix) y algunos genes inducidos por el ABA que tienen motivo de unión MYC en sus promotores se han encontrado en gran proporción en las células guarda [192]. Se reporta que los MYC tiene un rol crucial en la respuesta mediada por el JA regulada por el estrés abiótico como el ocasionado por la sequía y la salinidad [207]. Finalmente, los FT WRKY constituyen una amplia familia en las plantas que pertenecen a la superfamilia de FT dedos de zinc (*zinc finger*) y contienen un motivo altamente conservado WRKYGQK en la región N-terminal y un motivo *zinc-finger-like* en la región C-terminal. Su participación en la respuesta estrés ha sido ampliamente caracterizada [208–210], y la sobreexpresión de estos genes se ha relacionado con el incremento de la tolerancia a sequía y otros estreses abióticos por lo que se proponen como genes prometedores para el mejoramiento de la plantas a esta condición [192,207]. En cacao se reportó la caracterización genómica de estos genes y se evaluó su expresión en plantas infectadas con *M. perniciosa* mediante la técnica RT-qPCR reportándose algunos genes con respuestas relevantes para futuras caracterizaciones [211]. Además, se propusieron estos factores de transcripción como marcadores genéticos moleculares involucrados en la resistencia a enfermedades para ser empleados en el mapeo de QTL (*quantitative trait loci*) para el desarrollo de genotipos resistentes a enfermedades como escoba de buja, Moniliasis, y la pudrición parda [212].

**Quinasas.** De crucial importancia en la respuesta a estrés son los genes que codifican las proteínas localizadas en la membrana plasmática y que funcionan como receptores y sensores de las rutas de señalización transmitiendo información a sus proteínas blanco en el citoplasma mediante procesos catalíticos como la fosforilación. Con esta función se han descrito diferentes proteínas quinasas como las RLKs (receptor-like kinase) las cuales poseen diversos dominios extracelulares como los LRR extension-like y los cysteine-rich involucradas en la detección de la señal hidráulica y transducirla en la cascada de señalización intracelular. A su vez,

las RLKs que se unen a la pectina en la pared celular son denominadas WAKs (cell-wall associated kinases) y median la homeostasis celular del agua mediante el control de la expansión celular. Mientras que se presume que las PERKs (proline-rich extension-like receptor kinases) perciben la integridad de la membrana, a través de la presión de turgor, se identificó en *Arabidopsis* la AHK1 (histidine kinase 1) que se confirmó tiene dicha función [75,76].

Igualmente, se han identificado otras proteínas quinasas que cumplen un rol crucial en la transducción de señales ambientales y de procesos de desarrollo como es el caso de las MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) uno de los grupos más grandes de transferasas que catalizan la fosforilación de sustratos de proteínas en los residuos serina o treonina [213]. La transducción de señales a través de la cascada de señalización MAPK involucra tres tipos de quinasas: las MAPKKKs (Mitogen-activated protein kinases kinases kinases) también denominadas como MAP3Ks o MEKKs, las MAPKKs (Mitogen-activated protein kinases kinases) o MP2Ks o MEKs y las MAPKs (Mitogen-activated protein kinase) o MPK cuya activación se produce se forma secuencial a través de la fosforilación. Así la primera MAPKKK es activada por la estimulación de los receptores de la membrana plasmática y ésta mediante la fosforilación de dos residuos de serina o treonina activa a la segunda MAPKK la cual fosforila a la tercera MAPK y esta última activa diversas proteínas efectoras en el citoplasma o el núcleo incluyendo otras quinasas, enzimas o factores de transcripción. Se han identificado cascadas MAPK específicas asociadas con la respuesta a sequía así como en otros tipos de estrés, al igual que su implicación en la interacción entre rutas de señalización mediada por fitoreguladores de crecimiento, por lo que se considera que cumplen un rol fundamental en la respuesta de las plantas al estrés abiótico [213–215].

**Sistema antioxidante.** Durante el estrés por déficit hídrico las plantas cierran los estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración ocasionando una reducción en la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en las células del mesófilo que reduce la utilización del poder reductor en el aparato fotosintético lo que en consecuencia aumenta la cesión de energía de excitación al oxígeno molecular promoviendo la formación de ROS [146]. La acumulación de las ROS conlleva a estrés oxidativo que causa daño celular, no obstante, estas moléculas también tienen roles importantes en diferentes procesos y mecanismos de las plantas por lo que su concentración debe mantenerse a niveles (baja/moderada) no tóxicos para las células [81]. Debido a esto, las células poseen un sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático muy eficiente que se encarga de mantener el equilibrio de las ROS bajo condiciones estresantes y que a su vez ayuda a las plantas a evitar los efectos deletéreos ocasionados por el daño oxidativo mediado por estas moléculas. Así pues, los antioxidantes enzimáticos están conformados por un grupo de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD: elimina el anión superóxido), la ascorbato peroxidasa (APX: elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes compartimentos), la glutatión reductasa (GR: regeneración del glutatión), la catalasa (CAT: elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los

peroxisomas), la peroxidasa (POX: neutraliza  $H_2O_2$  no eliminado por CAT), la Polifenol oxidasa (PPO: eliminación de ROS), GPX (guaicol peroxidasa) y la glutatión S-transferasa (GST: eliminación de ROS en conjugación con glutatión). Por su parte, de los antioxidantes no enzimáticos hacen parte el glutatión (GSH), el ácido ascórbico (ASH), los carotenoides, el  $\alpha$  – tocoferol, compuestos fenólicos, la prolina, aminoácidos no proteicos y alcaloides [81,146,154].

Se han realizado diferentes estudios sobre el rol del sistema antioxidante en la respuesta de tolerancia a diferentes tipos de estrés [202,216–219]. En cacao por ejemplo, se reportó un incremento de más del 88% en la actividad de las enzimas CAT, SOD y POX en plantas sometidas a déficit hídrico lo cual se asoció con una respuesta de Tolerancia [48]. Igualmente, en un estudio realizado en Indonesia con clones de cacao sometidos a diferentes intervalos de riego se atribuyó mayor tolerancia a sequía a los clones que mostraron un mayor aumento en la actividad de la SOD, así como en el contenido de ASH, prolina y compuestos fenólicos lo que se relacionó con un menor contenido de  $H_2O_2$  [28]. Mientras que Dos santos et al. (2014) [27] reportaron un incremento en la actividad PPO y GPX en genotipos moderadamente tolerantes y susceptibles a déficit hídrico, por lo que en base a esta información no fue posible separar los genotipos por su respuesta de tolerancia.

**Osmoprotección.** Dentro de los genes activados para hacer frente al déficit hídrico se encuentra un grupo responsable del *ajuste osmótico* el cual se define como el incremento neto en el contenido de solutos por célula que es independiente de los cambios en el volumen que resultan de la pérdida de agua por lo que en este proceso el potencial hídrico es reducido sin que ocurra una disminución del turgor celular [122]. Básicamente este ajuste se da por un incremento en diversos solutos como azúcares, ácidos orgánicos, iones inorgánicos (principalmente  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) y aminoácidos; aunque el incremento de iones está restringido a las vacuolas puesto que podrían inhibir la actividad enzimática en el citoplasma. Así pues, en el citoplasma se acumulan solutos compatibles (osmolitos) para mantener el equilibrio del potencial hídrico dentro de la célula. Estos solutos son compuestos orgánicos sin carga específica que no interfieren con el funcionamiento de las enzimas. Se reporta que estos compuestos son osmoprotectores puesto que pueden actuar como osmolitos reajustando el potencial hídrico intracelular o como compuestos protectores que estabilizan la estructura de las membranas y las macromoléculas lo que ocurre en condiciones de estrés osmótico. Dentro de los osmolitos comúnmente acumulados está la prolina (aminoácido), los azúcares alcoholes (sorbitol y manitol) y el aminoácido cuaternario glicina betaína (GB) [88,122].

Así pues, el mecanismo de ajuste osmótico busca restablecer la homeostasis y el equilibrio hídrico celular involucrando transportadores de iones, acuaporinas y enzimas encargadas de sintetizar solutos compatibles que reducen el potencial osmótico intracelular permitiendo una mayor capacidad de las células para la absorción de agua y el mantenimiento del turgor lo que les permitiría continuar con

la elongación celular y facilitar una mayor conductancia estomática a bajos potenciales hídricos; razón por la que se considera que este mecanismo es una aclimatación que incrementa la tolerancia de las plantas a la deshidratación [75,162].

Se reporta que la prolina se acumula en proporción al grado de sequía enfrentado por la planta, al igual que a parte de su rol como osmolito para el ajuste osmótico, la prolina contribuye en la estabilización de las estructuras subcelulares como membranas y proteínas eliminando radicales libres y amortiguando el potencial redox celular. Además, se ha reportado la inducción del gen P5CS (pyrroline-5-carboxylate synthetase) que codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de prolina bajo condiciones de estrés abiótico, así como que su sobreexpresión ocasionó un incremento en la acumulación de prolina y resistencia a estrés hídrico y salino en tabaco. También se menciona que la acumulación de este osmolito es mayor en genotipos tolerantes que en los sensibles al estrés [220].

Los niveles de acumulación de Glicina betaína se han correlacionado con la tolerancia al estrés. Se reporta la implicación de la GB en la estabilización de la estructura cuaternaria de enzimas y proteínas, así como en la protección de la maquinaria fotosintética, la inducción de genes cuyos productos están relacionados con la tolerancia al estrés, la reducción en los niveles de ROS bajo condiciones de estrés y la regulación de la actividad de los canales de iones ya sea de forma directa o por la protección de la membrana plasmática [220,221].

Así mismo, los azúcares protegen las células mediante la promoción de la vitrificación de su contenido lo que reduce la posibilidad de colapso de la célula a pesar de la restricción en la difusión de las moléculas. Además, mejoran las funciones de las membranas bajo estrés osmótico y estabilizan la estructura de las proteínas [88,122].

Late embryonic abundant (LEA). Igualmente, con un rol osmoprotector e inducidos por diferentes tipos de estrés como el déficit hídrico la expresión de los genes que codifican las proteínas LEA han sido relacionados con la tolerancia a este tipo de estrés como una respuesta adaptativa [222]. Estas proteínas son altamente hidrofílicas y contienen alto porcentaje de Glicina y otros aminoácidos pequeños, y, se considera que estos genes cumplen una función importante en la protección de las células en condiciones de crecimiento y desarrollo normales, además su expresión se ha observado en plantas en estado vegetativo sometidas a estrés osmótico, salino, deshidratación y frío así como, en tratamientos con ABA, por lo que se han implicado en la protección de macromoléculas y otras estructuras celulares durante el déficit hídrico interviniendo en el mantenimiento y estabilización de la estructura de otras proteínas y fijando moléculas de agua para ayudar a retener el mínimo necesario para el funcionamiento celular y prevenir la cristalización de proteínas y otras moléculas durante la desecación [122,223].

Proteínas de choque térmico (HSPs). De la misma forma, los genes codificantes de las HSPs se inducen bajo condiciones de estrés por calor, por frío, estrés osmótico,

sequía, salinidad, exceso de luz, rayos UV, estrés oxidativo y estrés biótico [224]. Se reporta que la condición de estrés ocasiona la desnaturalización de las proteínas por lo que se requiere un reclutamiento de chaperonas moleculares las cuales se consideran actúan como buffer para lograr el plegado adecuado de las proteínas agregadas mal plegadas, así como en la prevención del plegado incorrecto de las proteínas [88,122]. También se reporta de las HSPs regulan la expresión de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, como por ejemplo la HSP17.8 de *Arabidopsis* que incrementa la actividad de la super oxido dismutasa (SOD) y en tabaco la HSP16.9 que incrementa la actividad de la SOD, la catalasa (CAT) y las peroxidasas (POD). Así, la inducción de estos genes se ha relacionado con la tolerancia al estrés por déficit hídrico [225].

### **2.5.3 Mecanismos de protección del PSII**

Debido a que el PSII actúa como el complejo fotoquímico que regula la actividad fotosintética, las plantas han desarrollado mecanismos para encender o apagar el proceso fotoquímico primario basados en la sensibilidad del PSII [88]. De esta forma cuando se produce exceso de energía, asociados al PSII se desencadenan una serie de mecanismos de desacoplamiento y desactivación (en las LCH y los centros de reacción) que buscan proteger a la planta maximizando la disipación de la energía y minimizando el daño al aparato fotosintético [88,226]. Se reportan, sistemas de reparación para contrarrestar el daño ocasionado por el exceso de energía; estos actúan sobre la proteína central del PSII conocida como la proteína D1 la cual resulta dañada regularmente conduciendo a fotoinhibición. La protección a este foto daño es un proceso en el que la proteína D1 es removida del centro de reacción del fotosistema II y luego es degradada. La vía de protección y reparación de todo el complejo fotosintético involucra el reemplazo de la proteína D1 dañada, mediante la síntesis e inserción de una nueva proteína D1 al centro de reacción, lo que resulta en un fotosistema II funcional [226]. Si estos mecanismos no son suficientes para la protección de la planta, esta sufriría de fotoinhibición con la inevitable reducción de su capacidad fotosintética. Se reporta que la fotoinhibición es inducida cuando el exceso de luz se combina con diferentes tipos de estrés como el déficit hídrico, salinidad, entre otros [88,227].

Igualmente, para proteger el aparato fotosintético de la sobreexcitación y daño, el mecanismo de disipación de energía no fotoquímico, es decir la disipación de energía en forma de calor en la que intervienen tres tipos de carotenoides denominados xantofilas cumplen un rol fundamental puesto que por el exceso de energía de la luz, el transporte de electrones incrementa la concentración de protones en el lumen tilacoidal activando enzimas responsables de la síntesis de zeaxantina involucrada en la disipación térmica a través del ciclo de las xantofilas. En este ciclo ocurre la interconversión de los carotenoides violaxantina en anteraxantina y posteriormente en zeaxantina mediante una serie de epoxidaciones

inducidas por la luz [146,228]. Se reporta que la zeaxantina y anteraxantina están involucradas en la disipación del exceso de energía de las LCH en forma de calor, así cuando los niveles de estos carotenoides incrementan, las LCH emiten más fluorescencia aumentándose la disipación de la energía [88]. Además, se menciona que hay una correlación positiva entre los niveles de zeaxantina y anteraxantina y el NPQ (coeficiente de disipación no fotoquímica) calculado a partir de la curva de inducción de la fluorescencia que indica la proporción de energía de excitación que se disipa como calor [146,149,150]. Debido al consumo de ATP y poder reductor en procesos como la fotorrespiración, se considera que este contribuye en la disipación de la energía de excitación [88].

## 2.6 Respuesta del cacao al déficit hídrico

La temperatura y la precipitación son las variables climáticas que afectan principalmente a la planta de cacao; otros factores como la altitud y la latitud influyen en el crecimiento a través de su efecto sobre los dos primeros. En esta especie se han llevado a cabo algunos, pero aún escasos, estudios acerca de los aspectos ecofisiológicos de las plantas, reportándose que el cultivo es afectado tanto por el exceso como por el déficit hídrico del suelo, pues presenta alteraciones en los procesos fenológicos (abscisión de órganos vegetativos y reproductivos y acortamiento en ciclo de vida), al igual que en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la eficiencia en el uso del agua, partición y acumulación de materia seca en órganos vegetativos y reproductivos, lo que conlleva a reducciones significativas en el rendimiento [56,65,67,68,91]. Además, se ha encontrado que la disminución en la tasa de fotosíntesis por efecto del estrés ya sea en estado vegetativo o reproductivo, afecta la retención de cojines florales, de mazorcas jóvenes y maduras, así como el llenado de las almendras [66].

Igualmente, la evaluación de la respuesta de tolerancia al déficit hídrico se ha realizado mediante el registro de parámetros fisiológicos de intercambio de gases, fluorescencia de la clorofila, eficiencia del PSII, relaciones hídricas y factores de crecimiento en plantas establecidas en campo y en invernadero a las cuales se les ha aplicado el tratamiento de estrés por déficit hídrico mediante la suspensión del riego por períodos de 15 a 35 días continuos o a intervalos de aplicación de riego, reportándose alteraciones en las variables fisiológicas evaluadas, principalmente la reducción en los parámetros de intercambio de gases ( $A$ ,  $g_s$ , y  $E$ ) y de crecimiento confirmándose que *T. cacao* es afectado negativamente por el déficit de agua en el suelo [21,23,24,26,35,56,63,69,229–232]. No obstante, también se ha evaluado la respuesta de *T. cacao* al déficit hídrico del suelo bajo ambientes elevados de  $CO_2$  reportándose que bajo esta condición la reducción en los parámetros de intercambio de gases evaluados especialmente  $A$  fue menor [5,41,42,233].

Recientemente Tezara et al., [37] evaluaron la respuesta a la sequía estacional en 31 clones de cacao de Venezuela, de 5 años de edad pertenecientes a los grupos

genéticos Trinitario, Criollos y Criollos modernos mediante los cambios en parámetros de relaciones hídricas, intercambio de gases, actividad fotoquímica, contenido de nitrógeno (N) y clorofila así como el radio isotópico del  $\delta^{13}\text{C}$  encontrándose la reducción de A, al igual que el contenido de N y clorofila y la actividad fotoquímica por lo que se propone que a parte de la limitación estomática ocurrió una limitación metabólica que ocasionó la inhibición del aparato fotosintético. Además, se reportó que los clones Criollos modernos con un alto EUA se desempeñaron mejor bajo estas condiciones y que algunos trinitarios con un uso conservativo del agua fueron menos sensibles a la sequía concluyéndose que la existencia en la variación fisiológica observada en la respuesta a sequía sugiere diferencias en la tolerancia de los clones a esta condición.

Adicionalmente, el efecto del déficit hídrico en el crecimiento de las plantas de cacao ha sido evaluado para identificar aquellas variables que permiten la clasificación de los genotipos como tolerantes o susceptibles a esta condición. Dos estudios se realizaron en los materiales descendientes de cruces dialélicos entre progenitores con una alta capacidad de combinación para diferentes caracteres morfológicos y de crecimiento relacionados con la tolerancia a sequía, reportándose que los caracteres morfológicos con mayor potencial para la selección directa o indirecta de la tolerancia a la sequía en cacao eran el diámetro del tallo y de la raíz, así como la biomasa seca del tallo, pues fueron las variables de crecimiento con mayores efectos directos en el volumen de las raíces en condiciones de sequía [32,34]. Además, los autores propusieron que las alteraciones morfológicas desempeñan un papel importante en la tolerancia de las progenies de cacao al estrés hídrico [32].

A nivel bioquímico y molecular, se ha evaluado el efecto del déficit hídrico en la actividad y contenido de algunos componentes del sistema antioxidante reportándose el incremento en la actividad de las enzimas CAT, SOD y POX, así como en el contenido de ASH, prolina y compuestos fenólicos lo que se relacionó con un menor contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y fue asociado con una respuesta de tolerancia al estrés [48] [28]. Así mismo, aunque Dos santos et al., (2014) [27] encontraron un incremento en la actividad PPO y GPX en respuesta a la sequía, los autores reportaron que algunos parámetros de crecimiento como el contenido total de masa seca, la masa seca de las hojas así como la tasa de crecimiento relativo y el contenido de magnesio de las hojas fueron los factores más relevantes para el discernimiento entre genotipos tolerantes y susceptibles a este tipo de estrés.

Además se ha propuesto mejorar la tolerancia de *T. cacao* al déficit hídrico mediante la modificación de los niveles de poliaminas, para lo cual se identificaron algunos genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos [60]; así como la inoculación de las plantas de cacao con *Trichoderma hamatum* para promover el crecimiento bajo condiciones de déficit hídrico [61]. En este último estudio, se evaluó el efecto de este hongo endofítico en la respuesta de las plantas a la sequía, encontrándose que independientemente del estado hídrico (sequía y control), su colonización promovió el crecimiento de las raíces, y ocasionó un incremento en el contenido de agua de las plantas, por lo que se propuso que este efecto retrasó el

marchitamiento de las hojas, al igual que la reducción de los parámetros conductancia estomática, fotosíntesis neta y fluorescencia de la clorofila que ocurre como respuesta al déficit hídrico.

También se realizó una aproximación a la expresión diferencial de genes en *T. cacao* bajo diferentes condiciones ambientales. Argout et al., 2008 [70] crearon una base de datos de 149.650 ESTs (Etiquetas de secuencias expresadas) construida a partir de diferentes órganos, genotipos y condiciones ambientales en la cual se incluyeron hojas y raíces del genotipo Escavina 6 sometido a déficit hídrico por 36 horas. Se reportó el hallazgo de 1001 productos de genes asociados con la “respuesta a estrés” basándose en herramientas de ontología de genes encontrándose proteínas involucradas en mecanismos de resistencia o defensa como las LRR-NBS (nucleotide-binding site leucine-rich repeat), quitinasas, 1-3 betaglucanasa o proteínas relacionadas con la patogénesis.

Recientemente, se ha reportado la secuenciación de los genomas de tres genotipos de cacao Matina 1-6, Criollo belize (B97-61/B2) y Pound 7 [71–74], reportándose que el tamaño del genoma de *T. cacao* oscila entre 411 Mb y 494 Mb, con un total de 29071 genes codificantes de proteínas. El acceso a esta información abre la posibilidad de adelantar estudios de genómica funcional empleando plataformas de secuenciación de última generación, para dilucidar la respuesta de esta especie al déficit hídrico.

## **2.7 Plataformas de Secuenciación de nueva generación: Aplicación en estudios de Transcriptómica**

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), conocidas por su carácter masivo y en paralelo, son capaces de generar grandes volúmenes de datos derivados de la secuencia de ADN de forma más económica y a una velocidad y profundidad de lectura mucho mayor que las tecnologías tradicionales, lo que incrementa significativamente la precisión y eficiencia en la predicción de fenotipos a partir de genotipos [234]. Así, la secuenciación de ARN (RNAseq), que realmente consiste en secuenciar el ADN complementario (ADNc) empleando plataformas de alto rendimiento, se ha convertido en una herramienta de genómica funcional de elección para la generación de perfiles globales de expresión, información que permite revelar nuevos genes asociados con un fenotipo, así como variantes de splicing, o ARNs reguladores, permitiendo a su vez cuantificar la expresión de todos estos, en un solo ensayo [235–240]. La aproximación transcriptómica RNAseq, se viene empleando mayoritariamente con la tecnología de secuenciación de Illumina, la cual genera secuencias cortas (lecturas o reads) a una alta profundidad del ADNc obtenido a partir de ARNm del organismo de interés, sometido a determinadas condiciones con el fin de comparar los perfiles transcriptómicos: este análisis es llamado expresión génica diferencial (*Gene Differential Expression*). Dichas secuencias cortas son luego sometidas a análisis bioinformáticos y estadísticos con

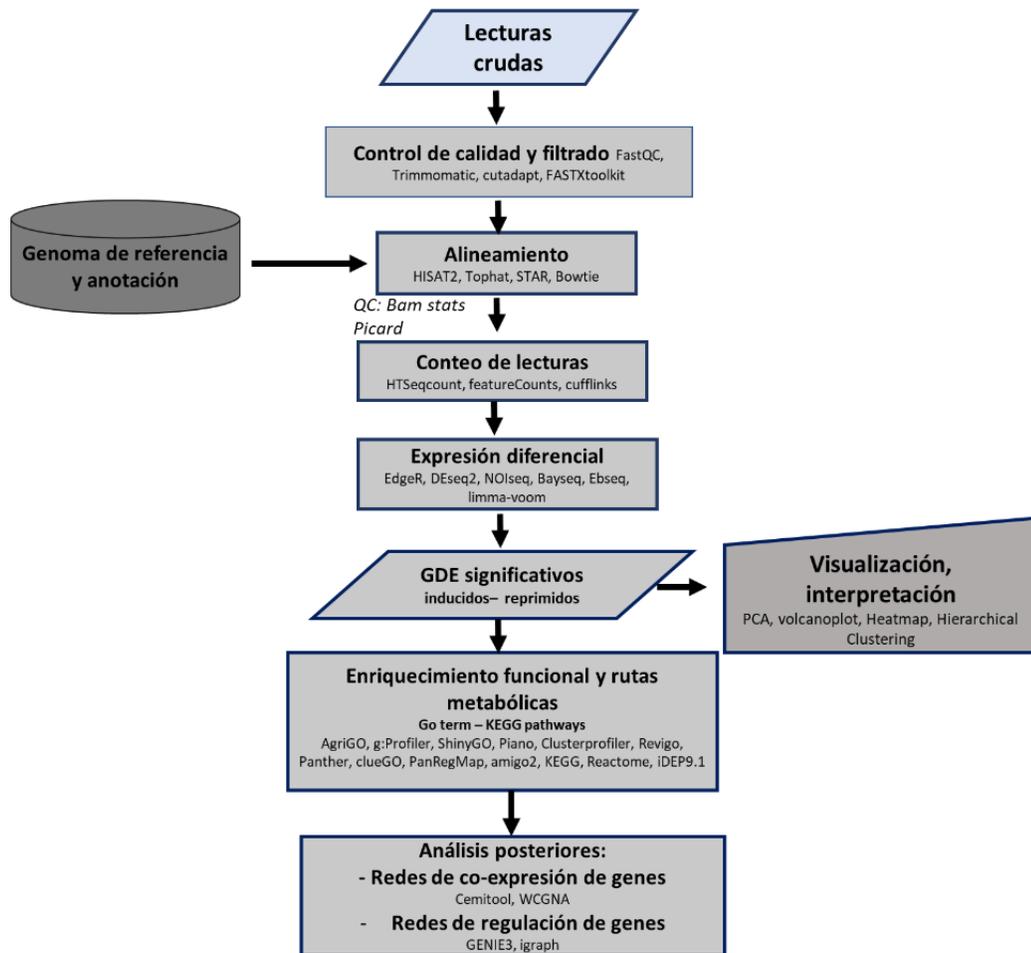
el fin de asociarlas con los genes o transcritos a los que pertenecen, así como cuantificar la expresión y poder determinar así los genes expresados diferencialmente y en forma significativa entre dos condiciones o tratamientos. El flujo de trabajo depende de la disponibilidad o no de un genoma o transcriptoma de referencia de la especie de interés, pues en el caso que no se cuente con este tipo de referencias se requiere utilizar programas de ensamble de novo de transcriptoma [241]. A pesar del incremento en la facilidad de acceso a las tecnologías NGS, son aún pocos los estudios de transcriptómica que emplean RNASeq en especies vegetales no modelo, no obstante, éstos están en constante aumento [236,242–245]. En la planta de cacao se ha empleado la aproximación transcriptómica RNAseq para evaluar la interacción de la planta con microorganismos que son patógenos (estrés biótico) o benéficos para ella [61,246,247]. Igualmente se están realizando estudios transcriptómicos encaminados a entender la bioacumulación de metales pesados como el cadmio en las almendras de cacao [16]. En el caso de las respuestas de la planta al estrés por déficit hídrico, si bien se ha realizado una primera aproximación a la identificación de genes diferencialmente expresados empleando aproximaciones transcriptómicas de primera generación (Obtención de ESTs empleando hibridación supresiva sustractiva de librerías de cDNA clonadas), no hay, a nuestro saber a la fecha, ningún estudio que haya empleado la plataforma de nueva generación para la secuenciación del ARN (RNAseq), lo que representa una oportunidad de llenar este vacío de información en una especie de importancia económica relevante para muchos países productores. Además, la combinación e integración de este tipo de estudios transcriptómicos, con la evaluación de la respuesta a nivel fisiológico y morfológico, permitirá constituir un primer estudio que incorpore diferentes niveles de la respuesta a estrés por déficit hídrico en esta especie.

### **2.7.1 Flujo de análisis bioinformático de datos procedentes de secuenciación del ARN**

El primer paso en el flujo de trabajo para el análisis de datos de secuenciación del ARN consiste en verificar la calidad de las lecturas “crudas” obtenidas de la secuenciación del ADNc, lo que se realiza mediante el análisis de control de calidad (QC) para el cual existen diversas herramientas disponibles (Figura 2.7-1) con las cuales se examinan principalmente los parámetros: número total de lecturas secuenciadas, contenido de GC, el puntaje de la calidad de las bases (quality score) así como las secuencias sobrerrepresentadas.

El perfil de expresión puede obtenerse con un número total de lecturas secuenciadas comprendido entre 20 y 30 millones por muestra o replica biológica, siendo este parámetro el más fácil y rápido para detectar fallas en la secuenciación. Por su parte el contenido GC se calcula para el total de las lecturas de los

transcritos, comparándose con el contenido GC del genoma de referencia existente para la especie, lo que permite detectar fallas de contaminación con ARN de otras especies u organismos durante la secuenciación. Este puede variar según la especie y se considera que una desviación mayor al 10% podría significar la presencia de contaminación. Así mismo, el puntaje de la calidad de las bases esta codificado en un solo carácter ASCII en donde la escala estándar es Phred+33 (ASCII 0-62) y en la secuenciación Illumina este puntaje se ubica entre 0 y 50, esperándose idóneamente un puntaje de calidad entre 30 y 40 por lo que las bases o las lecturas con una calidad menor a 20 se eliminan con una herramienta de recorte o filtrado respectivamente.



**Figura 2.7- 1. Flujo de trabajo para el análisis bioinformático de datos de secuenciación del ARN empleando genoma de referencia. (Elaboración propia)**

Finalmente, el parámetro de secuencias sobrerrepresentadas permite verificar la presencia de contaminación debido a los adaptadores, o a presencia de ARNr

residual, así pues, a pesar de que para generar las librerías de ADNc, se emplean generalmente kits que purifican selectivamente los ARNm basados en su cola poliA, es posible que las librerías estén contaminadas con ARNr, o con secuencias de adaptadores utilizados durante la secuenciación o incluso de otras fuentes contaminantes (manipulador, bacterias, hongos, etc.) por lo que las secuencias contaminantes son removidas con un filtrado y/o corte con programas como cutadapt [248] o SortMeRNA [249], los cuales busca dichas secuencias mediante alineamiento con secuencias provenientes de bases de datos específicas de cada tipo de contaminante (adaptadores, ARNr, etc.). Se considera que incluso con las secuencias parciales de adaptadores sin remover, la calidad del alineamiento de las lecturas sobre el genoma de referencia no se vería reducida debido a la funcionalidad y eficiencia de los programas de alineamiento [250].

Una vez las lecturas están “limpias” o se han procesado para mejorar su calidad y eliminar contaminantes, se procede con el alineamiento de estas al genoma de referencia en el que básicamente se identifica y asigna la mejor ubicación de cada lectura en dicho genoma con el fin de asignarle el respectivo gen. Existen diferentes alineadores como Tophat [251], STAR [252], Bowtie [253], HISAT [254] entre otros [255], que emplean diversos algoritmos para desempeñar su función, siendo particularmente relevante, la exactitud o precisión, el poder de cómputo y el tiempo requerido en la selección de la herramienta a utilizar, características que el programa HISAT (hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts) posee pues es uno de los alineadores con mejor desempeño en menor tiempo, con menos recursos computacionales y con gran asertividad [256,257]. HISAT emplea una estrategia de indexación jerárquica para la alineación de empalmes basada en la transformación de Burrows-Wheeler para comprimir los genomas y un esquema FM (Ferragina-Manzini) que permite buscar más rápidamente en los genomas, de esta forma el programa utiliza dos tipos diferentes de índices: un índice FM global que representa la totalidad del genoma y establece cada alineamiento, y numerosos índices FM pequeños para las regiones que cubren colectivamente el genoma y permiten extensiones muy rápidas de estas alineaciones.

Estos algoritmos de alineamiento fueron diseñados para manejar diferentes tipos de lecturas cortas, y que pueden abarcar intrones, por lo que la combinación de estos con la indexación jerárquica permite una alineación mucho más rápida mejorando la precisión de los mejores alineadores basados en solapamiento [254]. Cabe señalar que actualmente existen pseudo-alineadores como Kallisto [258], Salmon [259] y Sailfish [260] a los que se les atribuye mayor velocidad puesto que no realizan un alineamiento completo sino que crean una aproximación entre un transcriptoma de referencia y las lecturas empleando modelos estadísticos para inferir de que parte del transcriptoma proviene la lectura y convertirla en niveles de expresión de transcritos, es decir cuantifican la expresión, no obstante, la utilización de uno u otro tipo de programa dependerá del propósito de la investigación [258,261].

Una vez realizado el alineamiento, el archivo de salida del mismo (extensiones BAM/SAM) contiene información sobre el puntaje de la calidad del mapeo (MAPQ, mapping quality score), sin embargo, existen programas para examinar la calidad del alineamiento [250]. Seguidamente, se cuantifican las características genómicas (p.e. genes, transcritos) con base en los alineamientos obtenidos, lo que se realiza recopilando el número de lecturas/fragmentos que alinearon en la característica genómica de interés, por ejemplo, en un gen. Para esto, se emplean programas como HTSeq [262], Cufflinks [251] y FeatureCounts reportándose que este último es muy acertado y altamente eficiente en términos computacionales y de velocidad [256,257,263] (Figura 2.7-1). La matriz de conteos generada en el paso anterior es el archivo de entrada para el análisis de expresión diferencial que permite evidenciar cambios sistemáticos entre las condiciones experimentales evaluadas. En este análisis se identifican genes diferencialmente expresados (GDE) de forma significativa para lo cual se establece un umbral de corte ya sea por significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ) o por el logaritmo en base 2 del factor de cambio ( $\log_2FC$ ) o incluso ambos.

Se han realizado diversos estudios de evaluaciones comparativas entre los programas disponibles (lima/voom, EdgeR, NOISeq, baySeq, Cuffdiff2) para llevar a cabo este análisis, reportándose que DESeq2 tiene gran precisión en la identificación de los GDE, así como una menor tasa de falsos descubrimientos (FDR) a valores bajos del factor de cambio. Además, es la herramienta con el mejor desempeño cuando se tiene un bajo número de réplicas biológicas [257,264–266]. En términos generales el método de análisis es basado en un modelo lineal generalizado (GLM) de distribución binomial negativa. En primer lugar, DESeq2 construye un modelo con los recuentos observados, luego realiza un ajuste en dos pasos: encuentra el valor del parámetro que hace que la probabilidad sea mayor (estimación de máxima probabilidad) y después toma todos los valores de los genes y mueve estos valores hacia un valor promedio empleando el teorema de Bayes para guiar la cantidad de movimiento de cada gen: si la información para el gen es baja, su valor se mueve cerca del promedio, si la información para el gen es alta, su valor se mueve muy poco. Así, los valores movidos son útiles para evaluar diferentes conjuntos de genes, así como para aplicar un umbral. Además el programa controla o ajusta las diferencias debido a la profundidad de secuenciación de las muestras (estimation of size factors) [265,267].

Seguidamente se lleva a cabo un análisis exploratorio y de visualización de los datos para verificar las relaciones entre las muestras, lo que además contribuye con la interpretación. Para esto, la matriz de conteo normalizada es transformada utilizando un método estadístico para esta finalidad. El programa DESeq2 proporciona dos métodos de transformación (rlog-regularized logarithm transformation y variance stabilizing transformation-VST) cuya utilización depende del número de muestras y poder de cómputo. Estas transformaciones sólo se realizan para la visualización de los resultados pues se requiere que los datos sean homocedásticos (tengan la misma varianza a través de diferentes valores de

medias) para que puedan utilizarse en análisis posteriores con métodos que funcionan mejor con este tipo de datos como el PCA (análisis de componentes principales), el clustering jerárquico o el heatmap. Dentro de los métodos de visualización, el PCA permite observar la varianza global de las muestras y evidenciar cuales de estas están cercanamente relacionadas con base en la expresión génica, así como su ajuste al diseño experimental [250,267].

Seguidamente, para observar la distribución de los valores de expresión diferencial expresados como el logaritmo en base 2 del factor de cambio ( $\log_2FC$ ) entre los tratamientos evaluados, contrastados con el nivel de significancia ( $\log_{10}p.value$ ) obtenida, se emplea el volcano plot o el MA plot. Y, posteriormente con la finalidad de verificar la varianza/homogeneidad entre réplicas biológicas y el grado de diferenciación de los perfiles de expresión génica de los GDE de forma significativa entre los tratamientos evaluados, se representan los datos en cluster jerárquico o mediante un heatmap, incluso estos dos análisis se pueden combinar en un mismo gráfico [268].

Una vez se han obtenido los GDE de forma significativa se realiza un análisis de enriquecimiento funcional (*gene set enrichment analysis*) para identificar los principales procesos biológicos alterados asociados con los cambios en los perfiles de expresión, así como identificar los GDE con determinado rol en cada uno de éstos, lo que permitirá en últimas ayudar en la interpretación biológica de los cambios observados en los perfiles de expresión asociados a los fenotipos de estudio contrastados.

Existen diversas herramientas disponibles para su uso en plataformas en línea o empleando programación (Figura 2.7-1) basadas en diferentes métodos de análisis que emplean diversos test estadísticos para la determinación de los genes enriquecidos, no obstante, cada método tiene sus limitaciones y son muy pocos los estudios que realizan una evaluación comparativa entre ellos [269–278]. De esta forma su uso depende en gran medida de las especies soportadas por dichas herramientas, al igual que de la disponibilidad de la anotación y de la actualización de los servicios [269,277]. Este análisis se basa principalmente en la identificación de aquellos genes que están sobrerrepresentados en el conjunto de GDE, empleando la implementación de análisis estadísticos para comparar este conjunto de genes, asignándoles términos de ontologías génicas (GO) o una ruta metabólica KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e identificar cuáles de estas categorías funcionales están significativamente enriquecidas en términos de aumento de expresión. Las GO proveen un vocabulario controlado para describir el gen y sus productos en términos del rol que cumplen en los procesos biológicos (BP), la función molecular (MF) específica y el componente celular (CC) donde ocurren estos procesos, mientras que con la base de datos de rutas KEGG, se puede identificar a qué ruta metabólica específica está asociado cada producto génico diferencialmente expresado, y así identificar las principales rutas metabólicas alteradas entre los tratamientos evaluados [279–281]. Los términos GO están conectados en nodos de una red, por lo que las conexiones entre los

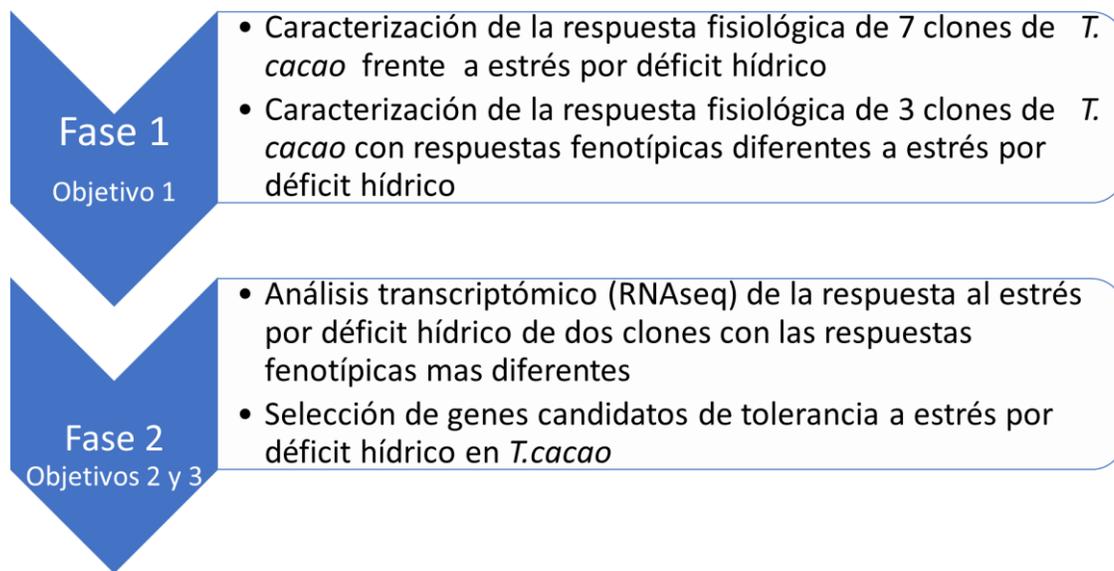
términos padres e hijos son conocidas y forman lo que se conoce como gráficos acíclicos dirigidos. Debido a estas conexiones, es posible encontrar un mismo gen enriqueciendo diferentes categorías relacionadas, por lo que, cuando la información obtenida es muy extensa, se puede reducir a los términos principales con el uso de otras herramientas como REVIGO [282].

Estos análisis proporcionan entonces una idea clara a grandes rasgos de los procesos biológicos, las posibles funciones, así como los componentes celulares en los que ocurren dichos procesos y las rutas en las que los productos de genes estarían implicados en la condición estudiada, no obstante le corresponde al investigador implementar diversas estrategias y análisis o validaciones adicionales para llegar a confirmar o proponer genes claves que podrían tener un rol crucial en la respuesta a la condición a la cual fueron sometidas las muestras de interés.

Dentro de los análisis adicionales que pueden contribuir en la dilucidación de las relaciones significativas entre los genes y los procesos biológicos al igual que los mecanismos reguladores que intervienen en respuestas específicas se encuentran las redes de co-expresión de genes y redes reguladoras que se han convertido en un enfoque muy útil para representar la organización compleja de los sistemas biológicos y descifrar la relación entre los genes, así como para asociar funciones a genes en los cuales estas no se conocen y encontrar genes “hub” o centrales en la respuesta de interés [268,283]. No obstante, algunos programas con un menor grado de dificultad en su implementación para la construcción de las redes, están basados en el procesamiento de una gran cantidad de datos que requieren un número mínimo de muestras biológicas (15 - 20) para que los resultados sean robustos y contribuyan en la obtención del significado biológico [284,285], lo que constituye una limitante para estudios con un número menor de muestras biológicas. Dado que las redes de co-expresión génica se basan en las correlaciones entre muestras un número pequeño podría ocasionar una alta correlación entre un set de genes que se traduzca en la formación de un solo modulo, del cual no sería posible extraer información de relevancia biológica [285]. Al respecto estudios demuestran que la inferencia a través de las redes es mejor cuanto mayor es el número de muestras [286,287]. Considerando que la realidad es que un gran número de estudios utilizan el mínimo de muestras con base en diversos factores, seguramente nuevos métodos de análisis surgirán para ajustarse a la realidad de las condiciones experimentales.

## **Capítulo 3. Marco Metodológico**

Para alcanzar el objetivo general, se contemplaron dos fases con aproximaciones metodológicas diferenciadas descritas en la figura 3-1:



**Figura 3- 1 Fases metodológicas.**

### **3.1 Fase 1. Caracterización fisiológica**

#### **3.1.1 Material vegetal y tratamiento de estado hídrico.**

En esta fase se llevaron a cabo dos experimentos en invernadero para caracterizar la respuesta de cacao al estrés por déficit hídrico a nivel fisiológico. Las plantas se regaron y fertilizaron con el fin de garantizar los requerimientos minerales para su crecimiento y desarrollo óptimos.

Los tratamientos se establecieron bajo el diseño experimental de parcelas divididas con bloques completos al azar y tres repeticiones: en la parcela principal se evaluó el estado hídrico, con dos niveles: - plantas con riego capacidad de campo (CC) y - plantas de estrés por déficit hídrico (DH), y en la subparcela se evaluaron los clones. En el tratamiento CC las plántulas se regaron para mantener un contenido volumétrico de agua del suelo óptimo (CVA), mientras que el tratamiento de déficit hídrico se aplicó por suspensión de riego hasta que el  $\Psi$  alcanzó valores entre -3,0 y -3,5 MPa [23,26,27], punto que se estableció como el día de máximo estrés [21,23]. Una vez alcanzado este punto, las plantas fueron regadas hasta la capacidad de campo para su recuperación. Las mediciones de la recuperación se realizaron a los cuatro (experimento 1) y siete (experimento 2) días siguientes a la rehidratación (DDR).

En el primer experimento se hizo la caracterización de plantas en estadio fenológico BBCH 22 [288] (10 meses de edad) de los clones de *T. cacao* EET 8, FEAR 5, CCN 51, TSH 565, ICS 1, ICS 60 e ICS 95 que se obtuvieron por injerto con el patrón Caucasia empleado por Geoambiente S.A.S para la producción en masa. Estos clones se seleccionaron por pertenecer al grupo de los mejores materiales recomendados para la siembra y comercialización en el país por el Consejo Nacional Cacaotero [22] y por sus características agronómicas.

De los resultados obtenidos en este experimento, se eligieron los clones EET 8, ICS 60 y TSH 565: uno con características de tolerancia (menor afectación por DH), otro con características de susceptibilidad (mayor afectación por DH) y otro con una respuesta intermedia (afectación moderada) en base al análisis de los parámetros de relaciones hídricas ( $\Psi$ , CRA) intercambio de gases ( $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i$ ,  $EUA_i$ ), Fluorescencia de la clorofila ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi PSII$ ,  $F_o$ ) y la estabilidad de las membranas que se evaluó a través del % de pérdida de electrolitos (PE).

El segundo montaje experimental se realizó con plantas en estadio fenológico BBCH 19 [288] (5 meses de edad) de los tres clones seleccionados en el primer experimento, y se evaluaron los mismos parámetros fisiológicos anteriormente mencionados, incluyendo parámetros de crecimiento como área foliar, masa seca por órganos (tallo, hojas, raíz), masa seca total, y relación raíz/parte aérea. Igualmente, el día de máximo estrés se colectaron muestras de la 3 o 4 hoja completamente expandida de seis plantas por clon y tratamiento que fueron congeladas y transportadas en nitrógeno líquido para extracción del ARN total en el laboratorio. A partir del análisis de los resultados observados se seleccionaron los dos clones con las respuestas más contrastantes al DH para ser analizados a nivel transcriptómico en la segunda fase, y, a partir de la información generada seleccionar y proponer genes candidatos de tolerancia de la respuesta de *T.cacao* al déficit hídrico.

### **Análisis estadístico**

En las dos caracterizaciones fisiológicas se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para determinar el efecto de los clones y los tratamientos en las variables fisiológicas analizadas. Las diferencias entre las medias de los clones y tratamientos se analizaron con la prueba de la diferencia menos significativa LSD ( $p < 0.05$ ), usando el programa Statix 9.0® (Analytical software, USA).

### 3.2 Fase 2. Caracterización Molecular. Transcriptómica

De esta forma la fase 2 de caracterización del perfil transcriptómico se realizó de la siguiente manera:

Los ARNs totales de tejido foliar de 5 individuos por clon (EET8 y TSH 565) y tratamiento (CC y DH) fueron extraídos empleando el protocolo descrito por Chang et al., [289] con las siguientes modificaciones: se maceró 200mg de tejido foliar por individuo con nitrógeno líquido (4 veces) y se transfirió a un tubo de 2mL previamente congelado, luego se añadieron 1,4 mL de *Buffer de Extracción* [100mM Tris, pH 8.0; 2M NaCl; 25mM EDTA; 2% CTAB (p/v); 2% PVP 10,000 (p/v); 2%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v) y 0.5g/L espermidina (p/v)], previamente calentado a 65°C, y se homogeneizó con vórtex (15 segundos). Seguidamente se incubó en baño seco a 65°C durante 15 minutos, agitando la suspensión cada 2 minutos (vórtex por 15 segundos). A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se dividió en dos tubos de Phase Lock gel (5 Prime, Gaithersburg, Maryland, USA) y se añadió a cada tubo igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico [24:1] (~700 ul), luego se homogeneizó por inversión 10 veces, y se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a 4°C; los respectivos sobrenadantes se pasaron a dos nuevos tubos Phase Lock gel repitiendo el paso anterior. El sobrenadante recuperado de los dos tubos se transfirió a un tubo de 2 ml y se añadió  $\frac{1}{4}$  de volumen (~250uL) de LiCl 10M, se homogeneizó por inversión (10 veces) y, se dejó precipitando el ARN a 4°C toda la noche.

La mezcla anterior se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, y el pellet se re-suspendió en 500uL de *Buffer SSTE* [10mM Tris-HCl (pH8.0), 1M NaCl, 0.5% SDS, y 1mM EDTA] tibio, tras lo cual, la mezcla se pasó a un tubo de Phase Lock gel, al cual se le añadieron 500uL de cloroformo: alcohol isoamílico [24:1], y luego de mezclar por inversión se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5mL. Seguidamente, se añadieron dos volúmenes (~1mL) de etanol al 70% (v/v) y se dejó precipitar el ARN por 2 horas a -80°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante con micropipeta, seguidamente se centrifugó 1 minuto para decantar el líquido residual que se colectó nuevamente con la micropipeta y se dejó secar el pellet sobre hielo durante 15 minutos. Finalmente, el pellet de ARN se re-suspendió en 50uL de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> DEPC, previamente calentada a 37°C, y se incubó en baño seco a esta temperatura por 5 minutos.

El ARN extraído se evaluó en cuanto a pureza, concentración y calidad empleando el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y electroforesis desnaturante en gel de agarosa al 1.5% p/v. Para seleccionar las muestras a secuenciar se realizó una segunda verificación de la calidad y concentración con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent, Technologies ®). De cada conjunto de 10 réplicas biológicas por tratamiento se seleccionaron para la secuenciación las 6 mejores

muestras basadas en el valor RIN (RNA Integrity Number), el cual superó el umbral de 7.0.

A partir de las 12 muestras de ARN seleccionadas (2 tratamientos x 3 réplicas biológicas x 2 clones), se generaron las librerías de ARNm respectivas empleando el kit NEBNext® Ultra™ (BioLabs® New England) según instrucciones del fabricante. Cada librería de ADNc se indexó y secuenció en forma pareada (paired-end) mediante secuenciación Illumina (HiSeq, 2 x 150pb) con una profundidad aproximada de 30 Millones de lecturas por muestra por Novogene Corporation Ltd. (Sacramento, CA, USA).

### Análisis Bioinformático

Los datos de secuenciación fueron analizados implementando un pipeline de análisis, descrito en el siguiente flujograma:

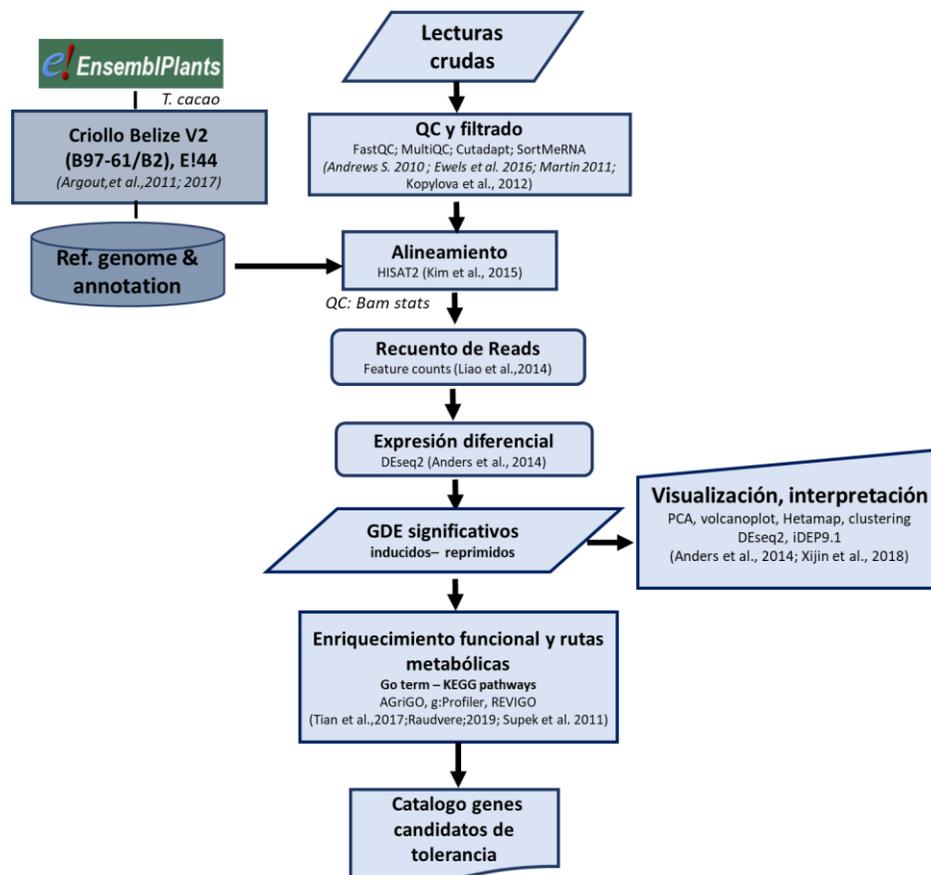


Figura 3- 2 Flujo de trabajo para el análisis bioinformático de los datos de la secuenciación del ARN empleando el genoma de referencia de *T.cacao* Criollo Belice.

### 3.2.1 Identificación genes candidatos de tolerancia

Una vez se realizó el análisis bioinformático de los datos obtenidos, se consideraron los resultados del análisis de enriquecimiento funcional, la anotación funcional de los genes, la ortología de los GDE con los genes de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Matina 1-6 (T.cacao)* (u otra especie de acuerdo con los reportes encontrados en la literatura), la significancia de la expresión diferencial ( $FDR \leq 0.05$ ), el mayor factor de cambio ( $\log_2\text{Foldchange}$ ) en la expresión del gen, la información de los reportes en la literatura y los resultados observados a nivel fisiológico para la identificación de posibles genes relacionados con la tolerancia de *T.cacao* al DH.

**Capítulo 4. Caracterización de la respuesta fisiológica de siete clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) de interés comercial al estrés por déficit hídrico**

## **Cacao (*Theobroma cacao* L.) response to water-deficit: physiological characterization and antioxidant gene expression profiling in commercial clones**

### **4.1 Abstract**

The increase in events associated with drought constraints plant growth and crop performance. Cacao (*Theobroma cacao* L.) is sensitive to water deficit (WD) which limits its productivity. The aim of this research was to characterize the response of seven commercially important cacao clones to a severe and temporal water deficit. Ten-month-old cacao trees were submitted to two treatments: well-watered and stressed by irrigation suspension until the leaf water potential ( $\Psi$ ) reached values between -3.0 and -3.5 MPa. The effects of WD on water relations, gas exchange, photochemical activity, membrane integrity and expression of oxidative-stress related genes were evaluated. All clones showed decreases in  $\Psi$ , but TSH565 had a higher capacity to maintain water homeostasis in leaves. An initial response phase consisted of stomatal closure, a general mechanism to limit water loss: as a consequence, photosynthetic rate dropped about 98% on average. In some clones, photosynthetic rate reached negative values at maximum stress level, evidencing photorespiration, and confirmed by increased intracellular  $\text{CO}_2$ . A second and photosynthetically limited phase, was characterized by a drop in PSII quantum efficiency affecting all clones. On average, all clones were able to recover after 4 days of re-watering. Water deficit triggered an oxidative stress at early phase, as evidenced by the upregulation of oxidative stress -markers and genes encoding ROS scavenging enzymes. Effects of WD stress in energy metabolism was deduced given the upregulation of fermentative enzymes coding genes. Altogether, our results gave clues to suggest that EET8 clone was the most performant under WD, whereas ICS-60 was seemingly more susceptible. Importantly, the activation of antioxidant system and PSII repair mechanism seem to play key roles in the observed differences of tolerance to WD amongst clones.

**Keywords: Drought, Water deficit, Chlorophyll fluorescence, Gas exchange, Photosynthesis, Oxidative stress, Water potential, RT-qPCR**

## 4.2 Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a fruited tree native to tropical lowlands of South America [97,290] and its cultivation represents the main economic sustainability for smallholder farmers and landowners in several producing countries in Africa, Central America and South America [233,291]. Cacao beans are the raw material of interest for the chocolate confectionary industry, and they are also used in the cosmetic or pharmaceutical industry, with increasing interest in recent years as a source of bioactive compounds [66,292]. Cacao bean production reached 4.6 million tons in 2017/2018 [65,111] and the global market is growing predicted to increase 7.3% from 2019 to 2025 [111]. However, some important threats related to global warming may reduce this growth prediction during incoming decades, such as the higher incidence of water deficit and drought periods in current cocoa cultivation areas [5,11,13,14,19,20,42,293].

The development and productivity of cacao trees are affected by drought [91]. Soil water deficit may result from a reduced water inputs to agroecosystem [294], poor irrigation, high or low temperatures, or excessive application of mineral salts and fertilizers to soil [162,295,296]. During water deficit, the transpiration rate exceeds water absorption by the roots, thereby reducing the water content in tissues and affecting both nutrient uptake and photosynthesis [76,297,298].

To cope with water deficit periods, plants have developed several strategies and response mechanisms that vary from one plant species to another and depend on the plant phenologic state or the duration and intensity of stress [77,78]. Some of these strategies can confer them tolerance to overcome water deficit and be able to recover after rehydration [299], which is a trait of high importance for plant breeding. By 2050, half of the currently cultivated lands will likely suffer from drought [3,300].

This acclimation response has a genetic base and involves all different levels of the plant biology, e.g., epigenetic, molecular, biochemical, and physiological, in an integrated fashion. Importantly, crosstalk between signal transduction pathways and interplay between secondary messengers have been reported as key for the effectiveness of this acclimation response at a systemic level, where abscisic acid (ABA) is considered the chief orchestrator. As water deficit leads to oxidative stress due to photorespiration and concomitant increase in ROS production, deleterious oxidative damages of proteins, lipids, photosynthetic apparatus and nucleic acids accumulate in cell tissues [301]. Therefore, ROS detoxification by the enzymatic and non-enzymatic system is a crucial and well described mechanism developed by plants against drought-induced oxidative damage [219,302,303]. In addition, high activity levels of antioxidants enzymes, such as Superoxide Dismutase (SOD), NADPH oxidases (RBOHs), Glutathione S-transferase (GST), Alcohol

Dehydrogenase (ADH), have been shown to contribute to the attenuation of the oxidative stress caused by the water scarcity [297,304] and can be used as indicators of tolerance or susceptibility to this abiotic stress [305].

The above effects of drought on plant fitness, as well as the different levels of response and mechanisms developed by plants have been widely studied in the model plant *Arabidopsis thaliana* and in crops of world economic importance, such as rice (*Oryza sativa* L.) or maize (*Zea mays* L.) [85,306,307]. However, this is not the case for many tropical crops of commercial importance such as cacao. Few studies have addressed the important physiological effects of water deficit in cacao, which leads to abscission of vegetative and reproductive organs, a reduction in photosynthesis, water use efficiency and dry matter accumulation, and decreases cocoa bean production yields by 10 to 89% [14,55,56,308,309]. However, additional efforts are needed to increase our understanding of the different mechanisms supporting the cacao acclimation response to water deficit and its variability among genotypes [76,297,300,310]. With this focus, here we assess the effect of a period of water deficit and recovery on the physiological response and behaviour of seven cacao clones of commercial importance. Further expression profiling of genes involved in oxidative response and soil water deficit was carried out on three clones representative of the different responses found.

### **4.3 Materials and methods**

#### **Plant material and stress treatment**

This study was carried out at Bambusa Station (Geoambiente Ltda), which is located in the dry premontane forest at 5°07'50" North and 74°09'30" West, at 1,304 m.a.s.l., in Pacho (Cundinamarca-Colombia). All clones were propagated in a glasshouse by grafting and using *Caucasia* (Colombian) rootstock (Geoambiente Ltda) for mass production. Ten-month-old well-developed seedlings of were used for the experiment. The clones EET8, FEAR5, CCN51, TSH565, ICS1, ICS60 and ICS95 were selected because they belong to the group of the most recommended materials for planting and marketing in Colombia by to the National Cacao Council [22] and based on their agronomic performance (Table 4-1).

**Table 4- 1 Cacao commercial clones used in this study**

<b>Genotype (Nomenclature)</b>	<b>Identity</b>	<b>Genetic group</b>	<b>Origin</b>	<b>Agronomic traits</b>	<b>Reference</b>
CNN51	Castro Naranjal Collection	Amazonian- Trinitarian Hybrid	Ecuador	High Productivity, early fructification, diseases resistant	[6,95,103]
EET8	Tropical Experimentation Station	Amazonian type-Trinitarian	Ecuador	High bean index	[6,311]
FEAR5	Fedecacao Arauquita 5 RC ICA 4179	Trinitarian Hybrid	Arauquita (Arauca Colombia)	High quality and yield	[6]
ICS1	Imperial College Selection	Trinitarian Hybrid	Trinidad, Nicaragua, and Venezuela	High bean and pod index	[6,102]
ICS60	Imperial College Selection	Trinitarian Hybrid	Trinidad, Nicaragua, and Venezuela	High bean and pod index, medium tolerance to moniliasis and witch broom diseases	[6,95,100,102]
ICS95	Imperial College Selection	Trinitarian Hybrid	Trinidad, Nicaragua, and Venezuela	High bean and pod index, medium tolerance to moniliasis and witch broom diseases	[6,95,100,102,312]
TSH565	Trinidad Selection Hybrid	Trinitarian	Trinidad	High production and moniliasis resistance	[6,102]

For the establishment of the experiment in the glasshouse, the seedlings were planted in black plastic bags that contained 5 kg of silty loam soil (pH 6.5). Considering the results of the soil analysis, each plant was fertilized with 5 mL of Agroplus® (Fundases) and 5gr of 15-15-15 (N-P-K) Nutrimon® (Monómeros Colombo Venezolanos S.A) fertilizer per litre of water. This fertilization scheme was applied twice after grafting, to ensure the mineral requirements of the plants for optimal growth and development. From the time of sowing to the application of water deficit treatments, all plants were irrigated to field capacity. During the evaluation period, the maximum and minimum temperatures and relative humidity were registered daily with a HOBO 8 weather station (HBOware®) installed at 0.50 m above the ground (Figure 4-1A). The mean vapour-pressure deficit (VPD) (Figure 4-1B) was also calculated according to the method proposed by Allen (2006) and dos Santos et al., (2013). The treatments were distributed in a split-plot arrangement under a randomized complete block design, with three replications; the two water states assessed were placed in the main plot: - water deficit (WD) or - field capacity (WW) plants, and the seven clones (Table 4-1) were placed in the sub-plot with 5 plants for each experimental Unit (210 plants in total). For WW treatment, seedlings were well-watered to keep optimal soil volumetric water content (VWC) of 45% during the evaluation period (Figure 4- 2A). Consequently, the VWC was registered manually at 20 cm depth in the soil of each plant, using a FieldScout TDR-300 Moisture Meter (Spectrum technologies®). Likewise, under field capacity, the predawn foliar water potential ( $\Psi$ ) remained between -0.2 and -0.4 MPa, according to previously reported  $\Psi$  value for well-irrigated cacao plants (Figure 4-2B) [24]. In the WD treatment, the irrigation was suspended for 26 consecutive days until the  $\Psi$  reached values between -3.0 to -3.5 MPa [26,27] moment in which the VWC reached 6% (Figure 4-2) and the plants showed critical wilting (e. g. leaf senescence and floral buds abortion). According to  $\Psi$  and VWC, the day 26 after treatment (D26) was established as the maximum water deficit stress point [21,23]. At the end of D26, all plants were irrigated to field capacity for recovery, reaching 45% of VWC the day after. Recovery measurements were realized during the following 4 days after rehydration (DAR).

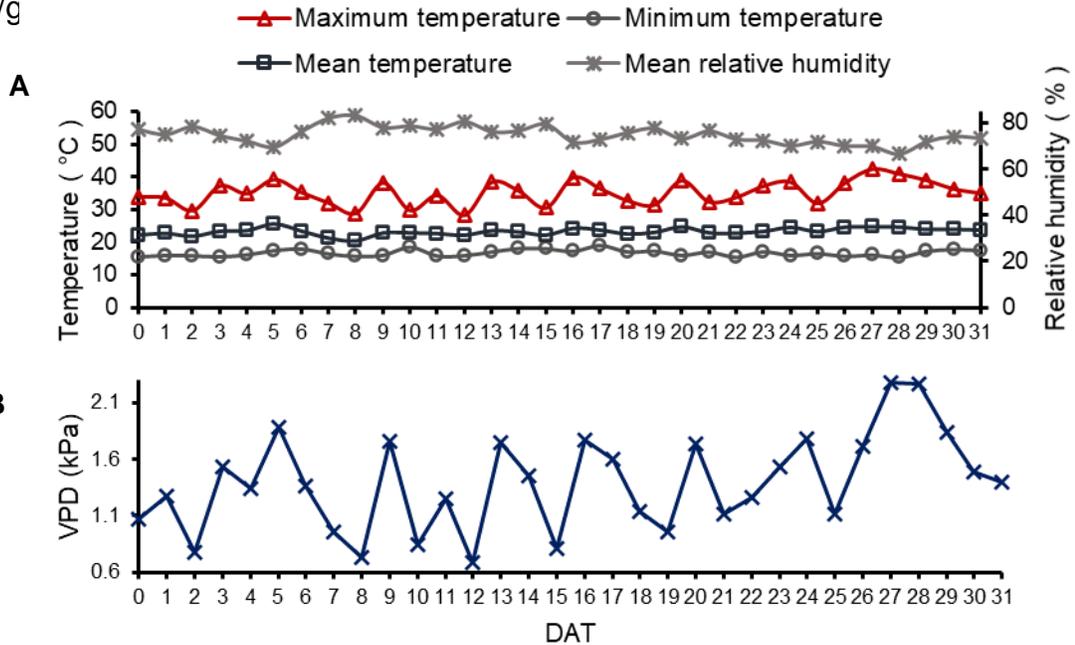
### **Leaf water potential**

The  $\Psi$  was measured from 5:00 to 6:30 am in 3 or 4 completely expanded leaves from top to bottom of three plants per treatment and for each clone (n=6) (Figure 5 - 2A).  $\Psi$  was measured with a Schölander pressure chamber (PMS Model 615, Fresno, CA, USA).

### **Gas exchange and intrinsic water use efficiency**

The parameters net photosynthesis (A), stomatic conductance ( $g_s$ ) and intercellular CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) were registered from 9:00 am to 12 m, in 3 or 4 completely expanded leaves

from top to bottom of nine plants per treatment (n=9) and per clone using a photosynthesis measurement system LI-6400XT Portable Photosynthesis System (LI-COR Biosciences Inc. NE, USA) with a saturating CO<sub>2</sub> concentration of at 400 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> [24] and a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 500 μmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> according to the response of photosynthesis to light for each clone (data not shown). The intrinsic water use efficiency (WUE<sub>i</sub>) was calculated with A and α<sub>s</sub> data (A/g



**Figure 4- 1 Variation in microclimatic conditions during measurements.** (A) Daily average of temperature and relative humidity; and (B) Vapor pressure deficit (VPD) in the glasshouse during the period of water deficit and recovery.

### Chlorophyll fluorescence parameters

The  $F_v/F_m$  and effective quantum yield efficiency of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), were measured in dark-adapted leaves for 45 minutes, on the same leaves where photosynthesis was recorded, from 4:00 to 7:00 pm, using a MINI-PAM modulated fluorometer (Walz®, Effeltrich, Germany). For this, the chlorophyll molecules were excited for 0.80 s with 1,500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of actinic light.

### Relative leaf water content (RWC) and electrolyte leakage

The RWC leaf was determined following the protocol proposed by De Almeida et al., (2016) [24] and according to the equation proposed by Slatyer & Shmuelic, (1967) [315]:

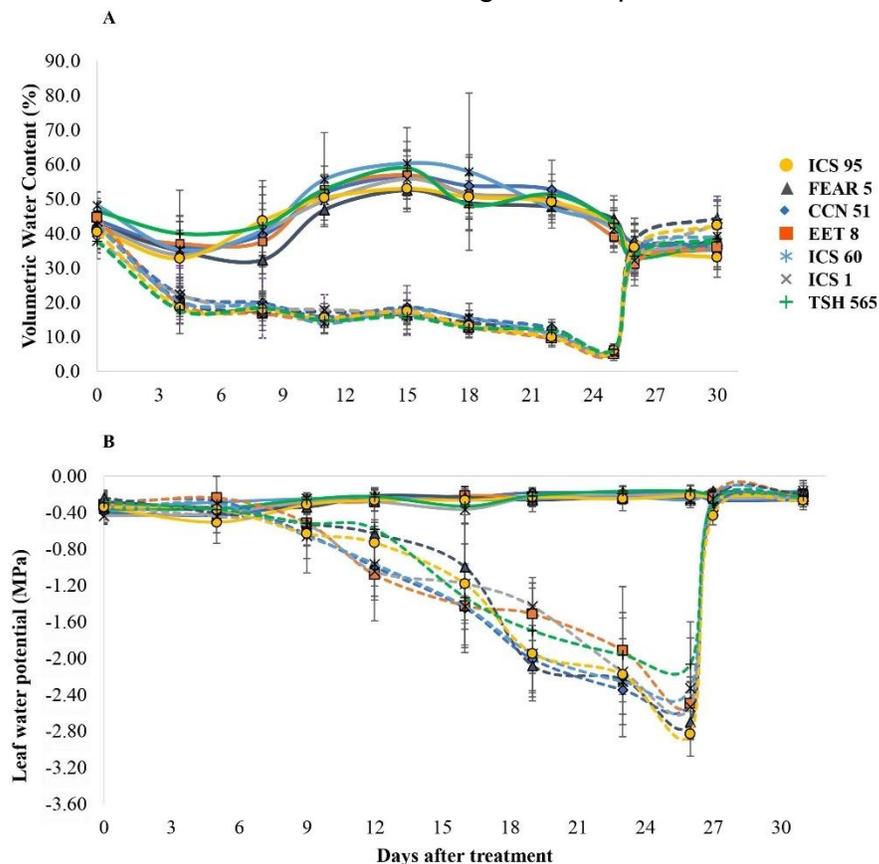
$$RWC(\%) = \left[ \frac{\text{Fresh weight} - \text{dry weight}}{\text{turgid weight} - \text{dry weight}} \right] \times 100$$

The leaf fresh weight, turgid weight and dry weight were determined in leaf pieces of 25 cm<sup>2</sup> of 21 plants per treatment. The turgid weight was determined after hydrating the pieces with distilled water for 24 hours, and the dry weight was then recorded after drying the pieces in a 70 °C oven to a constant weight.

The electrolyte leakage (EL) was determined using the protocol proposed by Souza et al., (2014) [316]. For this, ten 6-mm-diameter leaf discs were placed in 15 mL tubes with 10 mL of deionized water at 25 °C under constant agitation. The electrical conductivity (EC) was determined with a conductometer (HI 9835 Hanna® - ICT, SL, Bogota, Colombia) after 6 h of incubation and after heating the same sample at 90 °C for 2 h. EL was expressed as a percentage (%) according to the equation proposed initially by Stuart, (1939) [317]:

$$EL (\%) = \left[ \frac{EC}{EC_{max}} \right] \times 100$$

where EL is the percentage of lost electrolytes, EC is the EC measured at time 6 h, and EC<sub>max</sub> is the EC measured after heating the sample at 90 °C for 2 h.



**Figure 4- 2 Variation in soil and plant water content. (A)** soil volumetric water content and **(B)** predawn water potential of cacao clones under different water states. WW, well watered (solid lines) and WD, Water Deficit (dashed lines) conditions. Values are mean  $\pm$  SD (n = 6). The arrows indicate the exact day of rewatering after 26 days of WD

## **Gene expression profiling**

Among the seven clones evaluated, three clones were selected as representatives (see below) of the different responses to WD observed through the physiological variables evaluated. Samples of mature foliar tissue from three plants of each clone were taken on day 0 (control), day 23 and day 26 after WD and immediately frozen into liquid nitrogen for total RNA extraction.

## **Identification of cacao antioxidant system orthologous genes in the cacao genome for RT-qPCR primer design**

A search for genes associated with water stress response (drought or waterlogging) and oxidative stress (antioxidant system) was performed in model plants, both in literature and in sequences databases. Then, the selected CDS (Coding sequences, Table 4 -2) from model plants were used as a query to search orthologous genes in the cacao genome Hub Database [72], using the reciprocal best hit strategy [318] and running BLAST alignments [319].

The best hit of each alignment was selected according to its highest alignment score and lowest E-value and after verifying its coverage length. Once confirmed as orthologs, the cacao CDS were used for qPCR primer designing using Primer3Plus Software [320] with default parameters. Similarly, primer sequences for three housekeeping genes, previously employed in RT-qPCR assays in cacao plants [321] were modified to be used as normalizers of the relative expression analysis. Quality control was carried out to confirm the absence of dimer formation, T<sub>m</sub> and primers specificity with the Sequence Manipulation Suite [322] and Primer Quest® (IDT, IA, USA). Finally, a total of nine primer pairs were designed for the respective cacao orthologous genes and three pairs were designed for the housekeeping genes (Table 4-2).

## **RNA extraction and cDNA synthesis**

As mentioned above, all harvested leaf samples were maintained in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. For RNA extraction, an in-house protocol was optimized based on the protocol of Chang et al. (1993) [289] with some modifications as described in the Chapter 3. RNA concentration and quality were assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®, CA, USA). High RNA yield (~500 µg/µl) with an RNA integrity number (RIN) greater than 7/10 were obtained after optimization of the protocol. Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs, MA, USA), following the manufacturer's instructions, and using oligo d(T)<sub>18</sub> primers.

**Table 4- 2 Cacao Orthologous genes related to the antioxidant system evaluated in this study.** Source of selected genes, expression pattern found in previous studies and primer sequences designed for RT-qPCR analysis are detailed.

Gen	Accession No.	Tc Locus name	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Length (pb)	TM	Observed patterns	Species	Author
<i>SOD3.1</i>	AAB68035.1	Tc10v2_t014220.1	gtgattctccaccgtcgtt	caatagcccaacccaaagaa	147	58.5	Overexpression during drought	<i>Triticum aestivum</i>	[323]
<i>RBOH F</i>	AT1G64060.1	Tc03_t028110	actgacctgtcattggac	ccattccccactcccttatt	136	58.5	Overexpression during OS	<i>A. thaliana</i>	[324,325]
<i>GST</i>	AT1G17170.1	Tc07v2_t011790.1	agccttacttgggggagaa	caccttagcccatgcaat	142	57	OS marker	<i>A. thaliana</i>	[80]
<i>Hsp 17.6</i>	AT5G12020.1	Tc09_t005320	aaggagggtggcaagtct	ttcaggtggaggcagttct	124	62.5	OS marker	<i>A. thaliana</i>	[80]
<i>UGT</i>	AT4G34131.1	Tc02v2_t008490.1	gggcactgaagaaaaagcag	ccccatagcgatctccatta	160	58.5	Overexpression during OS	<i>A. thaliana</i>	[80]
<i>NTRC</i>	AT2G41680.1	Tc05_t017060	ggttcaggctctgctggata	ctccaggaacaccaccaact	100	57	Overexpression during OS	<i>A. thaliana</i>	[326]
<i>ADH</i>	AT1G77120.1	Tc08_t012590	gttttggactgggtgctgt	ttcgacactgcatcaactc	213	60	Differential expression during waterlogging	<i>T. cacao</i>	[327]
<i>PDC</i>	LOC18596726	Tc06cons_t017450.1	ttgagattcatgatggccctt	ctcctgttctgtggatattg	150	56	Differential expression during waterlogging	<i>T. cacao</i>	[327]
<i>LDH</i>	LOC18606285	Tc03cons_t024760.1	tggtactccgtggctagct	aagacgccaccctaccaag	150	60	Differential expression during waterlogging	<i>T. cacao</i>	[327]
<i>ACPB</i>	CU536770	[321]	gcagacaagatcagcacia	aatcaaagggcagcagct	192	52	Housekeeping	<i>T. cacao</i>	[321]

**Accession No.:** indicates the database reference gene identifier. **Tc Locus name:** Orthologous Gen identifier in Cacao Genome Hub. **OS:** Oxidative stress.

## Relative expression analysis using RT-qPCR

RT-qPCR relative expression analysis was carried out in triplicates and using 3 biological replicates per condition (day 0, day 23 and day 26 after WD). All amplifications included negative template controls run in triplicate. RT-qPCR was performed using a volume of each cDNA equivalent to 5 ng of reverse-transcribed total RNA and 0.25  $\mu\text{M}$  of each primer pairs in 15  $\mu\text{l}$  of final reaction volume, using Luna Universal qPCR Master Mix® (New England Biolabs, MA, USA). Amplification assays were performed in a Quant Studio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). The threshold cycle values (Ct) of the evaluated and housekeeping genes were registered to estimate the changes in relative expression using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method [328]. Previously, amplification efficiencies were calculated according to the criteria suggested by Pfaffl (2004) [329]. The expression analyses were normalized with the *ACPB* housekeeping gene, which was the most stable across our conditions and datasets, and among all housekeeping genes evaluated.

## Statistical analysis

Analyses of variances (ANOVA) were performed to determine the effect of the clones and treatments in the physiological variables registered and whether there were significant differences in the relative gene expression of selected genes between clones and days after suspension of irrigation. Subsequently, a mean comparison analysis was performed to access statistically significant differences through LSD and Tukey's HSD *a posteriori* test ( $P < 0.05$ ). The analyses were carried out using the R software (R Studio Version 1.1.463) [330] and Statistix 9® (Analytical software, USA).

## 4.3 Results

### Physiological responses

#### Microclimatic conditions during measurements

The air temperature in the Glasshouse during the experiment ranged between 17 °C and 35 °C with a mean value of 26 °C, and the average of the relative humidity was 93% (Figure 4-1A). Furthermore, the VPD ranged between 0.7 and 2.2 kPa with a mean value of 1.3 kPa (Figure 4- 1B).

#### Leaf water potential

The  $\Psi$  was significantly different between water states at D26 and between WD plants (Figure 4-2B). In the WW clones, the  $\Psi$  remained between -0.25 and -0.16 MPa, while in clones under WD, there was a significant reduction to an approximate value of -3.0 MPa at D26 (Figure 4-2B) when the VWC reached 6% (Figure 4-2A). At D26, not all clones were affected in their  $\Psi$  similarly: the clone that showed the

highest  $\Psi$  was THS 565 (-2.06 MPa) while the clone with the lowest  $\Psi$  was ICS95 (-2.83 MPa). Interestingly, at 4 DAR, all clones previously submitted to WD showed  $\Psi$  with similar values to their respective control (WW) clones (between -0.183 and -0.266 MPa) (Table 4-3). Therefore, despite experiencing a severe water deficit stress of near to one-month length without water supply, all cacao clones were able to recover after re-watering, showing they were able to tolerate this level of stress.

**Table 4- 3 Leaf water potential ( $\Psi$ ) of the seven cacao clones under different water status.** WW: well watered, WD: Water deficit stress; D26: maximum water deficit stress of 26 days; DAR: Recovery after 4 days of rehydration after WD.

Clone	$\Psi$ (MPa)		
	Water status	D26	DAR
CCN51	WW	-0.1833 $\pm$ 0.016 a	-0.266 $\pm$ 0.016 a
	WD	-2.48 $\pm$ 0.16 cd	-0.200 $\pm$ 0.0 a
EET8	WW	-0.2125 $\pm$ 0.038 a	-0.200 $\pm$ 0.0 a
	WD	-2.50 $\pm$ 0.13 cd	-0.216 $\pm$ 0.017 a
FEAR5	WW	-0.25 $\pm$ 0.06 a	-0.216 $\pm$ 0.02 a
	WD	-2.70 $\pm$ 0.11 cd	-0.183 $\pm$ 0.06 a
ICS1	WW	-0.20 $\pm$ 0.06 a	-0.233 $\pm$ 0.033 a
	WD	-2.53 $\pm$ 0.16 cd	-0.250 $\pm$ 0.050 a
ICS60	WW	-0.26 $\pm$ 0.03 a	-0.166 $\pm$ 0.066 a
	WD	-2.33 $\pm$ 0.32 bc	-0.266 $\pm$ 0.044 a
ICS95	WW	-0.22 $\pm$ 0.02 a	-0.200 $\pm$ 0.0 a
	WD	-2.83 $\pm$ 0.14 d	-0.266 $\pm$ 0.060 a
TSH565	WW	-0.17 $\pm$ 0.03 a	-0.183 $\pm$ 0.044 a
	WD	-2.07 $\pm$ 0.04 b	-0.223 $\pm$ 0.060 a

Values are mean (n=6). Significance (P<0.05) differences after two-way ANOVA (clone x treatment) are denoted by different letters.

### Relative leaf water content and membrane permeability determination

The RWC maintained high values in all WW clones (between 86.36 and 91.33%). At D26, FEAR5, ICS60, ICS95 and TSH565 clones experimented a significant decrease in RWC (Table 4-4), with FEAR5 showing the highest water loss (80%). The other stressed clones seemed to be able to maintain RWC values similar to their cognate control plants, with EET8 and CCN51 showing the highest values (87%), with statistical differences with respect of the other clones in WD (Table 4-4).

In contrast, EL did not show significant differences between WW and WD in most of the clones, showing a value of 16% in average under WD, similarly to all WW plants,

except for ICS1 and ICS60 clones, for which a significant increase in EL upon WD was observed, reaching 23.1% and 23.4% respectively (Table 4-4).

**Table 4- 4 Changes in leaf relative water content (RWC) and electrolyte linkage (EL) at D26 in the seven cacao clones.**

Clone	Water status	RWC (%)	EL (%)
<b>CCN51</b>	WW	89.853 ± 0.88 abc	16.060 ± 1.44 b
	WD	87.450 ± 0.54 abcd	17.350 ± 1.38 b
<b>EET8</b>	WW	86.357 ± 1.97 abcde	15.280 ± 1.40 b
	WD	87.223 ± 1.89 abcd	16.670 ± 0.0 b
<b>FEAR5</b>	WW	89.760 ± 1.07 abc	16.380 ± 1.14 b
	WD	80.093 ± 1.53 e	17.780 ± 1.12 b
<b>ICS1</b>	WW	90.210 ± 1.6 ab	16.563 ± 1.62 b
	WD	83.780 ± 0.54 bcde	23.163 ± 2.16 a
<b>ICS60</b>	WW	91.333 ± 1.29 a	16.557 ± 1.76 b
	WD	83.143 ± 2.79 cde	23.460 ± 3.79 a
<b>ICS95</b>	WW	90.747 ± 1.57 a	16.193 ± 1.91 b
	WD	81.713 ± 4.28 de	19.487 ± 2.25 ab
	WW	89.923 ± 1.17 ab	15.083 ± 0.80 b
<b>TSH565</b>	WD	82.332 ± 3.21 de	16.313 ± 0.94 b

Values are mean (n=6). Significance differences (P<0.05) after two-way ANOVA (clone x treatment) are denoted by different letters.

### Leaf gas exchange

As expected, WD affected leaf gas exchange, significantly reducing A and  $g_s$ ; while  $C_i$  was increased significantly in all the clones evaluated (Figure 4-3). Under WW treatment, A values ranged from 3.4 to 5.5  $\mu\text{moles of CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ : while under WD A was almost completely inhibited (98% in average) at D26, reaching negative values, and ranging between -0.09 and 0.086  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , without significant differences between clones (Figure 4-3A). The negative values are indicative of net  $\text{CO}_2$  production in the light (*i.e.* photorespiration), which is also supported by a higher  $C_i$  concentration found under WD. Interestingly, despite reaching A values close to 0  $\mu\text{moles of CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  at WD, ICS1 and EET8 clones did not show negative values, even at D26 (Figure 4-3A).

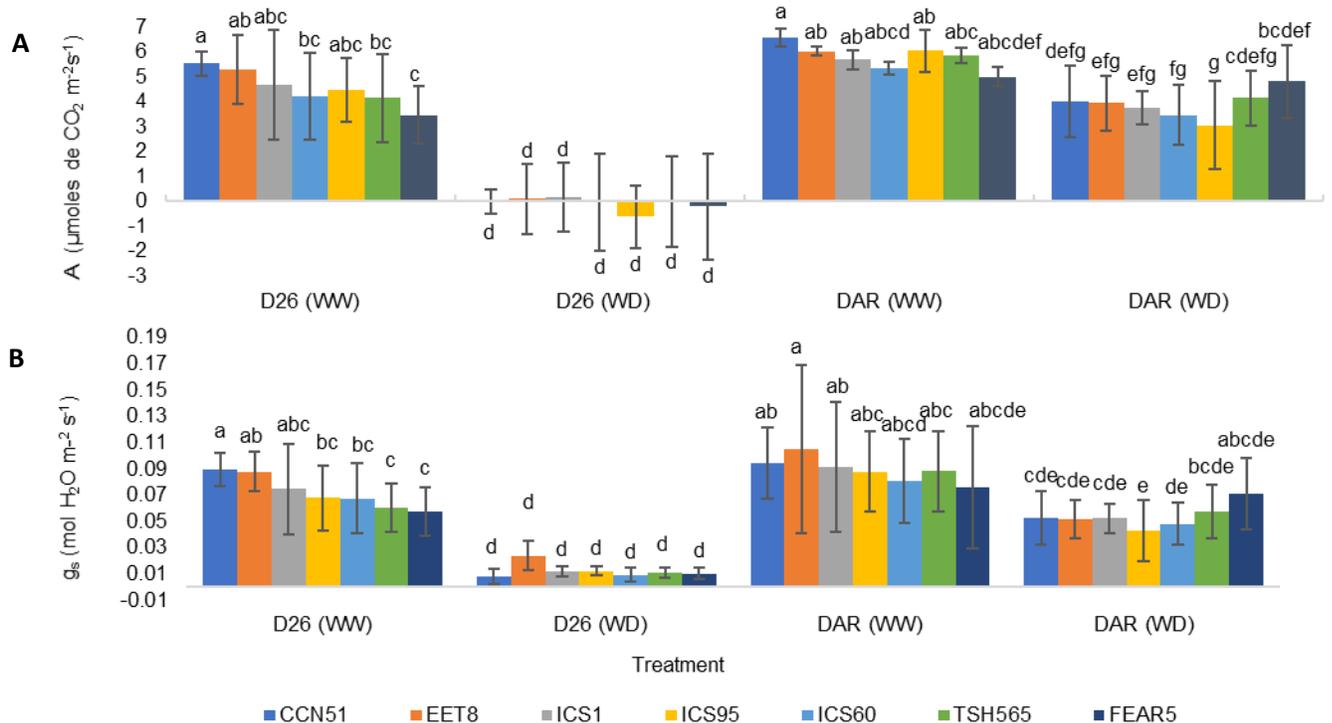
As mentioned above,  $C_i$  increased significantly under WD compared to WW plants as values rose from 264 - 278  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  to 356-447  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , accounting for a 45% increase in average due to WD (Figure 4-3D). The highest  $C_i$  values (447 and 416  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) corresponded to ICS95 and FEAR5, for which the increase was 69.1% and 54.2% respectively, and the lowest values were found for the clones CCN51 and ICS1 (356.8 and 358  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), reflecting an increase of around

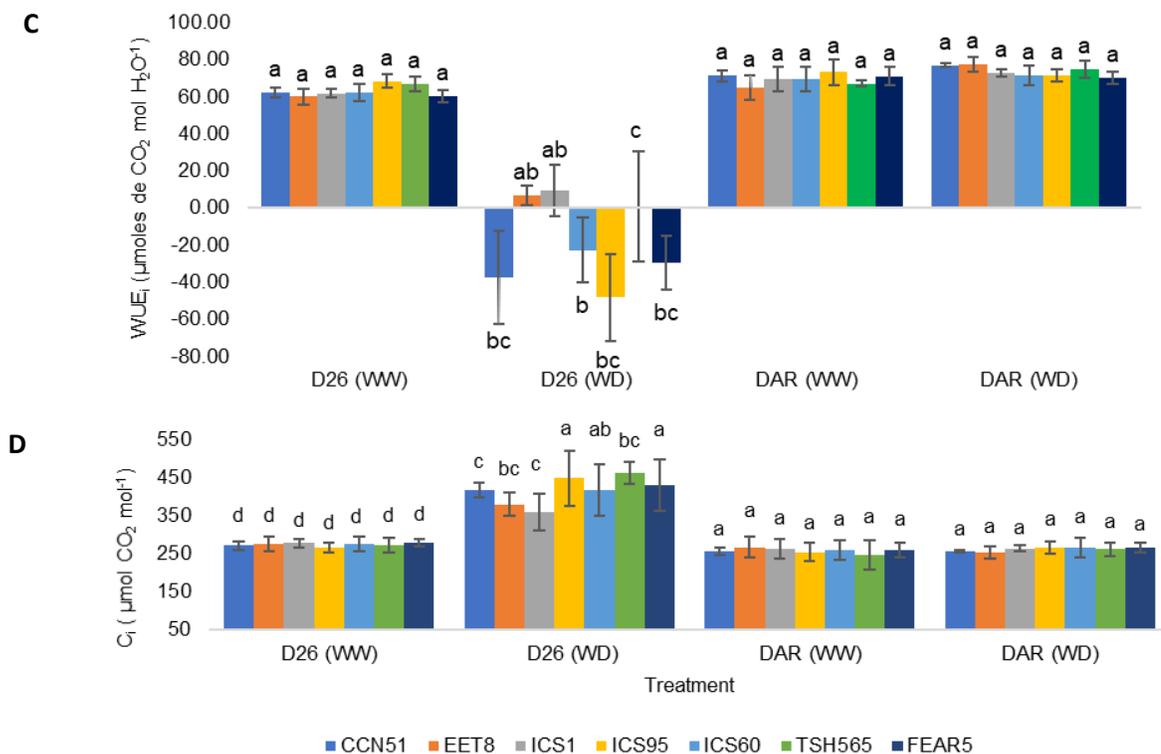
30%. Notably, significant differences were found between the clones presenting the lowest values and those showing the highest values of  $C_i$  (Figure 4-3D).

Furthermore, a significant reduction of  $g_s$  (80% on average) was observed upon WD treatment in most of the clones compared to their respective WW controls (Figure 4-3B). WW  $g_s$  values varied from 0.057 to 0.089 mol de  $H_2O\ m^{-2}s^{-1}$ , while under WD, the  $g_s$  values ranged from 0.024 to 0.008 mol of  $H_2O\ m^{-2}s^{-1}$ .

Moreover, the  $WUE_i$  was also reduced meaningfully under WD in most of the clones, reaching negative values as observed for A. Under WW condition the  $WUE_i$  varied between 60 and 69  $\mu\text{moles of } CO_2\ \text{mol } H_2O^{-1}$ , whereas under WD the values ranged from 7.150 to -49.42  $\mu\text{moles of } CO_2\ \text{mol } H_2O^{-1}$ . Importantly, under WD,  $WUE_i$  was significantly higher for clones ICS1 and EET8, compared to the other cacao clones that showed negative  $WUE_i$  (Table 4-3C).

Overall, A and  $g_s$  values of WD plants recovered gradually 4 DAR, reaching in average 50% of WW plants values, while  $C_i$  was restored to levels like those found for WW control plants (Figure 4-3). Interestingly,  $WUE_i$  reached WW values 4 DAR for all clones, without significant differences between clones and treatments.





**Figure 4- 3 Changes in photosynthesis and gas exchange parameters of the seven cacao clones under different water status. (A) A:** photosynthetic rate, **(B) g<sub>s</sub>:** stomatal conductance, **(C) WUE<sub>i</sub>:** water use efficiency, **(D) C<sub>i</sub>:** intercellular CO<sub>2</sub>; WW: well-watered, WD: Water deficit, D26: maximum water deficit of 26 days, DAR: Recovery after 4 days of rehydration after WD. Values are mean (n=9). Significance differences (P<0.05) after two-way ANOVA (clone x treatment) are denoted by different letters.

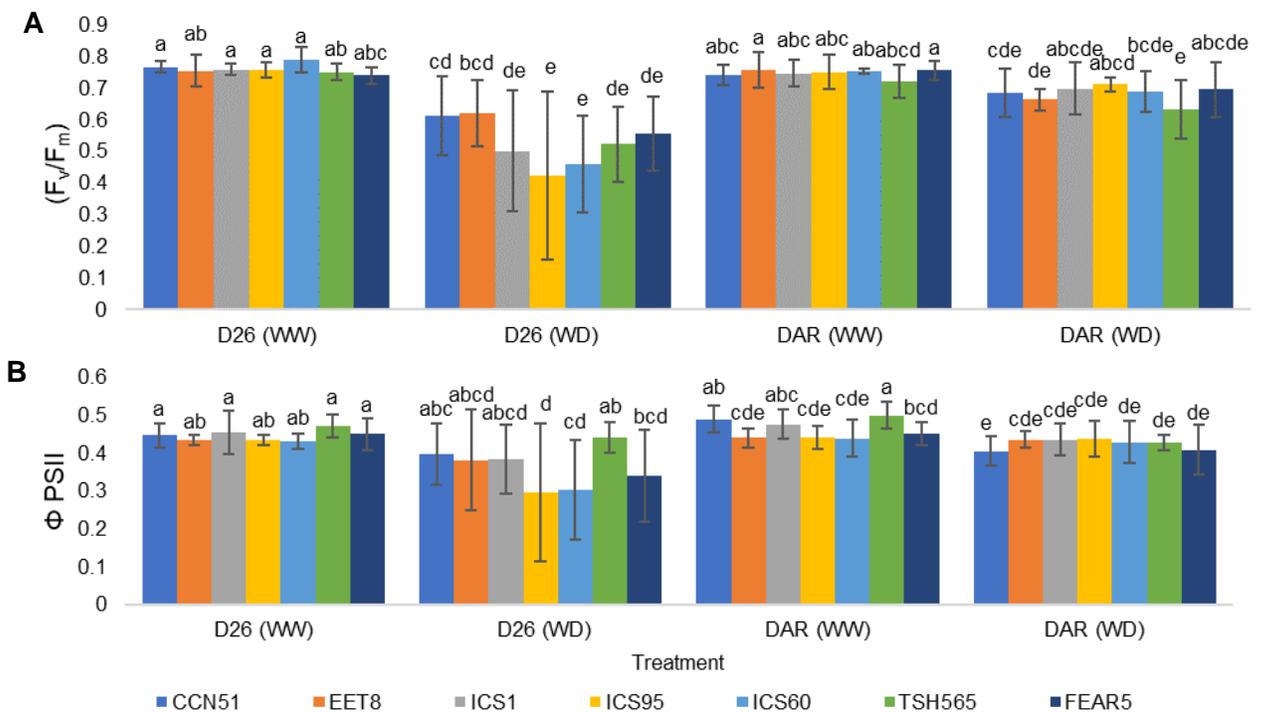
### Chlorophyll fluorescence parameters

At D26,  $F_v/F_m$  decreased significantly in clones under WD compared to WW clones, except for EET8 clone, for which no statistical differences were found. Reduction was in the range of 18 to 44%, with  $F_v/F_m$  values between 0.424 and 0.662 upon WD, compared with values around 0.750 on average for all WW clones. ICS95 and ICS60 showed the highest reduction (44 and 41% respectively), and the lowest  $F_v/F_m$  values (0.424 and 0.460, respectively) behaving significantly different to EET8 and CCN51 (Figure 4-4A). Concerning  $\Phi_{PSII}$ , no significant differences were observed between treatments for EET8, CCN51, ICS1, and TSH568 at the maximum level of stress (D26), whereas ICS95, ICS60 and FEAR5 experienced a significant  $\Phi_{PSII}$  reduction of 32, 30 and 24 %, respectively, under WD (Figure 4-4B).

Regarding the effect of rehydration on the recovery of the photosynthesis, all clones, including those that were more affected by WD, were able to recover values similar to their control (WW) clones without significant differences between them at 4 DAR. In general, the response of all evaluated clones to WD treatment seemed similar,

albeit important differences allowed to identify some clones with a better capacity to cope with the stress, as mentioned below.

Among the differences in the response to WD observed between clones, interestingly EET8 clone did not show a significant decrease neither in the  $F_v/F_m$  parameter nor in  $\Phi PSII$ , while ICS60 clone was one of the most affected in these two parameters together with a significant increase in EL, as above stated. The impact in these three parameters, particularly  $F_v/F_m$ , could reflect photoinhibition by oxidation, assessing the existence of this condition to be relevant in *T. cacao*. Therefore, to determine both, the extent of this probable oxidative stress induced under WD, and whether different cacao clones responded differently regarding the activation of their antioxidant system, a gene-expression profiling was carried out on three selected cacao clones: the two most contrasting clones with regards to their photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters, as well as EL parameter (EET8 and ICS60), together with TSH565 clone, which maintained the highest water potential under WD.



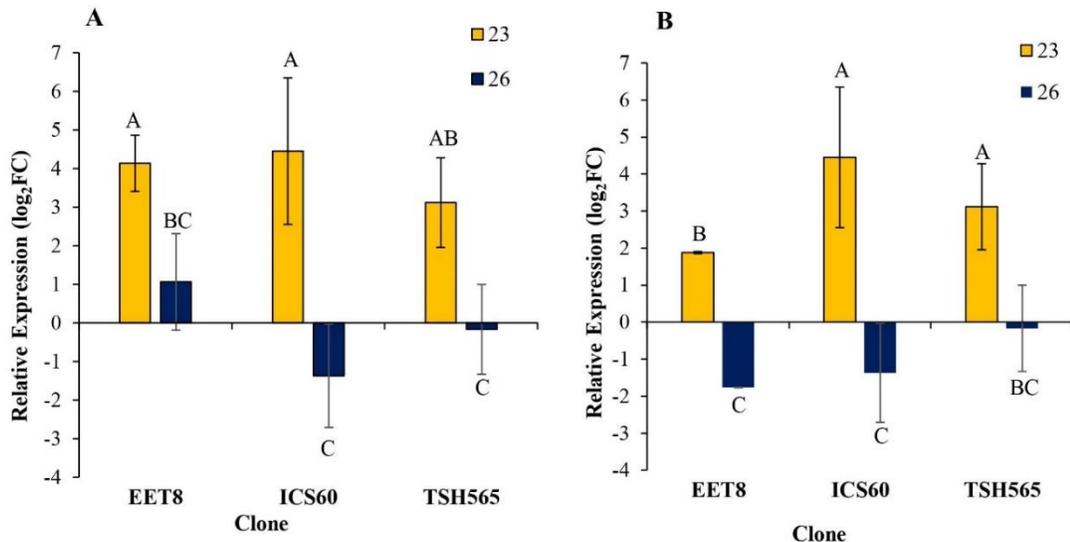
**Figure 4- 4 Changes in maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) (A) and (B) relative quantum yield of PSII ( $\Phi PSII$ ) of cacao clones under different water status. WW: well-watered, WD: Water deficit, D26: maximum water deficit of 26 days, DAR: Recovery after 4 days of rehydration after WD. Values are mean (n=9). Significance differences ( $P < 0.05$ ) after two-way ANOVA (clone x treatment) are denoted by different letters.**

## Drought and oxidative stress-related gene expression profiling

The genes used to evaluate the activation of an oxidative stress-response under DS in *T. cacao* (Table 4-2) were grouped into three categories, according to the function to which they have been associated according to the literature: 1) Markers of oxidative stress [153], 2) Crosstalk between water deficit and oxidative stress [153,323–326], and 3) possible switch to fermentative metabolism [327]. Furthermore, to observe the progressive change in the expression patterns of these genes in response to the severity of water deficit, these genes were evaluated before, near to the end and at the end or maximum level of WD, which corresponded to day 0, 23 and 26, respectively.

### Oxidative stress markers GST and HSP

Significant differences in the expression patterns of these two oxidative stress markers were found after water deprivation in all three clones evaluated (Figure 4 - 5). Interestingly a strong upregulation was observed at D23 in all clones, which was significantly either reduced or undetectable at the maximum stress level (D26). Although no significant differences were found between clones for *GST* expression profiles, at D26, EET8 was the only one to maintain induction of both *GST* and *HSP* genes, compared to both ICS60 and TSH565 clones, which showed a downregulation pattern at the maximum level of WD (D26).

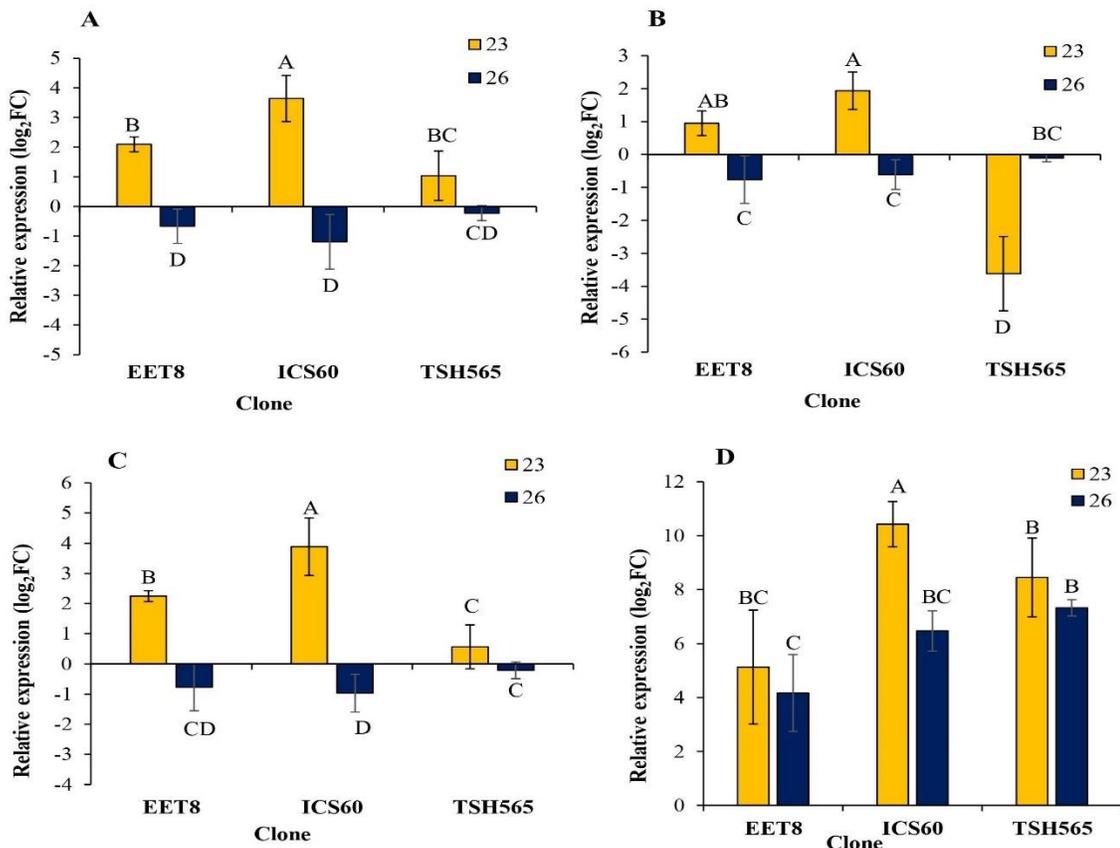


**Figure 4- 5 Effect of water deficit on the transcriptional expression of oxidative stress markers. (A) GST; (B) Hsp17.6.** Bars represent the averages of the induction factor (Log<sub>2</sub> Fold Change) ± standard deviation (n = 3) relative to the control (day 0). The letters indicate the statistically significant differences between day 23 and 26 of water deficit (P < 0.05).

In contrast, for the *HSP* gene, the upregulation observed at D23 was significantly higher in ICS60 and TSH565 clones, than in EET8. Although there were few differences in the expression profiles between clones, the strong induction of both oxidative stress markers observed at D23, before the maximum level of stress, suggests that WD triggered oxidative stress in all cacao clones.

### Crosstalk between water deficit and oxidative stress

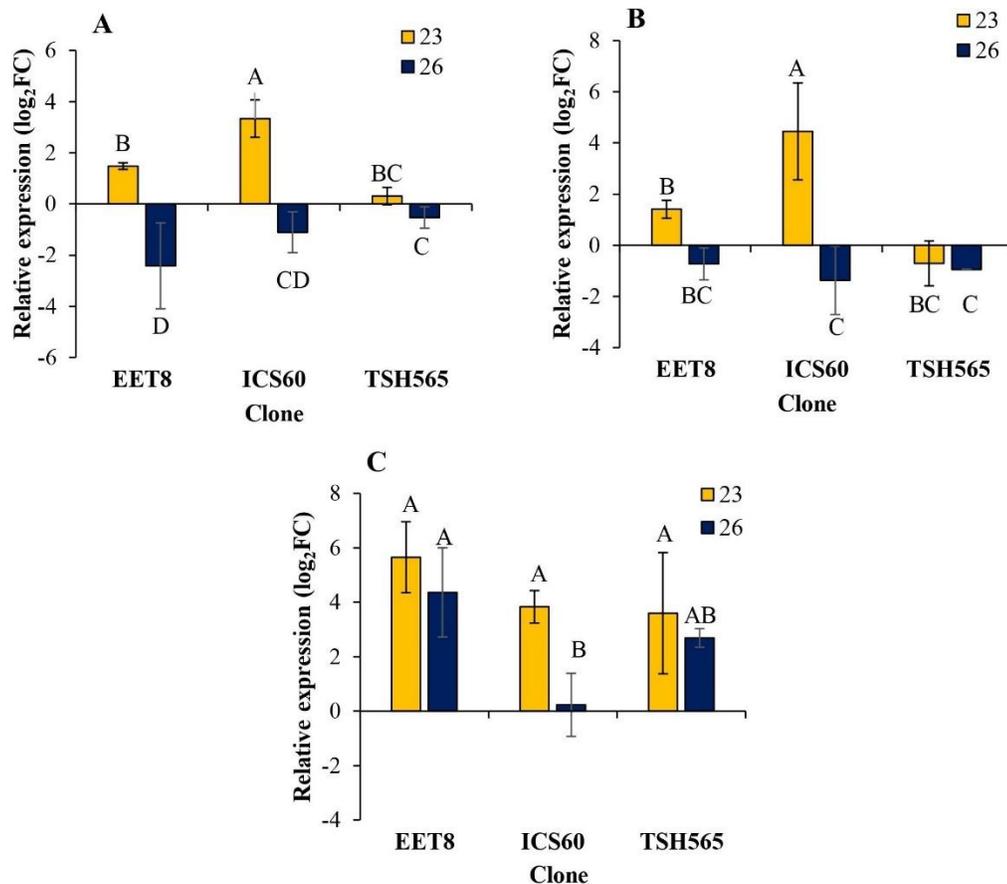
Furthermore, genes encoding enzymes of the antioxidant system (*RBOHF*, *NTRC*, *UDPGT* and *SOD*) were analysed according to their expression profile in response to WD in cacao. In general, all genes showed a similar pattern to that found for *GST* and *HSP*, *i.e.* a significant induction at D23 in all clones (Figure 4-6A), except for TSH565, which presented a downregulation of *NTRC* expression at this point (Figure 4-6B). Interestingly, *RBOHF*, *UDPGT* and *SOD* were more induced in the ICS60 clone than in the others clones.



**Figure 4-6 Effect of water deficit on the transcriptional expression of genes encoding antioxidant enzymes. (A) *RBOHF*; (B) *NTRC*; (C) *UDPGT*; (D) *SOD*.** Bars represent the averages of the induction factor (Log<sub>2</sub> Fold Change) ± standard deviation (n = 3) relative to the control (day 0). The letters indicate the statistically significant differences between day 23 and 26 of water deficit (P < 0.05)

Nonetheless, UDPGT induction levels were significantly higher in ICS60 followed by EET8 and the lowest induction was observed for TSH565 (Figure 4-6C). Finally, as observed for *GST* and *HSP*, most genes experienced a reversion of this upregulation in all clones at D26, except for *SOD* in TSH565 and EET8 clones in which this ROS transcript maintained an up-regulated state at this point, while in ICS60, it showed a significant reduction between D23 and D26 (Figure 4-6D).

### Possible switch to fermentative metabolism



**Figure 4-7 Effect of water deficit on the transcriptional expression of genes encoding fermentative metabolism enzymes. (A) *LDH*; (B) *PDC*; (C) *ADH*.** Bars represent the averages of the induction factor (Log<sub>2</sub> Fold Change) ± standard deviation (n = 3) relative to the control (day 0). The letters indicate the statistically significant differences between day 23 and 26 of water deficit (P<0.05)

Interestingly, the expression patterns of fermentative enzymes coding transcripts showed a general behavior similar to the one observed for antioxidant enzymes, *i.e.* they all presented a significant upregulation at D23 in the three clones, except for *PDC* transcript in TSH565, which was downregulated (Figure 4-7). Induction patterns at D23 presented differences between clones for *LDH* and *PDC* transcripts, and in

both cases, a significantly higher level of induction was found for ICS60. In contrast, no differences in induction levels were found for *ADH* transcript between the three clones. Finally, as observed for most of the antioxidant enzymes, reversion of this upregulation at D26 was presented for *LDH* and *PDC* transcripts in all clones, whereas for *ADH* induction seemed maintained in all clones, although a significant reduction was observed in ICS60 (Figure 4-7C).

### 5.3 Discussion

#### Physiological responses of cacao clones to drought

This research aimed to characterize and compare the physiological responses of seven commercial cacao clones. Our results show some clear differences between clones, reflecting different levels of tolerance among them, although all clones were able to recover from a pronounced water deficit stress of 26 days long. One key variable that is typically recorded in plants under drought condition and which is directly associated with tolerance to WD is the  $\Psi$ , as it indicates the plant water status, denoting, therefore, not only its ability for soil water uptake but also for avoiding water loss (dehydration) [331,332]. In this study,  $\Psi$  decreased in all cacao clones to values below -2.3 MPa at the maximum level of WD (D26). However, TSH565 clone showed highest  $\Psi$  value (-2.07 MPa), being less affected than the rest of the clones (Table 4-3), which suggests a higher capacity of this clone to maintain water homeostasis in the leaf tissues and cells' turgor under severe water deficit. Balasimha *et al.*, [113] noted that drought-tolerant cacao genotypes were able to maintain less negative  $\Psi$  during the driest months of the year. So, this ability which accounts for TSH565 clone, allows to propose this genotype as tolerant to water deficit stress [11,43,113]. Moreover, this reduction in  $\Psi$  under limiting conditions, is related to the low availability of water in the soil since, after suspending the plant irrigation, the VWC of the soil dropped gradually to 6% (Figure 4-2A). Lozano and Fonseca, [21] reported that at 10% VWC, the soil lacks available water for plants and Medina and Laliberte, (2017) [11] proposed that in cacao, severe stress occurs below water potential values of -1.76 MPa. Our results agree with previous studies carried out in cacao and reporting that the reduction in  $\Psi$  to values below -1.3 MPa [21] is a direct consequence of the reduction in the soil VWC caused by the periods of drought [5,21,24,44]. Indeed, upon re-watering at 4 DAR, the cacao clones restored the  $\Psi$  to values close to those of WW plants (Figure 4-2B). In previous research, the stomatal sensitivity for regulating water loss, has been proposed as an important physiological trait of adaptation to drought stress, as it may reflect a better ability to cope with WD during the resulting acclimation response of the plant, becoming the main mechanism to efficiently control water equilibrium and avoid

water loss by transpiration [45,91]. However as it is strongly affected by the evaporative demand of the atmosphere [5,21,333,334], during the experiment time course, microclimatic variables were monitored to evaluate their influence in physiological parameters. Although VPD tended to increase with temperature accordingly, the VPD mean value (1.3 kPa) observed, indicated that the evaporative demand did not contribute to cause a decrease in  $g_s$  or  $A$  in the plants, since the normal stomata closure values in cacao are close to 1.8 kPa as reported previously [21]. Indeed, in *T. cacao* plants, VPD increase caused a linear decrease of  $g_s$ , but  $A$  decrease occur only at VPD values up to 2.0 kPa [5,21,91,113,233], a threshold that was not reached in our experiment time course.

Furthermore, the reduction in  $g_s$  under WD, as a direct consequence of stomatal closure and despite being an acclimation response of plants [76], is also considered a trait related with tolerance, as it is part of the avoidance response mechanism to reduce water loss by transpiration under water deficit, and thus to maintain RWC, which prevents tissue damages [335]. In the current study, the reduction in  $g_s$  by almost 80% in all cacao clones evaluated (Figure 4-3B) suggests a stomatal-sensitive response for the regulation of water loss by transpiration, with the consequent reduction in  $A$  due to the reduction in  $CO_2$  uptake. Despite these similarities between clones, EET8 showed the highest  $g_s$  at D26 under WD (Figure 4-3B), which may have influenced the maintaining of higher  $CO_2$  assimilation, as reflected both by a positive  $A$  compared to the other clones, as well as a higher  $F_v/F_m$  value reflecting no affectation of the PSII photochemical activity under WD. In contrast, the ICS60 clone exhibited the highest reduction in  $g_s$  together with a negative  $A$  value under WD, indicative of photorespiration and no net carbon assimilation, clearly showing a reduced performance of this clone under WD and therefore a lesser stress tolerance [43,45].

This stomatal-driven decrease in  $A$  and  $g_s$ , near and below zero values at D26 in cacao clones, is in agreement with previous studies on the response of cacao to WD [24,26,52,63,232]; the negative values were linked to the high rate of photorespiration found in cacao due to the high point of  $CO_2$  compensation exhibited, and attributed to a possible photoprotective role [36]. These studies were carried out both in greenhouses and in the field with young and adult plants and with drought treatments imposed and due to dry seasons, respectively. Furthermore, Joly & Hahn, (1989) [311] mentioned that under severe water deficit stress,  $CO_2$  assimilation drops notably, reaching zero due to turgor loss and becoming negative when respiration overtakes photosynthesis. Finally, our findings are in accordance with a previous study where different trinitarian cacao hybrids (TSH clones) were evaluated [336]: the most tolerant to WD showed little or no change in  $g_s$  and  $E$ , while the most susceptible clones to WD presented earlier declines in  $g_s$ . Amongst the evaluated clones, they proposed TSH919 as the most tolerant to WD based on its higher  $\Psi$  under stressing conditions, corroborating the use of this parameter as key for the WD tolerance ranking of cacao clones.

As above mentioned, the observed stomatal closure allowed to keep the RWC above 80% in all clones at D26 under WD, maintaining leaf turgor and preventing the tissue damage, as a known mechanism of WD avoidance. Similar responses have been found in other cacao clones exposed to water deficit without a reduction in RWC [23,24,26,91]. This ability has also been attributed to an osmotic adjustment mechanism, contributing to maintain leaf hydration and cell turgor during WD [11]. Additionally, this mechanism may be involved in the maintaining of membrane structural integrity and prevention of the oxidative damage by scavenging ROS, which induce oxidative degradation of the lipid bilayer causing electrolyte leakage. Therefore, its activation under WD may prevent the essential solutes to leak out [337–339]. Complementary biochemical analyses aiming at quantifying accumulation of compatible solutes or activation of their cognate biosynthetic genes are needed to corroborate this probable osmoregulation response [63,91].

Equally important, the  $WUE_i$ , a variable which relates  $A$  and  $g_s$  [5,69] is indicative of water uptake by roots with minimal stomatal opening and thus less water loss through transpiration. It is also an indicator of the maintenance of atmospheric  $CO_2$  assimilation and thus photosynthesis. Therefore, it is also considered as a key variable often associated with drought tolerance when comparing genotypes [44]. In the current study,  $WUE_i$  was markedly reduced under WD in all the cacao clones, compared to the WW plants. However, at D26, ICS1 and EET8 clones presented higher  $WUE_i$ , which suggests that these two clones have developed mechanisms to optimize the balance between ensuring a minimal photosynthetic rate, and reducing water loss through transpiration, both dependent on  $g_s$  reduction. This capacity of a genotype to maintain carbon assimilation and photosynthesis under reduced water availability is reflected in high  $WUE_i$  and indicative of a higher stress tolerance [69]. Conversely, the reduction in  $WUE_i$  has been attributed to severe stress status, possible damages of photosynthetic apparatus or oxidative stress occurrence [5]. Interestingly, variation (i.e. increase or decrease) in  $WUE_i$  in response to drought seems to be a genotype-dependant trait, as has been observed previously and was also the case in our study [5,36,63,340].

Besides and related to the relationship between carbon fixation and stomatal closure,  $C_i$  parameter appears also to be a good indicator of the rate of effective  $CO_2$  consumption under stomatal conductance limitation: accordingly, under WD, EET8 presented lower  $C_i$  values than ICS60, indicating a higher  $CO_2$  consumption rate, allowed by a higher  $g_s$ , and reflected in the higher photosynthetic performance ( $A$ ) observed for EET8 clone compared to ICS60.

Altogether, the above results clearly support that Cacao response to water deficit is strongly governed by stomatal conductance, as the main limiting factor of photosynthetic performance under WD, as has been previously reported. However, our results related to chlorophyll fluorescence, showed a reduction of both  $F_v/F_m$  and

$\Phi$ PSII values upon WD in clones that exhibited a lesser tolerance based on water status, or gas exchanges parameters (*i.e.* ICS60 and ICS95). In contrast, stressed EET8 clones showed  $F_v/F_m$  and  $\Phi$ PSII values similar to those obtained in their cognate WW controls.  $F_v/F_m$  reduction has been related to a photoinhibition phenomenon, with the concomitant reduction in  $\Phi$ PSII and increase in  $C_i$ . Cacao response to WD may therefore have two limiting phases depending on the genotype: one initial and stomatal-controlled phase, resulting in a substantial reduction in  $A$  and  $C_i$  as  $g_s$  decreased, followed by a second and strongly photosynthetically limited phase causing the increasing of  $C_i$  while  $F_v/F_m$  and  $\Phi$ PSII dropped as an indication of the onset of non-reversible photoinhibition and photosynthetic apparatus damages. These two sequential phases have been described in the response to severe WD in other woody species [230,341]. A similar response was found in previous researches carried out with other cacao clones submitted to WD, either in glasshouse or in-field conditions, and with different light intensity regimes (*i.e.* sunlight or shade light): in all cases a reduction in  $F_v/F_m$  was observed, reaching values between 0.2 and 0.7, and with a concomitant reduction in  $\Phi$ PSII as well [43,44,52,63,230]. According to Baker, (2008) [149] plants without chronic photoinhibition present  $F_v/F_m$  values in the range of 0.71 to 0.83, and evidence of oxidative damage is present when basal fluorescence increases and  $F_v/F_m$  values are below 0.6, as observed in most of the clones under WD in our present study. The rapid loss of PSII photochemical efficiency, as a result of water deficit, has been attributed to possible damage to the PSII light-harvesting complex, caused by stress-induced oxidative burst, increased leaf chlorosis or decreased root carbohydrates concentrations, with the subsequent plant death [231,327,342]. However, all evaluated clones were able to recover rapidly, reaching values of  $F_v/F_m$  at 4 DAR either similar or higher than WW plants, indicating that the observed drop in photosystem efficiency and possible damages, were reversible, even after maximum WD. This response could be related to oxidative stress, photoinhibition and changes in metabolism that all together, trigger plant photoprotective mechanisms as well as water homeostasis and energetic metabolism maintaining, rather than representing irreversible damages [166]. Efficient PSII repair mechanisms, for example through the activation of D1 protein turnover or size adjustment of the photosynthetic antenna by the degradation of chlorophyll-binding proteins, as a preventive mechanism of photoinhibition, and activation of the antioxidant system, are considered key tolerance mechanisms of plants to WD [226], as they can lead to a complete recovery of plant photosynthesis.

Furthermore, rapid inhibition of photochemistry with irreversible damage in the photosynthetic apparatus occurs in plants not able to recover pre-drought levels of  $A$  and showing visual signs of leaf damage or senescence after continued drought [341]. In our case, the overall values of  $A$ ,  $F_v/F_m$  and  $\Phi$ PSII behaviour, marked by a fast recovery of pre-drought state, observed for all cacao clones, could strongly suggest the activation of the above-mentioned efficient damage-repair mechanisms.

Finally, EL, an indicator associated with membrane integrity and stability that has also been linked to drought tolerance [316,343]. This physiological parameter has also been related with osmotic adjustment, because it can prevent damage to the membrane and the consequent loss of electrolytes and contributes to cellular turgor maintenance. Specifically, all cacao clones showed similar responses, in particular, they were able to maintain cell turgor and consequently membrane integrity without electrolyte leakage through leaf mesophyll cells, which could be related to the osmotic adjustment mechanism [337,338]. In the case of ICS60 and ICS1 clones, the slight increase observed in EL could indicate possible WD-induced membrane damage, which may have occurred by lipid peroxidation due to ROS formation and oxidative stress response, a phenomenon also found in cacao seedlings subjected to Cu toxicity [316]. Likewise, as revealed through several parameters, ICS60 clone appears to be more affected by WD, and therefore more susceptible, compared to the other clones.

Overall, the above-discussed results concerning cacao hybrids physiological response to WD, suggest that the exposure time to water stress by suspension of irrigation for 26 days represented a severe water deficit stress for all cacao clones evaluated. Although all clones were able to recover quickly (at 4 DAR), the results gave enough clues to suggest differences amongst clones in their responses related to their capacity to tolerate WD, at least under our experimental conditions. Thus, our results indicates that EET8 clone was the most performant under WD, whereas ICS60 was seemingly the less tolerant. As these differences could reflect changes in acclimation responses, which in turns could be either genetically or epigenetically-dependent [75], and because photoinhibition mechanisms were observed under WD suggesting a secondary oxidative stress induction, a preliminary approach to the activation of the antioxidant system at the transcriptional level, was carried out in these clones to complement these findings.

### **Oxidative stress response gene expression profile**

Only EET8, ICS60 and TSH565 clones and leaf organ responses were evaluated in this section, since they showed most of the differences in behaviour according to photosynthetic parameters, as well as in water potential. Interestingly, our gene expression profiling results appeared to confirm that photochemical (non-stomatal limited) reaction was affected, and a typical oxidative stress response occurred in cacao upon WD. Indeed, gene activation related to oxidative-stress related genes was seemingly directed to protect leaf-cells, as the expression of canonical oxidative stress repair marker genes, *GST* and *HSP*, showed high induction in the three clones evaluated at D23, with a probable much earlier induction. This could be related to an effort of cacao plants to prevent or attenuate the negative effects of ROS increase triggered by the WD imposed. This activation has been reported as an early

response induced in plants to protect protein structures and lipids against possible damages caused by ROS, and tending to accumulate as a consequence of photorespiration [219,344,345].

As above stated, these kinds of damages were also evidenced by the low values of  $F_v/F_m$ , probably affecting A, together with the drop of  $g_s$ , both responses evidenced during WD. *GST* is a key enzyme in ROS detoxification due to its conjugation with glutathione [346–348], its relationship with the enzyme glutathione peroxidase and the detoxification of lipidic hydroperoxides [346]. The induction of *GST* expression has been linked as an early and key mechanism in *Arabidopsis*, wheat and tobacco for ROS detoxification triggered by abiotic stress [80,345,349]. Besides, *Hsp17.6*, belongs to the Small Heat Shock Proteins family, mainly found in plants and linked to ROS tolerance, as it protects enzymes related with the maintenance of metabolic pathways either encoded by housekeeping or stress-related genes [350–352]. Thence, the upregulation of *Hsp17.6* has been described as a molecular signature indicating the severity of oxidative stress [80,352,353]. Although these oxidative-stress markers were induced under WD in all three clones evaluated, EET8 clone presented the lowest induction fold change in both genes, suggesting a probable lesser oxidative burst or fewer adverse intracellular damages to repair in this clone compared to the others, accordingly with its respective physiological behaviour, as discussed previously.

Likewise, *RBOHF* showed a significant induction at D23 in all three evaluated clones, interestingly not maintained at D26, when the maximum level of WD was reached. This expression pattern (i.e. a strong induction followed by a downregulation) may indicate that the transcriptional activation of this pathway in *T.cacao* could have happened earlier, even before D23, when water status-related physiological parameters started to decrease and the related stress is perceived systemically by the plant. Moreover, this early upregulation could also be related to the physiological regulation of stress response, since the *RBOHF* protein exerts regulatory functions on ABA, the master mediator of the systemic response to WD [76,354]. Among its several plant regulatory functions, ABA influences guard cell turgor and therefore regulates stomatal closure [354,355], which is essential to reduce water loss, as was registered in all cacao clones evaluated (Table 4-3). Regarding the downregulation of *RBOHF* at D26, observed after a previous activation, this is a rather common pattern of expression found for many stress-response genes, which does not necessarily reflect neither the cognate protein level nor its activity. Still, such a pattern more likely obeys either to a temporally limited function associated to its signalling and regulatory roles, which is necessary for metabolic energy saving under stress conditions, or to possible relays of activation that seemingly happen in cascade, as part of the complex gene regulatory network controlling water-deficit stress response in plants [75].

Interestingly, the ICS60 clone which showed a higher *RBOHF* induction, also showed significantly higher induction of *SOD* at D23, compared to TSH565 and EET8 clones. However, it should be noted that these clones also exhibited high induction of the *SOD*. In any case, the coordinated induction of *RBOHF* and *SOD* suggests that, at least at the transcriptional level, plants possibly activated compensatory mechanism to counteract ROS accumulation in response to DS [219] orchestrating gene induction by retrograde signalling, as part of a Systemic Acquired Acclimation response [355] necessary for the tolerance and recovery of the evaluated cacao clones.

Concerning *NTRC* expression profiling, although a downregulation was observed at D23 for TSH565 clone, in contrast to the induction observed for ICS60 and EET8, at D26 a down-regulation was the common pattern for all three clones. *NTRC* appears to follow a similar expression pattern than *HSP* and *RBOHF* (i.e. induction followed by repression at the maximum level of stress) suggesting a probable co-regulation as part of common gene regulatory network controlling this systemic response to WD. Indeed, thioredoxins (*NTRC*) are disulphide reductases that regulate the redox state of other proteins and lipid peroxides. Therefore, their function has been related to the maintenance of metabolic pathways occurring in chloroplasts, such as photosynthesis, as a consequence of a stressing condition [89,356]. The *NTRC* protein family has been shown to protect chloroplasts from photo-oxidative damages generated by light stress and drought, both in rice [357] and *Arabidopsis* [326,358,359]. Furthermore, there is evidence indicating that thioredoxins could act as regulators of ROS scavenging and as components of signaling pathways in the antioxidant system response of plants [326].

Similarly, *UDPGT* followed a similar profile i.e. upregulated at D23 and downregulated at D26 in all clones. As *UDPGT* belongs to a family of enzymes responsible for glycosylation of regulator of plant, flavonoids, terpenoids and steroids [360], its activation is necessary to maintain the bioactivity of enzymatic cofactors and regulator of plants, including ABA, during stress condition [360,361]. As reported by Li *et al.*, (2017) [362], the overexpression of *UGT79B2/B3* increases anthocyanin accumulation, improving the antioxidant activity in salinity stress, low temperatures and drought in *Arabidopsis*. In this study, we evaluated the orthologue in *T. cacao* of *Arabidopsis* AT4G34131.1(*UGT73B3*) gene (Table 5-2). Rehman *et al.*, (2018) [361] proposed that this gene has a role in drought tolerance and oxidative stress response as well. Accordingly, the registered induction of *UDPGT* observed suggests that it could have similar functional roles, helping the plants to lead with both kinds of stresses.

Ethanol synthesis and its accumulation have been reported as indicators of stress in plants, such as water deficit stress, affecting cellular energy via oxidative phosphorylation [363]. This can occur due to aerobic respiration depletion, either by

limiting the O<sub>2</sub> supply or by mitochondrial damage [364,365]. Under an adequate O<sub>2</sub> supply, the tissues metabolize pyruvate by oxidative phosphorylation, while with low levels of O<sub>2</sub> concentrations (hypoxia) or completely depleted (anoxia), the cytoplasmic pH drops, increasing the activity of the two fermentation enzymes (pyruvate decarboxylase -*PDC* and alcohol dehydrogenase -*ADH*) responsible of the ethanol accumulation in the cell's cytoplasm. This ethanol allows the regeneration of NAD<sup>+</sup> needed for glycolysis to continue producing the energy (ATP). In addition it contributes to maintain membrane integrity and its minimal functioning, as well as to stabilize cellular pH, avoiding lethal acidosis until aerobic respiration resumes [363]. Here, *PDC*, *ADH* and *LDH* transcripts were evaluated to access other effects of WD treatment in energy metabolism.

To this respect, *LDH* gene, encoding a key enzyme involved in fermentative metabolism was also upregulated at D23 and downregulated at D26 in the three clones. This pattern of expression suggests that the physiological stress caused by WD possibly triggered hypoxia in the cacao plants either by limiting oxygen supply or by accumulated damages in the mitochondria. Consequently, energy production by activation of the fermentative metabolism may be part of the acclimation strategy upon WD in cacao. When hypoxia occurs, the predominant pathway is alcohol fermentation, where pyruvate is converted to acetaldehyde by pyruvate decarboxylase and then to ethanol by alcohol dehydrogenase [366]. However, in addition to ethanol fermentation, plants also have a lactic acid fermentation pathway, where lactate dehydrogenase converts pyruvate to lactate. The relative activity of both fermentation pathways has often been correlated with tolerance to hypoxia or anoxia [366]. Then, an increase of the levels of the *LDH* transcript, recorded at D23, suggests that possibly the encoded protein was accumulated in an early phase, to attend the hypoxic condition later.

In agreement with the above, ICS60 and EET8 clones showed induction of *PDC* gene at D23, and all clones showed upregulation of *ADH* both at D23 and D26. Upregulation of the enzymes *PDC* and *ADH* is essential to maintain the generation of ATP, the energy piece required to keep the general metabolism functioning [367,368]. Although *LDH*, *PDC* and *ADH* genes do not seem to follow a fully coordinated expression pattern between clones, it was evident as a general tendency, that cacao may have switched its energetic metabolism, from oxidative to fermentative as part of its acclimation response to WD, at least at the transcriptional level, which needs further experimental analysis at the protein expression and enzymatic activity level. Most of the leaves in all clones entered in senescence at the maximum level of WD (D26), which could be a possible explanation for the general downregulation pattern observed at the transcriptional level for some of the fermentative metabolism genes, as well as all genes evaluated, and caused by a drastic change in energetic metabolism, with a probable trade-off between

fermentative metabolism and maintenance respiration. However, transcriptional repression of a gene does not necessarily imply a drop of its respective protein level or activity, which could be maintained further. A similar behaviour was described in conifers, finding that all aerial tissues of drought-stressed seedlings accumulated ethanol when the tissues were near death or dying [364].

The expression patterns of fermentative genes observed here upon WD had not previously been registered in cacao, as is the case in *A. thaliana*, mainly in roots and stems [366,369,370]. However, the induction of these genes was reported in cacao plants under waterlogging [327]. These proteins, together with different proteins associated with photosynthesis and oxidative stress, were proposed as determining factors to distinguish between a tolerant genotype (TSH-792) to waterlogging and a susceptible one (TSH-774) [327].

Most land plants experience mild flooding, but not all species have developed adaptations to grow and survive drastic changes in the water availability in their environment [306,371–373]. It looks like *T. cacao* can induce the activation of fermentative pathways mediated by LDH, PDC and ADH both in water excess and deficit, which, beyond being part of an acclimation response to probable stress-induced hypoxia, may constitute an adaptive- plasticity trait to respond to different hydrological regimes naturally occurring in the Amazon rainforest, a seasonally flooded region which is also the central of origin of *Theobroma* species [97,290]. Altogether these findings suggest the need of further integrated genetic, transcriptional, physiological, and biochemical characterisations of cacao germplasm, particularly directed to compare *trinitario*, *criollo* and *forastero* genotypes, to give more insights into the different adaptative and acclimation counterparts of the cacao response and tolerance to WD.

## 5.6 Concluding remarks.

The results of the current study confirmed that the irrigation suspension period applied in the seven cacao clones led to severe drought stress. As a first early response to WD, cacao plants exhibited regulation of stomatal closure (stomatal limitation) linked to the stress-avoidance mechanism; then, when WD became severe, a second phase response emerged with the downregulation of photosynthetic efficiency (non-stomatal limitation), because of oxidative stress and photoinhibition caused by WD. However, all plants recovered fast (4 DAR) probably by the mediation of the antioxidant system as well as the PSII repair mechanisms efficiency and the turnover of the chloroplast and its components, a crucial response for maintaining photosynthesis and metabolism under stress condition [374]. Despite all stressed cacao clones recovered, EET8 exhibited the highest tolerance, TSH565

a moderate response and ICS60 the highest susceptibility. Overall, the physiological response observed suggests that these cacao clones showed high phenotypic plasticity [115] and different levels of tolerance to drought that may allow them to respond to WD with diverse efficiency and more or less affectations at different levels. We report for the first-time new insights of cacao response to WD related to the participation of the antioxidant system and its probable role for the physiological readjustment, protection, and energetic metabolism maintenance in *T. cacao*. Considering ways forward and the need for improvement of cacao varieties more tolerant to future climatic conditions caused by global warming, it becomes urgent to look beyond and develop further research with the integration of genetic, physiological, and multiple functional genomics approaches, to elucidate and generate further knowledge on the genetic and epigenetic bases of cacao WD response and tolerance.

**Capítulo 5. Caracterización de la respuesta fisiológica de tres híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) al estrés déficit hídrico**

## 5.1 Resumen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol con importancia económica debido a que, de la semilla que produce, se obtiene el chocolate y la manteca de cacao, productos utilizados en diferentes tipos de industrias. En diversas regiones del mundo la producción de cacao es afectada por la ocurrencia de eventos climáticos que generan periodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta fisiológica de tres clones comerciales de cacao frente al déficit hídrico. Para ello, se aplicó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo de bloques completos al azar con 3 repeticiones. En la parcela principal se evaluaron dos tratamientos de disponibilidad de agua en el suelo: - Capacidad de campo y déficit hídrico por suspensión de riego: en el primero se mantuvieron las plantas durante el período de evaluación con un potencial hídrico foliar entre -0.2 a -0.4 MPa; en el segundo, se suspendió el riego hasta que las plantas alcanzaron un potencial hídrico foliar de -3.0 MPa, lo cual ocurrió a los 52 días, momento en el que se reanuda el riego y se evaluó la recuperación. En la subparcela se evaluaron los clones: EET 8, TSH 565 e ICS 60. Se evaluaron los efectos del déficit hídrico con la medición de parámetros fisiológicos relacionados con el estado hídrico de las plantas, el intercambio gaseoso, la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, y el crecimiento. El DH afectó a los clones de forma distinta. Los tres clones mostraron disminuciones en el  $\Psi$  siendo el clon EET 8 el que presentó una reducción más pronunciada. El clon TSH 565 mostró una mayor capacidad para mantener el contenido de agua en los tejidos de las hojas, sin mostrar afectación en la eficiencia del PSII ni en el crecimiento. Igualmente, los parámetros de intercambio de gases disminuyeron producto del DH. La tasa fotosintética disminuyó en promedio un 85%. La primera respuesta al DH fue el cierre estomático con el mantenimiento del agua de las hojas. No obstante, en los clones EET 8 e ICS 60 la disminución de la eficiencia cuántica de la PSII mostró una segunda fase de respuesta con la limitación del aparato fotosintético. Todos los clones se recuperaron después de rehidratación. Los resultados permiten sugerir diferencias en la tolerancia al DH entre los clones. El clon EET 8 mostró ser sensible al DH mientras que el TSH 565 mostró ser más Tolerante.

**Palabras clave:** Fotosíntesis, Potencial hídrico, fluorescencia de la clorofila, intercambio de gases, masa seca, crecimiento.

## 5.2 Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie vegetal de hábito de crecimiento leñoso perenne que se originó en la cuenca amazónica y se siembra en cultivos de regiones tropicales del mundo [97,290]. El cacao se ha convertido en un cultivo de gran importancia económica mundial en los últimos tiempos [91]. Su importancia radica en sus semillas, las cuales son la principal fuente de materia prima para la industria que produce chocolate y productos de confitería asociados, además, se le atribuye el contenido de compuestos bioactivos como antioxidantes de tipo fenólico con beneficios para la salud asociados a su consumo [66,292].

Su cultivo sustenta comunidades en América Central y del Sur, Asia y África y es el principal ingreso para alrededor de seis millones de pequeños agricultores que producen hasta un 90% del cacao del mundo [233,291]. Para el periodo 2017- 2018, se produjeron 4.6 millones de toneladas de cacao, siendo Camerún el mayor productor con 295.028 toneladas [375]. Colombia para el mismo año tuvo una producción de 56.808 Toneladas incrementándose a 63048 toneladas para el año 2020 y, se pretende incrementar la producción, el rendimiento y el área sembrada cada año [107]. Además, para el país el cacao es un cultivo alternativo a los cultivos ilícitos, que, además, beneficia a 35 mil familias productoras con un alto potencial para la exportación por ser reconocido a nivel mundial como fino de sabor y de aroma, características que posee solo un 5% del cacao producido mundialmente [107].

De acuerdo con [5], desde el año 2008 la demanda de cacao ha crecido aproximadamente un 3% interanual y aunque se pronostica que continuará aumentando, no se espera que la oferta continúe satisfaciendo la creciente demanda, puesto que en algunas regiones del mundo la producción de cacao es afectada por numerosas limitaciones para el suministro, que incluyen pérdidas significativas por plagas y enfermedades, granjas y árboles envejecidos, y, en algunas áreas, cambios en eventos climáticos que podrían generar periodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo ocasionando estrés por déficit hídrico en las plantas [111].

La lluvia es el factor ambiental más importante que influye en los rendimientos de cacao [30]. En [31] se reportó que una precipitación promedio de entre 1400 y 2000 mm año<sup>-1</sup> es suficiente para soportar el crecimiento de los árboles de esta especie, y menos de 1200 mm año<sup>-1</sup> ocasiona déficit hídrico en el suelo y un crecimiento y rendimiento reducidos. Al respecto, se reporta que la distribución anual de la lluvia es más relevante que la cantidad anual total, y, que es necesario considerar que los diferentes tipos de suelo tienen propiedades de retención de agua distintas que pueden influenciar la sensibilidad del cacao al déficit hídrico. Es por esto por lo que, períodos secos prolongados con lluvia inferior a 100 mm mes<sup>-1</sup> durante más de 3 meses pueden tener efectos negativos sustanciales sobre el crecimiento y el rendimiento de los árboles, puesto que se genera estrés por déficit hídrico, condición

bajo la cual se incrementa la tasa de transpiración en relación con la tasa de absorción de agua por las raíces conllevando a la alteración del funcionamiento metabólico de las plantas [137,294].

De forma general, las plantas sometidas a estrés por déficit hídrico presentan inhibición del crecimiento y desarrollo producto de la reducción en la fotosíntesis neta ocasionada por el cierre estomático y otros cambios a nivel metabólico, como el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)[88,163,376] , así como cambios en la cinética de absorción de nutrientes minerales [377].

Igualmente, se producen cambios en la expresión génica que desencadenan la activación e inactivación de genes y proteínas poniendo en marcha diferentes mecanismos de respuesta a nivel molecular, bioquímico y fisiológico responsables de las modificaciones estructurales y funcionales que, en el corto plazo conllevan a la aclimatación y en largo plazo a la adaptación de la planta a las condiciones estresantes [59,159,378–380]. De esta forma, se dan cambios en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante [137,164,301], así como, la alteración de la relación raíz /brote debido al incremento en la asignación de biomasa a las raíces lo que permite el aumento de la longitud de la raíz [59,75] para facilitar la exploración del suelo y aumentar la absorción de agua y nutrientes [379].

En cacao se ha reportado que el déficit hídrico del suelo, ya sea en estado vegetativo o reproductivo, genera reducción en la tasa de fotosíntesis, la eficiencia en el uso del agua, la partición y acumulación de fotoasimilados, la abscisión de órganos vegetativos y reproductivos, y el acortamiento del ciclo de vida [55]. Igualmente, se ha observado que la disminución en la tasa de fotosíntesis afecta la retención de cojines florales, de mazorcas jóvenes y maduras, así como el llenado de las almendras, impactando drásticamente el rendimiento del cultivo [65,91].

Al respecto, estudios realizados para evaluar la respuesta al déficit hídrico del suelo en plantas de cacao en diferentes estados fenológicos reportan que los valores críticos del contenido de agua en la planta varían en función de la edad y el tratamiento de déficit aplicado[134]. Así, por ejemplo, se encontró que el  $\Psi$  de plantas bajo condiciones de invernadero con reducción gradual del riego durante 60 días, alcanzó valores de -2.5Mpa [27] -3.5 MPa [23]. Mientras que, en otros casos donde el estrés se aplicó de forma continua en invernadero durante 35 días sin riego, el  $\Psi$  llegó a valores de -2.7 MPa [24] y, en plantas adultas en campo sin riego durante 25 días se registró -1.70 MPa de  $\Psi$  [24,26].

Igualmente en [23] se clasificaron los cultivares de cacao como tolerantes al estrés por déficit hídrico en base al mantenimiento del potencial hídrico alto, menor conductancia estomática y la evidencia de ajuste osmótico. En [62] se menciona que la capacidad de identificar los genotipos que combinan los rasgos para un adecuado crecimiento y alto rendimiento con un Uso eficiente de agua es un mecanismo esencial para el mejoramiento de cultivos en zonas más propensas a la

sequía. Igualmente se hace mención de que los rasgos que favorecen la tolerancia a la sequía de las plantas incluyen una mayor asignación de biomasa a la raíz que a las partes aéreas, una menor superficie evaporativa (área de la hoja) y tener hojas más gruesas.

Bajo este contexto, el propósito de esta investigación fue caracterizar el desempeño fisiológico de los clones de cacao EET 8, ICS 60 y TSH 565 en respuesta al déficit hídrico del suelo por sus respuestas fisiológicas asociadas con diferentes niveles de tolerancia a este tipo de estrés, de acuerdo con la caracterización descrita en la sección anterior. Se evaluaron parámetros fisiológicos de relaciones hídricas, intercambio de gases, actividad fotoquímica del PSII y de crecimiento en condiciones de invernadero.

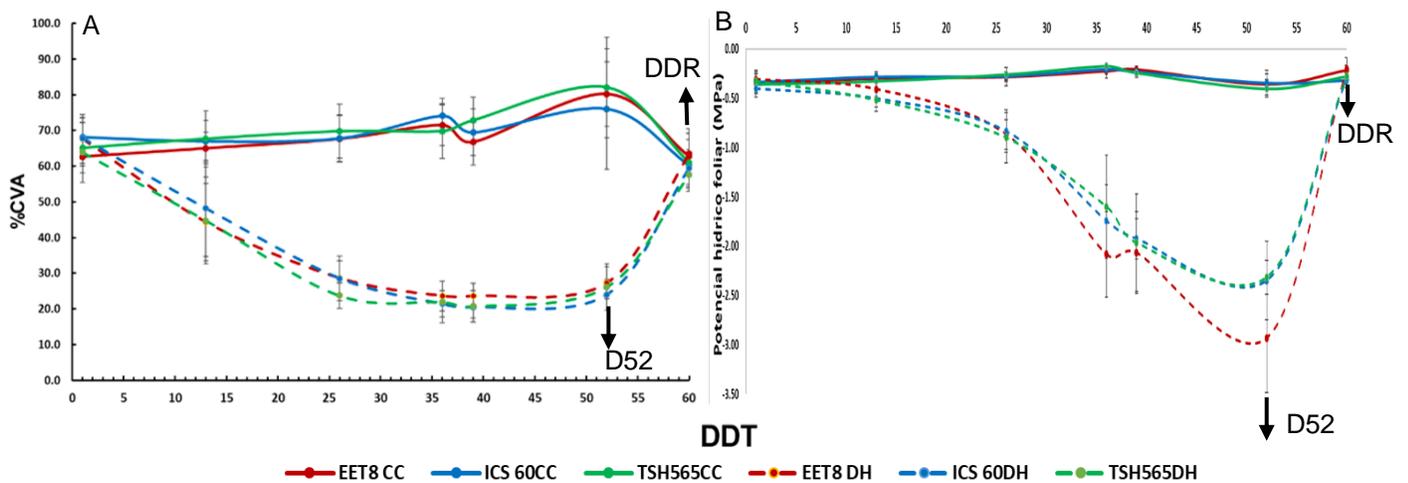
### **5.3 Materiales y Métodos**

#### **Material vegetal y Tratamiento de estrés**

Este estudio se llevó a cabo en invernadero de la Estación productiva Bambusa, propiedad de la empresa Geoambiente S.A.S localizado en Pacho (Cundinamarca - Colombia) en un bosque seco – premontano, a coordenadas geográficas 5°07'50" Norte y 74°09'30" Oeste, a 1.350 msnm, con una temperatura media anual de 24 °. Todos los clones fueron propagados en el invernadero por injerto con la utilización del mismo patrón (Caucasia) empleado por Geoambiente S.A.S para la producción en masa. Se evaluaron plantas bien desarrolladas de cinco meses de edad de los clones de *T. cacao* EET8, ICS60 y TSH565 que fueron seleccionados por pertenecer al grupo de los mejores materiales recomendados para la siembra y comercialización en el país por el Consejo Nacional Cacaotero [22], y, por su nivel de tolerancia al estrés por déficit hídrico con respecto a otros 4 clones cuya respuesta se caracterizó en un estudio previo cuyos resultados se presentan en el apartado anterior (Capítulo 4).

Para el establecimiento del experimento en el invernadero, las plantas fueron sembradas en bolsas de plástico negro que contenían 5 Kg de suelo franco limoso (pH 6.5). Considerando el resultado del análisis de suelo (anexo1), cada planta fue fertilizada con 5ml de Agroplus® y 5 gr de fertilizante triple 15 (N:P:K) por litro de agua. Este esquema de fertilización fue aplicado dos veces después del injerto para garantizar los requerimientos nutricionales de las plantas para un crecimiento y desarrollo óptimo. Desde el establecimiento hasta la aplicación de los tratamientos de estados hídricos todas las plantas fueron regadas a capacidad de campo. Durante el período de evaluación se registraron diariamente las temperaturas máximas y mínimas, al igual que la humedad relativa con estación climática HOBO 8 (HBOware®) instalada a 0.30 m del suelo cada dos horas (Figura 5-3). A partir de los datos registrados se calculó el promedio diario del déficit de presión de vapor (DPV) de acuerdo con el método propuesto por [313].

Los tratamientos se distribuyeron en un arreglo de parcelas divididas bajo el diseño básico de bloques completos al azar con 3 repeticiones. En la parcela principal se evaluó el estado hídrico con dos niveles: - Capacidad de campo (CC) y - Déficit hídrico (DH) y, en la subparcela se evaluaron los 3 clones empleando 12 plantas por Unidad experimental para un total de 216 plantas. Para el tratamiento de CC se aplicó volumen de agua al suelo para mantener el CVA a 70% durante el periodo de evaluación. Consecuentemente el CVA fue registrado manualmente a 20 cm de profundidad en el suelo de cada planta con un TDR – 150 (Spectrum technologies ® ). Igualmente, bajo CC el potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) antes del amanecer permaneció entre -0.2 y -0.4 MPa de acuerdo a lo reportado para plantas de cacao bien irrigadas (Figura 5-1B) [24]. Para el tratamiento de DH se suspendió el riego durante 52 días consecutivos hasta alcanzar un  $\Psi$  de entre -3.0 y -3.5 MPa [23,24] (Figura 5-1B), momento en el que el CVA disminuyó hasta llegar en promedio 25% (Figura 5-1A) y las plantas mostraron un alto nivel de marchitamiento (Figura 5-2A). De acuerdo con el  $\Psi$  y el CVA, este día 52 después del tratamiento (D52) fue establecido como el punto de máximo estrés. Al final del D52, todas las plantas fueron regadas a capacidad de campo para la recuperación, alcanzando 70% de CVA al día siguiente. Las mediciones de la recuperación se realizaron a los siete días después de la rehidratación (DDR).



**Figura 5- 1 Variación en A) el contenido volumétrico de agua del suelo y B) el potencial hídrico foliar antes del amanecer de 3 clones de cacao en los diferentes estados hídricos. CC, bien regado (líneas sólidas) y DH, condiciones de déficit hídrico (líneas discontinuas). Los valores son la media  $\pm$  SD (n = 6). Las flechas indican el día de máximo estrés (D52) y el día en que se realizaron las mediciones después de rehidratación (DDR)**

### Potencial Hídrico de la hoja

$\Psi$  fue registrado desde las 5:00 hasta las 6:30 am en la tercera o cuarta hoja completamente expandida de seis plantas por tratamiento (n=6) y en cada clon

(Figura 5-1B). El  $\Psi$  fue medido con una cámara de presión Scholander (PMS Model 615, Fresno, CA, USA).



**Figura 5- 2 Plantas de los 3 clones de cacao en los diferentes estados hídricos el día de máximo estrés (D52). A).** Plantas sometidas a tratamiento de Déficit Hídrico **B).** Plantas control (riego a capacidad de campo)

### Contenido relativo de agua (CRA) en la hoja

El CRA se determinó siguiendo el protocolo descrito por [24] y según la ecuación propuesta por [315]:

$$\%CRA = \left[ \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso turgente} - \text{Peso seco}} \right] \times 100$$

donde el peso fresco de la hoja, el peso turgente y el peso seco se determinaron en trozos de hoja de 25 cm<sup>2</sup> de 18 plantas por cada tratamiento. El peso turgente se determinó después de hidratar los trozos con agua destilada durante 24 horas, y posteriormente, el peso seco se registró después de secar los trozos en un horno a 70 °C hasta obtener un peso constante.

### Intercambio de gases y Eficiencia en el uso del agua intrínseca

Los parámetros fotosíntesis neta (A), conductancia estomática ( $g_s$ ), y CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i$ ) se registraron entre las 9:30 – 12:30 m, en la 3 o 4 hoja completamente expandida, en 9 plantas por tratamiento (n=9) y por clon usando un sistema de medición de fotosíntesis portátil LI-6400XT (LI-COR® Biosciences Inc. NE, USA) con una concentración de CO<sub>2</sub> de 400  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  [24] y una densidad de flujo fotónico (DFF) de 500  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de acuerdo a datos de curvas de saturación fotosintética previamente realizadas (anexo 10.3). La eficiencia de uso del agua intrínseca (EUA<sub>i</sub>) fue calculada con los datos de A y  $g_s$  (A/ $g_s$ ).

## **Parámetros de la Fluorescencia de la clorofila**

La  $F_v/F_m$ , el rendimiento cuántico efectivo del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), la  $F_o$  y la ETR fueron registrados en las mismas hojas donde se registró la fotosíntesis pre acondicionadas a oscuridad por 45 minutos, entre las 4:00 – 7:00 pm usando un fluorómetro modulado portátil MINI-PAM (Walz®, Efeltrich, Germany). Para esto las moléculas de clorofila fueron excitadas por 0.8 segundos con luz actínica de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## **Parámetros de crecimiento**

A los siete días después de reanudar el riego (DDR) en las plantas sometidas a déficit hídrico y con el propósito de evaluar el efecto del tratamiento más la recuperación, se registraron los parámetros de crecimiento área foliar (AF) con el medidor (LI-3000C; LICOR, USA), al igual que la masa seca por órganos y total después de desecación a  $70^\circ\text{C}$  en Incubadora (Termolyne®, USA) hasta obtener peso seco constante, midiéndolo con balanza analítica (Adventurer Ohaus®, USA). Igualmente se determinó la relación entre la masa seca de la raíz y la masa seca de la parte aérea (masa seca de tallo y hojas) en las 9 plantas por tratamiento y clon en las cuales se registraron los parámetros de intercambios de gases durante todo el experimento.

## **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los clones y los tratamientos en las variables analizadas. Posteriormente, se realizó un análisis de comparación de medias para acceder a las diferencias significativas a través de la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el software Statistix 9® (Analytical software, USA).

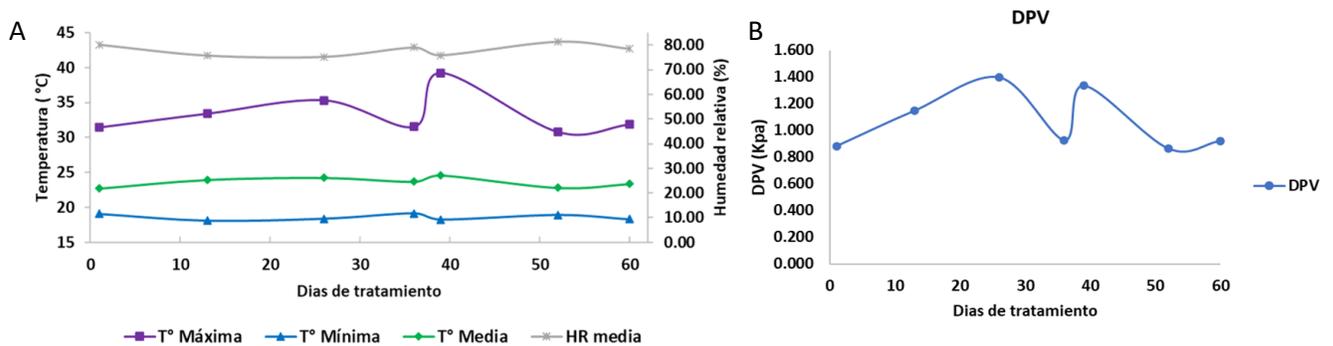
## **5.4 Resultados**

### **Condiciones micro climáticas durante las mediciones**

El promedio de la temperatura mínima del aire en el invernadero durante el periodo de evaluación fue de  $18^\circ\text{C}$ , mientras que el de la temperatura máxima fue de  $33^\circ\text{C}$  con un valor medio de  $23^\circ\text{C}$ . Por otra parte, la humedad relativa promedio varió entre 75 y 81% (Figura 5-3A). El DPV osciló entre 0.86 y 1.39 kPa con un valor medio de 1.06 kPa (Figura 5-3B).

### **Relaciones hídricas**

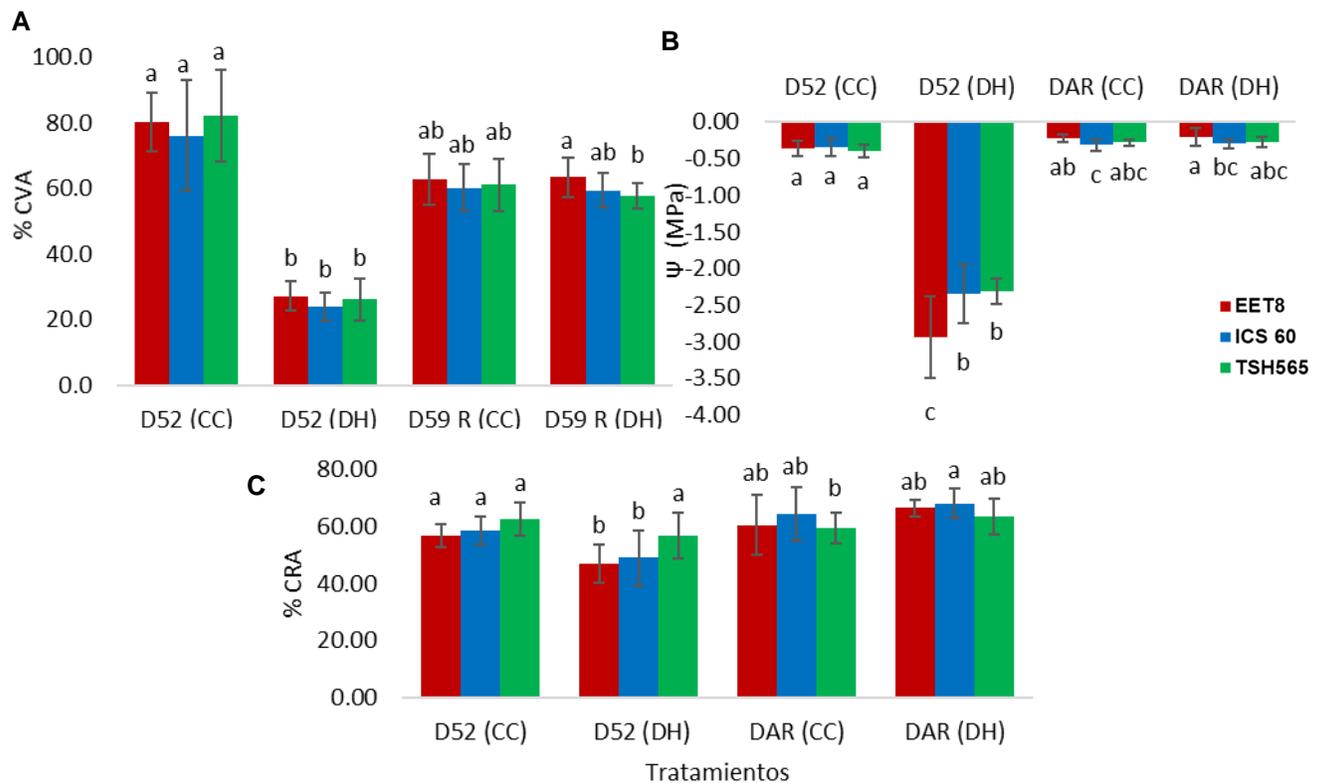
El  $\Psi$  disminuyó conforme el contenido volumétrico de agua del suelo lo hizo (Figura 5-1) alcanzando un valor promedio de -2.5 MPa a los 52 días de suspensión de riego mientras el CVA del suelo alcanzó una media de 25%. De acuerdo con el análisis de varianza entre las plantas control y las sometidas a déficit hídrico no hubo diferencias significativas entre clones sino entre tratamientos para el CVA del suelo en el día de máximo estrés (D52), entre tanto, en el día 59 después de regar no hubo diferencias ni entre clones ni tratamientos puesto que al reanudar el riego a capacidad de campo el suelo de las plantas sometidas a déficit hídrico recuperó la humedad retenida por el suelo similar al de las plantas control (Figura 5-4 A).



**Figura 5- 3 Variación en las variables climáticas durante el tiempo de experimentación.** Variación de las condiciones de **A)** Promedio diario de temperatura y humedad relativa; y **B)** Déficit de presión de vapor (VPD) en el invernadero durante el período de déficit hídrico y la recuperación

El  $\Psi$  de las plantas sometidas a déficit hídrico se redujo significativamente con respecto a las plantas control (Figura 5-1B). En los clones del tratamiento CC el  $\Psi$  permaneció entre -0.3 y -0.4 MPa, mientras que en los clones bajo el tratamiento de déficit la reducción alcanzó un valor promedio de -2.5 MPa el día 52. La reducción del  $\Psi$  del clon EET8 (-2.93 MPa) fue significativamente mayor que los clones ICS60 y TSH565 (-2.3 MPa) entre los que no se encontraron diferencias significativas en el día de máximo estrés. En el día 59 luego de recuperación, no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni entre clones para este parámetro ya que todos los clones sometidos a déficit hídrico alcanzaron los valores de las plantas control luego de reanudar el riego (Figura 5-4B) a pesar de haber transcurrido casi dos meses sin recibir agua, lo que demostró que los clones fueron capaces de sobrevivir al nivel de estrés aplicado.

El contenido relativo de agua en la hoja fue significativamente diferente entre tratamientos para los clones EET8 e ICS60, mientras que el clon TSH565 mantuvo sus valores de CRA similares a los de las plantas CC, por lo que en este clon no se evidenció diferencias entre los tratamientos CC y DH (Figura 5-4C). En las plantas control el CRA promedio fue de 60% mientras que en DH el valor más bajo alcanzó 46%(EET8) y el más alto 56% (TSH565). Cabe señalar que los clones TSH565 y el EET8 mostraron la respuesta más distante (Figura 5-4C). Una vez reanudado el riego, las plantas de déficit alcanzaron los valores de las plantas control sin diferencias entre clones ni tratamientos.



**Figura 5- 4 Cambios en el contenido volumétrico de agua del suelo. (A)**, el potencial hídrico foliar **(B)** y el Contenido relativo de agua en la hoja **(C)** de tres clones de cacao en diferentes estados hídricos. CC: bien regado, DH: estrés por déficit hídrico, D52: estrés máximo de 52 días, D59R: recuperación 7 días después de rehidratación. Los valores son la media (n=6). Se denotan las diferencias significativas P (<0.05) con letras diferentes producto del ANOVA de dos vías (clon x tratamiento).

### Intercambio de gases

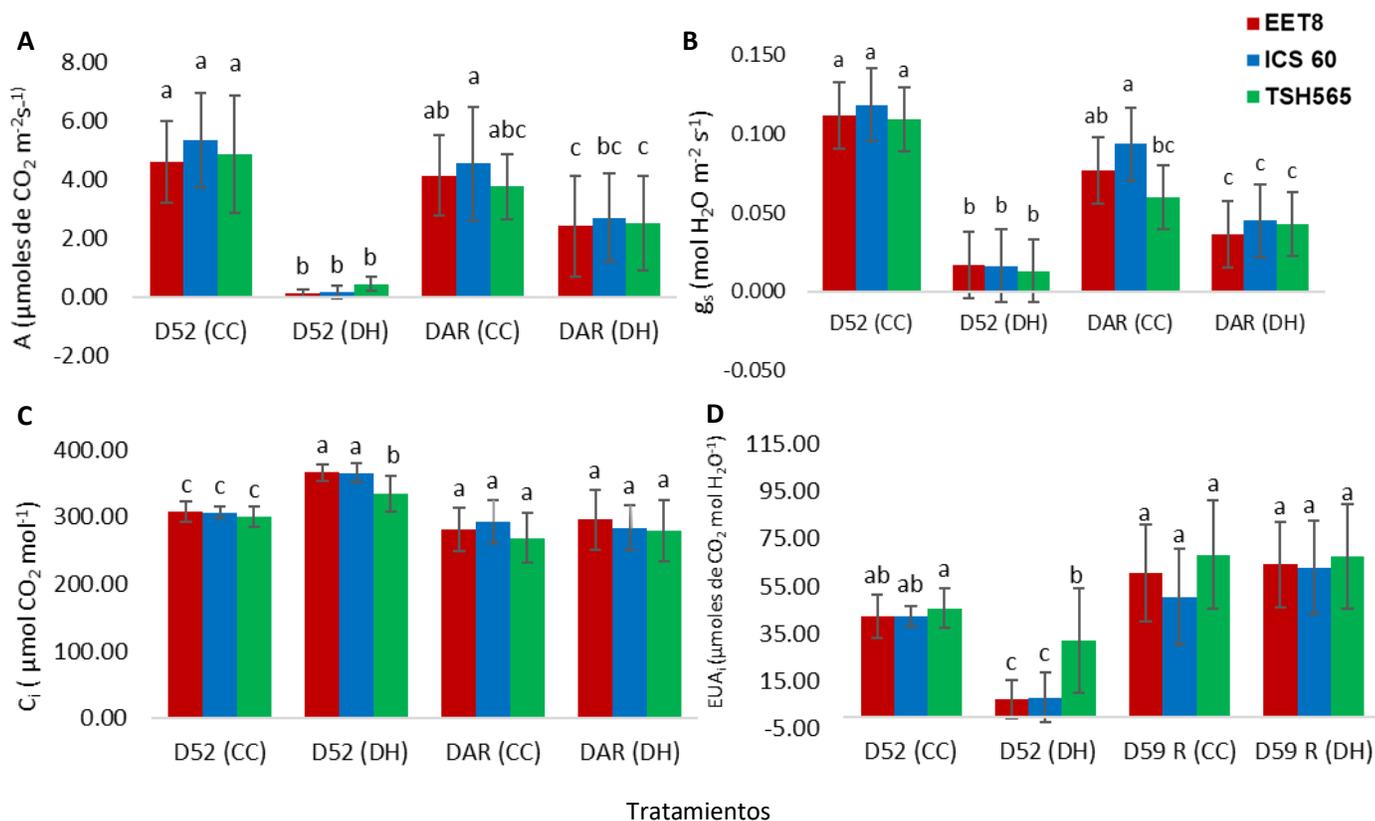
El tratamiento de déficit hídrico ocasionó una reducción significativa en A y  $g_s$  en los 3 clones con respecto a las plantas control excepto en el  $CO_2$  intercelular en el cual se evidenció un incremento (Figura 5-5). La fotosíntesis neta casi se inhibió completamente por el tratamiento DH, reduciéndose en un 97% en los clones EET8

e ICS60, y, 91% en TSH565 con un valor medio de  $0.25 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con respecto a las plantas bien irrigadas en las que los valores de A oscilaron entre 4.6 y  $5.3 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El análisis de varianza y la comparación de medias detectó diferencias significativas entre tratamientos y respuestas similares entre clones. Es importante señalar que en la recuperación los clones EET8 e ICS60 alcanzaron más del 50% de los valores de las plantas control, mientras que el clon TSH565 alcanzó la recuperación completa 7 DDR (Figura 5-5 A).

Por su parte, la conductancia estomática se redujo en promedio un 86 % debido al tratamiento de déficit hídrico, sin que se detectaran diferencias altamente significativas entre la respuesta de los diferentes clones el día de máximo estrés. En el tratamiento CC los valores oscilaron entre 0.109 y  $0.111 \text{ mol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mientras que bajo DH los valores estuvieron entre 0.013 y  $0.017 \text{ mol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En la recuperación se observó una tendencia similar a la recuperación de A en donde los clones EET8 e ICS60 alcanzaron 50% de los valores de las plantas control, mientras que el clon TSH565 alcanzó la recuperación completa en el corto tiempo de evaluación (Figura 5-5B).

Como se mencionó antes, el  $\text{CO}_2$  intercelular se incrementó significativamente bajo el tratamiento de déficit comparado con el CC en el que los valores oscilaron entre 300 y  $307 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . La comparación de medias arrojó diferencias significativas entre los clones EET8 e ICS60 los cuales incrementaron el  $C_i$  en 19% ( $366$  y  $365 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  respectivamente) y el clon TSH565 en el que el aumento fue menor (11%;  $334 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ). En recuperación no se detectaron diferencias significativas entre los clones de DH y estos alcanzaron los valores de las plantas control (Figura 5-5C).

Igualmente, el uso eficiente del agua intrínseca ( $\text{EUA}_i$ ) (Figura 5-5D), presentó una reducción significativa en el tratamiento de déficit hídrico con respecto a las plantas control en las que los valores oscilaron entre 42 y  $45 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$  mientras que bajo DH los valores estuvieron entre 7.5 y  $32.3 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ . Así pues, bajo DH se presentó una reducción del 81% en los clones EET8 e ICS60, mientras que en el clon TSH565 fue de 29%. La mayor reducción la presentó el clon EET8 ( $7.50 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) y la menor el clon TSH565 ( $32.3 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ), por lo que se encontraron diferencias significativas entre los dos primeros clones y el último y la respuesta más distante entre EET8 y TSH565. En la recuperación el análisis de varianza no encontró diferencias entre clones ni tratamientos, mostrando las plantas de déficit valores similares a los de su respectivo control (Figura. 5-5D).



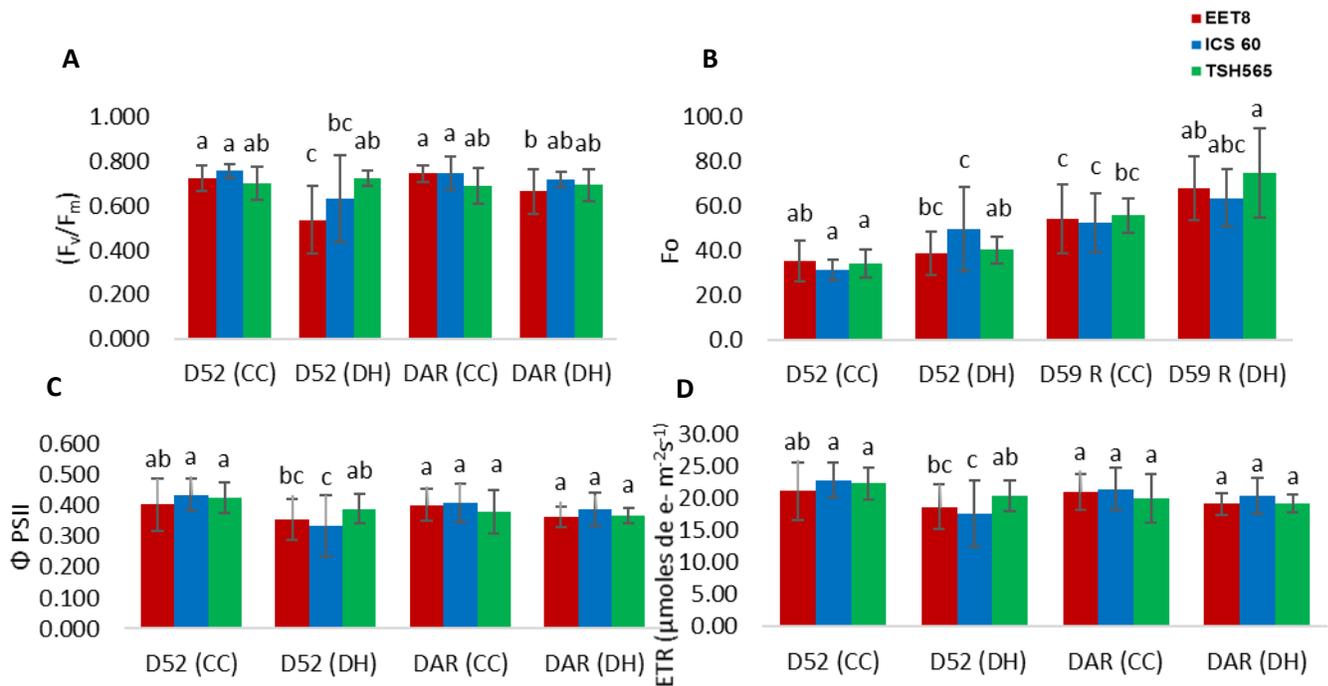
**Figura 5- 5 Cambio en los parámetros de intercambio de gases de tres clones de cacao sometidos a estrés por déficit hídrico y rehidratación. A).** Fotosíntesis neta (A). **B).** Conductancia estomática ( $g_s$ ). **C).**  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ). **D)** Eficiencia de uso de agua intrínseca ( $\text{EUA}_i$ ). Los valores son medias  $\pm$  DS (n=9). Se denotan las diferencias significativas con letras diferentes producto del ANOVA de dos vías (clon x tratamiento). CC: clones regados a capacidad de campo, DH: Clones sometidos a Déficit hídrico. D52= Día de máximo estrés, D59 R= Día 7 después de recuperación.

### Parámetros relacionados con la Actividad fotoquímica del PSII

Los 52 días de déficit hídrico ocasionaron una reducción significativa de la  $F_v/F_m$ , en los clones ICS60 y EET8, mientras que la  $F_v/F_m$  del clon TSH565 permaneció igual a los valores de las plantas control. Bajo en tratamiento control la  $F_v/F_m$  osciló entre 0.7 y 0.75 mientras que bajo DH varió entre 0.53 y 0.722. El clon EET8 mostró la mayor reducción (26%) en relación con los valores de las plantas control alcanzando un valor promedio de 0.53, mientras que el clon ICS60 alcanzó un valor promedio de 0.63 (16%) y el clon TSH565 mantuvo su valor igual al de las plantas bien regadas (0.722), evidenciándose diferencias significativas entre este último clon y el EET8 (Figura 5-6A). En la recuperación los clones ICS60 y TSH565 alcanzaron los valores de las plantas control, mientras que en clon EET8 se observó una

diferencia significativa con respecto a su control mostrando que a pesar de que este clon tuvo un ligera recuperación, el proceso para la recuperación completa fue más lento.

Por otra parte, la fluorescencia basal tuvo un ligero incremento con respecto a las plantas control, siendo significativamente mayor solo en el clon ICS60 (58%) con respecto a su clon y diferente del clon TSH565 bajo DH. Bajo CC los valores de  $F_o$  oscilaron entre 31.5 y 35.5 mientras que bajo DH se mantuvieron entre 38 y 49. Los menores valores bajo DH fueron los de los clones EET8 y TSH565 (38.8 y 40 respectivamente) mientras que ICS60 presentó el mayor valor (49). En recuperación se presentó un comportamiento similar entre clones, con valores aun ligeramente más altos a los de las plantas control (Figura 5-6B).



**Figura 5- 6 Cambio en los parámetros de la actividad fotoquímica de tres clones de cacao sometidos a estrés por déficit hídrico y rehidratación. A).** Eficiencia fotoquímica máxima de PSII **B).** Fluorescencia basal **C)** Rendimiento cuántico fotoquímico del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) **D)** Tasa de transferencia de electrones (TTE). Los valores son medias  $\pm$  DS (n=9). Se denotan las diferencias significativas con letras diferentes producto del ANOVA de dos vías (clon x tratamiento). CC: clones regados a capacidad de campo, DH: Clones sometidos a Déficit hídrico. D52= Día de máximo estrés, D59R= Día 7 de recuperación.

Con respecto a  $\Phi_{PSII}$  el tratamiento de déficit ocasionó una reducción significativa en el clon ICS60 mientras que los clones EET8 y TSH565 mostraron valores similares al tratamiento control sin diferencias entre tratamientos ni clones. Bajo CC los valores oscilaron entre 0.40 y 0.43, mientras que en DH variaron de 0.33 a 0.38.

Una tendencia similar se observó para la ETR en la que los clones EET8 y TSH565 presentaron la misma respuesta con valores similares a los de las plantas control, mientras que el ICS60 presentó una reducción significativa del 23 % (Figura 5-6 C y D). En el tratamiento control los valores observados estuvieron entre 21.1 y 22.8 mientras que en DH se presentaron valores entre 17.5 y 20.4. En la recuperación todas las plantas sometidas a déficit hídrico alcanzaron los valores de las plantas control para estos dos parámetros sin diferencias entre clones ni tratamientos (Figura 5-6 C y D).

### **Parámetros de crecimiento**

El déficit hídrico del suelo tuvo influencia en los parámetros de crecimientos evaluados. Bajo el tratamiento de DH el área foliar mostró diferencias significativas entre tratamientos sin diferencias entre clones. En el tratamiento CC el área foliar osciló entre 1309 (TSH565) y 1737 cm<sup>2</sup> (ICS60) mientras que bajo DH estos valores se ubicaron en un rango entre 436 (EET8) y 698 cm<sup>2</sup> (TSH565). Cabe señalar, que la reducción del área foliar en los clones EET8 e ICS60 fue de 72% mientras que en el TSH 565 fue de 47% respecto a los valores de las plantas control (Figura 5-7A), inclusive llama la atención que, pese a que el clon TSH565 bajo el tratamiento control presentó la menor área foliar con relación a los otros dos clones, bajo el tratamiento de déficit mostró la menor reducción en este parámetro.

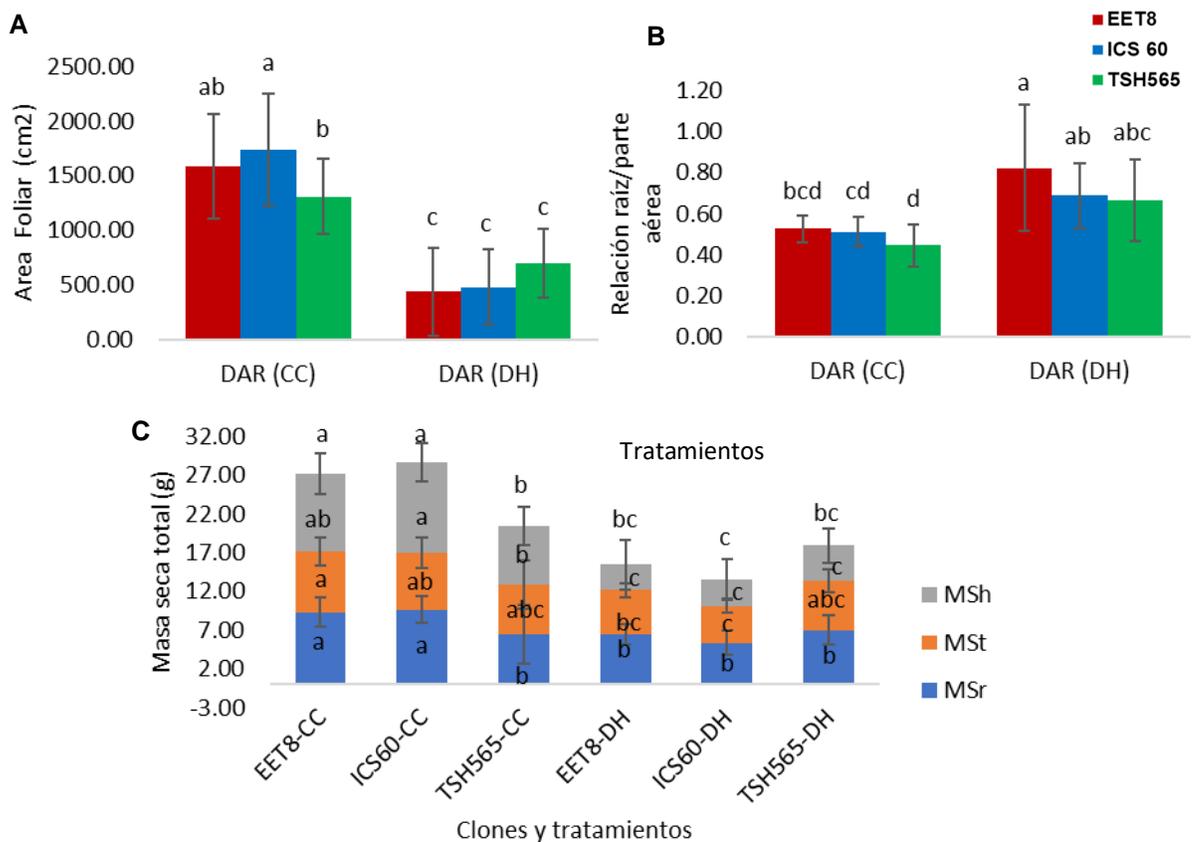
Por otra parte, la relación entre la raíz y la parte aérea de la planta mostró un incremento significativo en DH con respecto a las plantas control sin diferencias entre clones. El incremento bajo DH del clon EET8 fue de 36% mientras en los clones ICS60 y TSH565 el incremento fue de 25.5% y 33% respectivamente (Figura 5-7B).

La producción de biomasa total se redujo de forma significativa como consecuencia del déficit hídrico en los clones EET8 e ICS60 mientras que en el clon TSH565 los valores fueron similares a los de las plantas control. Los valores de masa seca total oscilaron entre 28.5 (ICS60) y 20.4 gramos (TSH565) en las plantas que estuvieron bien irrigadas durante el experimento mientras que en las plantas provenientes del tratamiento de déficit hídrico los valores variaron de 13.5 (ICS60) a 17.9 gramos (TSH565). De esta forma, la reducción se presentó en un 43% y 53% para los clones EET8 e ICS60 respectivamente y en un 12 % para el TSH565; pese a que no se evidenciaron diferencias significativas entre clones para las plantas que provenían del tratamiento de déficit, es importante señalar que el clon TSH565 fue el único que no presentó diferencias significativas con respecto a su respectivo control.

Particularmente, se evidenció una disminución del peso seco de todos los órganos de los clones EET8 e ICS60, mientras que en el TSH565 la reducción se evidenció solo en el peso seco de las hojas. Así pues, la masa seca de la raíz se redujo en un

30% y 44% en los clones EET8 e ICS60 respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre estos clones, mientras que en el clon TSH565 se presentó un incremento de 7.5 % con una diferencia significativa entre este último clon y los dos primeros (Figura 5-8). En el tratamiento CC se observaron valores entre 6.5 (TSH565) y 9.60 gramos (ICS60), mientras que en DH los valores variaron de 5.34 (ICS60) a 6.9 (TSH 565) gramos (Figura 5-7C).

Igualmente, la masa seca del tallo se redujo en un 28% y 35% en los clones EET8 (5.65g) e ICS60 (4.77 g) respectivamente debido al tratamiento DH, y se mantuvo igual a los valores de las plantas control en el clon TSH565 (6.36 g), por lo que se presentaron diferencias significativas con respecto al control solo para los clones EET8 e ICS60 cuyos valores bajo este tratamiento fueron de 7.82 y 7.32 gramos respectivamente. Finalmente, en el caso de la masa seca foliar en los clones EET8 e ICS60 se presentó una reducción significativa promedio en las plantas provenientes de DH de 69% mientras que en el TSH565 la reducción fue de 39.5% con respecto a las plantas control en las que los valores oscilaron entre 7.5 (TSH565) y 11.64 gramos (ICS60). Bajo DH la masa seca foliar se redujo a valores entre 3.28 (EET8) y 4.57 gramos (TSH565).



**Figura 5- 7 Parámetros de crecimiento de tres clones de cacao sometidos a déficit hídrico y rehidratación. A). Área foliar B). Relación raíz/parte aérea. C). Masa seca total. Los**

valores son medias  $\pm$  DS (n=9). Se denotan las diferencias significativas con letras diferentes producto del ANOVA de dos vías (clon x tratamiento). CC: clones regados a capacidad de campo, DH: Clones sometidos a Déficit hídrico. D59R= Día 7 de recuperación.

Es de resaltar que en los parámetros de masa seca el clon TSH565 presentó los menores valores en comparación con los otros clones en el tratamiento control, mientras que 7 días después de rehidratación este clon mostró los valores más altos, lo que sugiere una menor afectación en el crecimiento de este clon por el tratamiento de DH (Figura 5-7C).



**Figura 5- 8 Sistema Radicular de tres clones de cacao sometidos a déficit hídrico y rehidratación.** CC: clones regados a capacidad de campo, DH: Clones sometidos a Déficit hídrico.

## 5.5 Discusión

El propósito de este estudio fue comparar y caracterizar la respuesta a nivel fisiológico y morfológico de tres clones de cacao en etapa temprana de crecimiento que fueron seleccionados de un estudio preliminar en el que las plantas se encontraban en el estadio fenológico BBCH22 de acuerdo con [288], observándose diferentes niveles de tolerancia al estrés por déficit hídrico entre los siete clones evaluados (Capítulo 4). En esta segunda caracterización los resultados confirmaron los diferentes niveles de tolerancia al DH entre los tres clones evaluados, pese a que éstos se encontraban en estadio fenológico BBCH19 [288] al momento de la aplicación del estrés y, al igual que en el estudio anterior, todos los clones lograron recuperarse del periodo de suspensión de riego de 52 días.

El potencial hídrico foliar es un parámetro de gran importancia que se empleó para monitorear el estado hídrico de las plantas durante el transcurso del periodo de evaluación. Este parámetro se ha relacionado con la tolerancia de las plantas al déficit hídrico puesto que refleja la capacidad de estas de absorber el agua disponible en el suelo bajo condiciones de limitación hídrica y de esta forma evitar la deshidratación por la pérdida de agua [88,331]. El tratamiento de déficit aplicado

en este estudio durante 52 días provocó la reducción del  $\Psi$  a valores por debajo de los -2.5MPa con la consecuente reducción del CRA. Al respecto de esta reducción el clon EET8 alcanzó el valor más bajo de CRA (46%) con un  $\Psi$  más alto (-2.93 MPa) que el que ha sido reportado y asociado a valores similares de CRA en otras plantas de cacao, lo que sugiere que este clon fue el más afectado en su estado hídrico por el tratamiento de DH [23]. Por otra parte, aunque los clones EET8 e ICS60 presentaron el valor más alto de  $\Psi$  (-2.3MPa) sólo el clon TSH565 mostró un mayor CRA (56%) sin diferencias estadísticas con respecto a las plantas control, como posible indicativo de que este clon es más eficiente en el uso del agua con el consecuente mantenimiento del contenido hídrico en el tejido foliar bajo DH severo. La repercusión de la disponibilidad hídrica del suelo (CVA) en la reducción del  $\Psi$  de *T.cacao* se ha reportado [21]. El valor más bajo de  $\Psi$  encontrado en las plantas con baja disponibilidad hídrica es -3.5 MPa, el cual se ha asociado a la reducción gradual del contenido relativo de agua en la hoja hasta un 55% [23], mientras que, a valores más altos de  $\Psi$  el CRA observado ha sido consecuentemente más alto. Ante esta evidencia, los autores han propuesto que las plantas de cacao realizan ajuste osmótico como una respuesta temprana al déficit hídrico que le permite reducir la pérdida de agua y mantener la turgencia celular, sin embargo, a medida que se intensifica el DH sería necesaria la activación de nuevas estrategias para contender con el estrés [23,26], por lo que es relevante la determinación de solutos compatibles y análisis bioquímicos para corroborar la respuesta de la osmorregulación.

Adicionalmente, se han catalogado como tolerantes al DH, genotipos de cacao con la capacidad de mantener potenciales hídricos más altos durante los períodos de limitación hídrica en el suelo [114,343]. Por lo que es posible sugerir que el clon TSH565 posee esta capacidad de tolerancia.

En la evaluación del estado hídrico de la planta, el DPV de la atmosfera tiene un rol relevante que debe ser considerado pues podría llegar a ser más influyente que el agua del suelo [88], por lo que en el transcurso del experimento las variables micro climáticas se monitorearon con el propósito de evaluar su influencia en los resultados observados. Como era de esperarse el DPV varió de acuerdo con los cambios en la temperatura, no obstante, mantuvo un valor medio de 1.06 kPa ,lo que indica que la demanda evaporativa no tuvo influencia en la reducción del contenido hídrico de las plantas, ni en la respuesta de la  $A$  y  $g_s$ , parámetros en cuya respuesta este factor también podría repercutir [5,21,334]. Se ha reportado que en cacao la  $A$  es menos sensible a los cambios en el DPV, disminuyendo a valores superiores de 1.8kPa de DPV [21,91,233].

Los cambios en el  $\Psi$  bajo condiciones de déficit hídrico también se han relacionado con la sensibilidad estomática pues de ella depende la regulación de la pérdida de agua por transpiración mediante la reducción de  $g_s$  [76] como parte del mecanismo de evitación que busca minimizar la presencia del DH y sus efectos nocivos [88]. En este estudio la  $g_s$  se redujo en promedio un 86% en todos los clones como

consecuencia del DH, sugiriendo la regulación de la pérdida de agua por transpiración mediante el cierre estomático con la consecuente reducción de A debido a la disminución de la asimilación de CO<sub>2</sub>. Pese a que no se observaron diferencias significativas entre clones es importante resaltar que el clon TSH565, aunque presentó la mayor reducción en g<sub>s</sub> (0.013 mol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) bajo DH, su recuperación después de rehidratación fue del 70% sin presentar diferencias con el tratamiento CC. Además, la A en este clon presentó la menor reducción (0.44 μmoles de CO<sub>2</sub> mol H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>) con el mismo comportamiento que la g<sub>s</sub> en recuperación. Producto de estas respuestas, en este clon se evidenció una mayor eficiencia en el uso del agua (32.3 μmoles de CO<sub>2</sub> mol H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>) puesto que con una menor pérdida de agua por transpiración (baja g<sub>s</sub>) mostró una mayor asimilación de CO<sub>2</sub> bajo DH. Este parámetro (EUA<sub>i</sub>) ha sido utilizado para inferir la optimización en el uso del agua por parte de la planta bajo la condición limitante del déficit hídrico por lo que se asocia con el rendimiento y la productividad de los cultivos y se ha propuesto como indicador de Tolerancia a la sequía [88,138,332]. De esta forma, la habilidad de los cultivos para conservar el estatus de agua en sus tejidos mediante el mantenimiento de los valores de Ψ y la turgencia celular en condiciones de déficit hídrico, se ha reportado como un mecanismo de adaptación a esta condición [11]; habilidad que se vio reflejada en el clon TSH565 con la menor reducción de Ψ producto de una baja g<sub>s</sub> y un mayor valor de CRA como se mencionó anteriormente.

Por el contrario, el clon EET8 a pesar de mostrar una g<sub>s</sub> más alta bajo DH, presentó la mayor reducción en la tasa fotosintética con la consecuente disminución en la EUA<sub>i</sub> debido a una baja asimilación de CO<sub>2</sub> con una mayor pérdida de agua por transpiración (Figura 5-5).

Así mismo, la EUA<sub>i</sub> se relaciona con la concentración de CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis en la cavidad subestomática de la hoja (C<sub>i</sub>) para ser utilizado por las células del mesófilo [69,381]. En este estudio se presentó un incremento en el C<sub>i</sub> en todos los clones evaluados dejando en evidencia la acumulación de CO<sub>2</sub> en el espacio intercelular del mesófilo foliar (Figura 5-5C), no obstante, el clon TSH565 mostró los valores más bajos en este parámetro (334 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>) indicando una alta tasa de consumo de CO<sub>2</sub> pese a una baja g<sub>s</sub> pero con una alta capacidad fotosintética reflejada en la mayor A y en el mantenimiento de la eficiencia máxima del PSII. Contrariamente, el clon EET8 presentó una alta acumulación de CO<sub>2</sub> en el mesófilo foliar como consecuencia de la importante reducción en la eficiencia máxima del PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>; 0.537) (Figura 5-6A), debido a la limitación hídrica y a la fotorrespiración que puede incrementarse en las plantas C3 bajo esta condición [57,122].

En cacao, las evaluaciones realizadas a plantas jóvenes y adultas en ambientes naturales de sequía o inducidas en invernadero han demostrado que la capacidad de regulación del cierre estomático le permite a la planta conservar valores altos de contenido relativo de agua pese a la reducción en la asimilación de CO<sub>2</sub> y por consiguiente de A [26,52,63]. Igualmente se ha reportado bajo DH una reducción

significativa de  $g_s$  con valores de  $A$  cercanos a cero los cuales se han asociado a una alta tasa de fotorrespiración de *T.cacao* atribuida a altos puntos de compensación de  $CO_2$  de esta especie [57,232,382]. Además, la reducción de la  $EUA_i$  se ha reportado bajo condiciones de estrés severo, y se ha relacionado con cambios en el metabolismo fotosintético o la aparición de estrés oxidativo [5] atribuyéndosele una variación genotípica que influye en la respuesta al déficit hídrico [5,36,63].

Se ha reportado que los parámetros derivados de la Fluorescencia de la clorofila, eficiencia cuántica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ), fluorescencia basal ( $F_o$ ), rendimiento cuántico fotoquímico del PSII ( $\Phi PSII$ ) y la tasa de transferencia de electrones (ETR) entre otros, son indicadores de sensibilidad del efecto que tiene el déficit hídrico sobre el aparato fotosintético independientemente del comportamiento estomático [76,164,380]. De acuerdo con los resultados observados aquí, el tratamiento de DH afectó el aparato fotosintético de los clones EET8 e ICS60 evidenciable con la reducción de la  $F_v/F_m$ . Pese a que no se observaron diferencias significativas entre estos dos clones bajo DH, EET8 presentó la mayor reducción (0.53) con una recuperación más lenta por lo que se evidenciaron diferencias significativas entre CC y DH para este clon, mientras que en el ICS60 la recuperación fue más rápida alcanzando los valores de las plantas control. Sin embargo, llama la atención que a pesar de la reducción de la  $F_v/F_m$ , el  $\Phi PSII$  y la ETR no presentaron una reducción significativa respecto al CC en el clon EET8, lo que sí ocurrió en el clon ICS60. Como se mencionó anteriormente, el clon TSH565 no presentó afectación en el fotosistema II pues ninguno de los parámetros evaluados mostró una reducción significativa con respecto a las plantas control (Figura 5-6).

Según [383] los valores de la  $F_v/F_m$  en plantas bien irrigadas oscilan entre 0.71 y 0.83, mientras que el incremento en la fluorescencia basal con valores de  $F_v/F_m$  por debajo de 0.6 se considera como evidencia de fotoinhibición por daño oxidativo, y la posible pérdida de los centros de reacción del PSII [149]. Además, se ha reportado que, valores de  $F_v/F_m$  inferiores a 0.75 pueden estar asociados con una deficiencia de la concentración de Fósforo en la hoja. En [63] se encontró que plantas de cacao de 7 y 13 meses sometidas a un periodo de sequía estacional de 28 días de duración presentaron valores de  $F_v/F_m$  que oscilaron entre 0.65 y 0.73. Teniendo en cuenta estos reportes, podría inferirse que el clon EET8 y el ICS60 sufrieron fotoinhibición debido al déficit hídrico, lo que sumado a la limitación de tipo estomática observada tuvo repercusión en la fuerte reducción en la fotosíntesis neta. No obstante, es de resaltar que, a pesar de esto, una vez reanudado el riego el clon ICS60 recuperó los valores de CC y el EET8, aunque más lento alcanzó un 80% de recuperación, además la no afectación de  $\Phi PSII$  y de ETR en EET8 y la rápida recuperación de los valores CC en estos parámetros en el clon ICS60 podrían ser indicativos que los posibles daños ocasionados por la fotoinhibición fueron reversibles. Se consideran como estrategias de tolerancia al DH, los mecanismos de reparación del PSII a través de la rotación o recambio de las diferentes subunidades del complejo fotosintético como la proteína D1, y la degradación

proteolítica de proteínas específicas del cloroplasto para prevenir la fotoinhibición, al igual que la activación del sistema antioxidante, puesto que les permitiría a las plantas recuperar el funcionamiento normal de la maquinaria fotosintética [226,384,385].

Según la intensidad del déficit hídrico las plantas utilizan diversas estrategias para maximizar la absorción de agua y reducir la pérdida de esta, dentro de las cuales la sensibilidad y el control estomático cumplen un rol de gran importancia pues les permite regular la pérdida de agua, con este propósito también se inhibe el crecimiento de los brotes, se produce el enrollado de las hojas y se acelera la senescencia de estas. Mientras que la maximización de la absorción de agua se logra mediante la modificación de la arquitectura radicular para asegurar el crecimiento de raíces a mayor profundidad para obtener agua adicional y el incremento en la acumulación de solutos para mantener el turgor celular. [75,122,161]

Los resultados de este estudio mostraron que algunas de esas estrategias fueron activadas para regular el estado hídrico bajo la condición de DH. Así, por ejemplo, en relación con el área foliar se observó una reducción significativa en todos los clones debido al tratamiento de DH, sin diferencias significativas entre ellos bajo esta condición. De acuerdo con [382] una de las respuestas más tempranas de la planta al déficit hídrico es la reducción del área foliar como consecuencia de la disminución del turgor celular y la tasa fotosintética. Resultados similares fueron reportados por [62] en un estudio realizado con genotipos de cacao en etapa de establecimiento y sometidos a diferentes frecuencias de riego, en los que el déficit hídrico ocasionó una reducción en el tamaño de las células de la hoja que condujo a la disminución de las áreas foliares. Al respecto, se reportó que la disminución en la tasa de expansión de la hoja generalmente precede a cualquier reducción en la conductancia estomática o la fotosíntesis, y que, en *T. cacao*, a pesar de que estos procesos son controlados por mecanismos endógenos, los efectos del medio ambiente pueden prevalecer sobre dicha influencia como pudo haber ocurrido aquí bajo condición de DH.

El sistema radicular es uno de los tejidos más sensibles y de rápida reacción de la planta por lo que destinar carbohidratos para incrementar el crecimiento de la raíz y acceder al agua subterránea en los períodos de déficit hídrico permite a la planta evitar la sequía [11]. En este estudio, se evidenció un incremento en la relación raíz/parte aérea en los 3 clones evaluados del cual se podría inferir que durante el período de déficit es posible que el metabolismo de los carbohidratos se haya ajustado para dirigir los fotoasimilados en mayor proporción a las raíces como mecanismo para acceder al agua subterránea y mantener el crecimiento de raíces laterales cuya disminución fue moderada (Figura 5-8), además, dicho incremento pudo ser estratégico para reducir la superficie foliar y disminuir la pérdida de agua por transpiración. Al respecto, se ha observado que en plantas de cacao sometidas a déficit hídrico se reduce la cantidad de fotoasimilados marcados con  $^{14}\text{C}$

exportados a hojas demanda para su crecimiento, pero se incrementan los fotoasimilados marcados con  $^{14}\text{C}$  que se asignan a las raíces, por lo que se considera que esta respuesta permite a las raíces acceder al agua subterránea en épocas de déficit hídrico [57]. Además se ha reportado que en cacao aunque la raíz principal es profunda no se destaca por su potencial de absorber agua, sino que es sobre las raíces laterales que se ramifican fuera de la raíz principal que recae la responsabilidad de la absorción del agua, así, en periodos de déficit hídrico no es la longitud de la raíz principal la que marca la diferencia sino la dinámica de renovación y crecimiento de las raíces laterales las que le permiten a los genotipos acceder al agua más profunda y de esta forma evitar o tolerar la sequía [11,27,55,56].

De acuerdo con [88] el efecto más importante del déficit hídrico es la reducción del crecimiento, debido a la sensibilidad de la expansión celular a esta condición. Los resultados de este estudio mostraron que en los clones EET8 e ICS60 se produjo una reducción en la biomasa seca total y de los órganos producto del DH. Al contrario, el clon TSH565 no presentó diferencias con respecto al tratamiento control, mostrando que su crecimiento no se vio afectado por el periodo de estrés de 52 días de duración. La reducción en los parámetros de crecimiento ha sido reportada en otros genotipos de cacao sometidos a DH durante diversos periodos de tiempo y en etapas de desarrollo distintas [55,56,62]. En [27] se evaluaron 48 parámetros e índices de crecimiento en 36 genotipos de cacao sometidos a un DH gradual por 60 días, encontrándose que los genotipos susceptibles presentaron una reducción significativa en la masa seca de todos los órganos y en la total, mientras que en los tolerantes se evidenció un incremento en algunos de los parámetros evaluados y otros permanecieron sin alteraciones debidas al tratamiento. Se reportó además que, en los genotipos susceptibles, el DH ocasionó alteraciones significativas en el crecimiento y desarrollo presentando mayor daño a nivel de las hojas, mientras que los tolerantes no sufrieron afectación alguna.

De acuerdo con lo anterior y los resultados aquí discutidos, el periodo de estrés aplicado de 52 días de suspensión de riego fue prolongado y severo para los clones evaluados. No obstante, la capacidad de recuperación evidenciada en los 3 clones, así como la variación en la respuesta de estos al DH permite sugerir que bajo las condiciones experimentales descritas, los clones presentaron diferentes niveles de tolerancia al déficit hídrico. Así, por ejemplo, el con TSH565 mostró menor afectación por el DH posiblemente debido a la maximización en la absorción de agua y la reducción en la pérdida de esta, con el mantenimiento de la maquinaria fotosintética, así como del crecimiento. Mientras que los clones EET8 e ICS60 mostraron mayor afectación debida al DH con respuestas fisiológicas similares en cuanto a la reducción de la eficiencia fotosintética y del crecimiento, no obstante, fue el clon EET8 en el que se evidenció una mayor pérdida de agua producto del DH. De esta forma las respuestas más contrastantes al déficit hídrico se observaron entre los clones EET8 y TSH565, mostrando el primero mayor sensibilidad y el segundo mayor tolerancia a esta condición.

## 5.6 Conclusiones

Los resultados de la presente investigación permitieron evidenciar diferentes niveles de tolerancia al déficit hídrico en los clones evaluados. Los 3 clones se recuperaron de un periodo de 52 días de suspensión de riego, transcurridos 7 días después de la rehidratación.

La regulación estomática fue la primera estrategia empleada por los clones de cacao para reducir la pérdida de agua por el DH. Sin embargo, en los clones EET8 e ICS60 se produjo la alteración de la eficiencia fotosintética como consecuencia de la fotoinhibición que fue reversible posiblemente por los mecanismos de reparación del PSII.

El clon TSH565 mostró la adopción de estrategias para mitigar los efectos del déficit hídrico mediante la maximización de la absorción de agua del suelo con una mayor eficiencia de carboxilación debida a la difusión de  $\text{CO}_2$  al mesófilo de la hoja con una  $g_s$  reducida y sin reducción del crecimiento, por lo que se propone este clon como Tolerante al DH.

El clon EET8 mostró no ser eficiente en la reducción de la pérdida de agua debido al DH, por lo que su  $\Psi$  presentó la mayor disminución con repercusión en el bajo contenido de agua en la hoja. Por lo tanto, la eficiencia del PSII se redujo observándose la reducción de A y del crecimiento lo que sugiere que este clon presenta mayor sensibilidad al DH.

Las respuestas diferentes observadas en los tres clones con respecto a lo evidenciado en el primer experimento son atribuibles al estado de desarrollo de las plantas, la duración e intensidad del déficit hídrico, las condiciones ambientales y época del año en las que se llevaron a cabo los experimentos, al igual que a la interacción de estos factores.

**Capítulo 6. Perfil transcriptómico dos clones de cacao  
(*Theobroma cacao* L.) con respuestas contrastantes al  
déficit hídrico**

## 6.1 Resumen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol con importancia económica debido a que, de la semilla que produce, se obtiene el chocolate y la manteca de cacao, productos utilizados en diferentes tipos de industrias. La Organización Internacional del Cacao (ICCO) estimó que los años 2015/16 se produjeron más de 4.0 millones de toneladas métricas de granos de cacao en todo el mundo. En Colombia el cacao es un cultivo alternativo a los cultivos ilícitos que beneficia a 35 mil familias productoras con 56.808 toneladas producidas en 146.011 Ha. En muchas regiones del mundo la producción de cacao es afectada por la ocurrencia de eventos climáticos que generan periodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta molecular a nivel transcriptómico de dos clones comerciales de cacao sometidos a déficit hídrico. Para ello, en invernadero se aplicó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo de bloques completos al azar con 3 repeticiones. En la parcela principal se evaluaron dos tratamientos de disponibilidad de agua en el suelo: - Capacidad de campo y déficit hídrico por suspensión de riego: en el primero se mantuvieron las plantas durante el período de evaluación con un potencial hídrico foliar entre -0.2 a -0.4 MPa; en el segundo, se suspendió el riego hasta que las plantas alcanzaron un potencial hídrico foliar de -3.0 MPa, lo cual ocurrió a los 52 días, momento en el que se colectaron hojas para la extracción del ARNm y posterior secuenciación. En la subparcela se evaluaron los clones: EET8 y TSH565. El análisis transcriptómico permitió identificar genes diferencialmente expresados en respuesta a déficit hídrico (cerca de 4600 genes), entre los cuales se identificaron genes comunes entre clones y específicos de cada clon inducidos y reprimidos en respuesta a estrés por déficit hídrico. El análisis de enriquecimiento funcional reveló que las categorías más significativamente enriquecidas en los genes comunes entre clones fueron la regulación de la expresión génica (epigénética), regulación del silenciamiento génico, procesos metabólicos del ARNm, el transporte intracelular como el transporte en el núcleo y entre este y el citoplasma, así como el transporte entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi mediado por vesículas (COPII), y procesos de desarrollo, entre otros. Además, se evidenciaron ARN largos no codificantes (LncRNAs) con expresión diferencial altamente significativa en respuesta al déficit hídrico. Estos resultados constituyen, a nuestro saber y entender, uno de los primeros análisis transcriptómico de la respuesta a estrés hídrico en cacao empleando secuenciación de ARN, proporcionando información valiosa para comprender mejor el mecanismo molecular que subyace a la tolerancia al déficit hídrico del cacao, y permitiendo identificar genes candidatos de tolerancia.

**Palabras clave:** RNAseq, transcriptoma, expresión diferencial, estrés abiótico

## 6.2 Introducción

El agua es el principal componente de las plantas que de forma directa o indirecta influye en la mayoría de los procesos fisiológicos [88]. Cuando el contenido de agua en un tejido está por debajo del contenido hídrico más alto que este puede tener en su estado de mayor hidratación se produce el déficit hídrico [122]. En el suelo el déficit hídrico se presenta cuando la disponibilidad de agua es inferior a la que las plantas requieren, por lo que, bajo esta condición, la tasa de transpiración excede la tasa de absorción de agua por las raíces ocasionando estrés por déficit hídrico [122,137,294]. Este tipo de estrés es considerado como el principal estrés abiótico que limita la producción de los cultivos en todo el mundo, del cual se espera un incremento debido a los efectos del cambio climático global [5,11,244]. Las plantas sometidas a estrés por déficit hídrico presentan inhibición del crecimiento y desarrollo producto de la reducción en la fotosíntesis neta ocasionada por el cierre estomático y otros cambios a nivel metabólico, como el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [5,27], así como cambios en la cinética de absorción de nutrientes minerales [88].

La respuesta de las plantas al estrés es compleja y resulta de la integración de diferentes eventos que ocurren en todos los niveles de organización: morfológico fisiológico, bioquímico y molecular [122]. A nivel molecular los cambios que se producen en la expresión génica diferencial están mediados por diferentes mecanismos epigenéticos, y desencadenan la activación e inactivación de gran número de genes y proteínas, poniendo en marcha diferentes mecanismos de respuesta responsables de las modificaciones funcionales que, en el corto plazo conllevan a la aclimatación y en largo plazo a la adaptación de la planta a las condiciones estresantes [58,86,159,379]. Así por ejemplo, se dan cambios en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo antioxidante [376,386], así como, la alteración de la relación raíz /brote debido al incremento en la asignación de biomasa a la raíz [377,387] lo que permite el aumento de la proliferación de las raíces para facilitar la exploración del suelo y aumentar el acceso a depósitos profundos de agua y mejorar su absorción y la captación de nutrientes [11,294].

En la actualidad, las herramientas de genómica funcional han sido de crucial importancia para descifrar los mecanismos moleculares detrás de la respuesta de las plantas al déficit hídrico. En términos generales el déficit hídrico del suelo es detectado por sensores hidráulicos u osmosensores presentes en la membrana plasmática de las células de la raíz, dando lugar a la generación de segundos mensajeros ( $\text{Ca}^+$ , ROS, CDKP, SnRK2, PIP) que inician una cascada de fosfoproteínas para activar factores de transcripción de genes de respuesta al estrés. Los productos de estos genes son de tipo funcional y regulador y, en conjunto, estos genes efectores son responsables de los mecanismos de respuesta tanto local como sistémica al estrés y que permiten a las plantas tolerar o adaptarse a esta nueva condición. Si la planta no es capaz de tolerar el estrés, muere [75,81].

En esta vía de transducción de señales se ha descrito un papel crucial del ácido abscísico (ABA). El ABA es considerado como el fitoregulador del estrés porque participa en la percepción y la transducción de la señal en una vía de señalización dependiente del ABA en la que se activan específicamente los factores de transcripción de genes de respuesta a estrés como por ejemplo los elementos de respuesta al ABA (AREB), entre otros. Igualmente se ha descrito una vía de señalización independiente de ABA en la que se activan otros factores de transcripción como los elementos de respuesta a la deshidratación (DRE). Esta regulación transcripcional se logra mediante elementos *cis* localizados en las regiones reguladoras de los genes de respuesta al estrés [75,76,388]. Además, el ABA está involucrado en la regulación del cierre estomático que es la primera respuesta de las plantas al déficit hídrico para reducir la pérdida de agua por transpiración, en donde tiene lugar la activación de proteínas de la membrana celular como las acuaporinas [79]. Así pues, los mecanismos de respuesta que son activados son diversos y complejos, no obstante, considerando que son la base de la respuesta fisiológica de las plantas y determinan la capacidad de tolerancia de éstas al déficit hídrico del suelo, la comprensión y entendimiento de las rutas que se despliegan para responder a este tipo de estrés son cruciales para la identificación de genes candidatos de tolerancia que puedan ser utilizados en programas de selección, conservación, y mejoramiento genético [389].

El estudio de la dinámica del transcriptoma es una herramienta importante que puede proporcionar información relevante sobre los elementos funcionales del genoma, sus patrones de expresión y la regulación de las regiones transcritas en condiciones de estrés por déficit hídrico [244]. Hasta la fecha el impacto de este tipo de estrés en la expresión génica se ha analizado mediante técnicas de secuenciación de alto rendimiento como el RNAseq en organismos principalmente modelo, como *Arabidopsis thaliana* [390], y cultivos de importancia económica como arroz [391] o maíz [82], sin embargo en organismos no modelo como el cacao la información disponible es muy escasa.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) se ha convertido en un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial en los últimos tiempos [392]. Es un árbol que se originó en la cuenca amazónica [10] y su importancia radica en sus semillas, las cuales son la principal fuente de materia prima para la industria que produce chocolate y productos de confitería asociados [393], con un reciente interés en compuestos bioactivos como antioxidantes que proporcionan beneficios para la salud [394,395]. Su cultivo sustenta comunidades en América Central y del Sur, Asia y África [10] y es el principal ingreso para alrededor de seis millones de pequeños agricultores a nivel mundial [396].

De acuerdo con Lahive et al. (2019) [5], desde el año 2008 la demanda de cacao ha crecido aproximadamente un 3% interanual y aunque se pronostica que continuará aumentando, no se espera que la oferta continúe satisfaciendo la creciente

demanda, puesto que en algunas regiones del mundo la producción de cacao es afectada por numerosas limitaciones para el suministro, que incluyen pérdidas significativas por plagas y enfermedades, granjas y árboles envejecidos, y, en algunas áreas, cambios en eventos climáticos que podrían generar periodos de baja disponibilidad hídrica en el suelo ocasionando estrés por déficit hídrico. El cacao es sensible al déficit hídrico del suelo, ya sea en estado vegetativo o reproductivo, esta condición genera reducción en la tasa de fotosíntesis, la eficiencia en el uso del agua, la partición y acumulación de fotoasimilados, la abscisión de órganos vegetativos y reproductivos, y el acortamiento del ciclo de vida [65]. Además, se ha reportado que la disminución en la tasa de fotosíntesis afecta la retención de cojines florales, de mazorcas jóvenes y maduras, así como el llenado de las almendras, impactando drásticamente el rendimiento del cultivo [91].

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos moleculares de la respuesta de *T.cacao* al estrés por déficit hídrico están aún sin descifrar. Hasta la fecha, la información existente a nivel transcriptómico se basa en un estudio de generación de ESTs publicado en el año 2008 [70]. Actualmente, con la existencia de dos genomas de *T. cacao* secuenciados B97–61/B2 (Criollo Belize) [72] y Matina 1-6 [74] es posible perfilar la expresión génica de esta especie en respuesta al déficit hídrico mediante técnicas de secuenciación de nueva generación, las cuales permiten, por su mayor profundidad, cubrir con mayor resolución los genes asociados a dicha respuesta.

En este estudio, se caracterizó la respuesta molecular al estrés por déficit hídrico en dos clones de *T. cacao* con respuestas fisiológicas contrastantes, empleando una aproximación a nivel transcriptómico.

### **6.3 Materiales y Métodos**

#### **Material Vegetal**

Para este estudio se emplearon plantas de 3 meses de los clones de *T. cacao* TSH565 (Trinidad Selection Hybrid 565) y EET8 (Estación Experimental Tropical 8) que habían sido sometidas a dos tratamientos de disponibilidad hídrica en el suelo (capacidad de campo - CC y déficit hídrico por suspensión de riego - DH) en un estudio previo (Capítulo 5). Estos clones fueron seleccionados por sus respuestas fisiológicas contrastantes al estrés por DH.

En el punto de máximo de estrés (Día 52) de la evaluación anteriormente descrita, se colectaron muestras de la 3 o 4 hoja completamente expandida de cinco plantas por clon y tratamiento que fueron congeladas y transportadas en nitrógeno líquido para extracción del ARN total en el laboratorio, con el protocolo descrito por Chang et al.,(1993) [289], con algunas modificaciones (Detalle en el capítulo 3).

### **Procesamiento de los reads secuenciados y mapeo al genoma de referencia**

El procesamiento inicial de las lecturas (reads) obtenidas se llevó a cabo a través de la instancia de Galaxy del EMBL-EBI [397] usando la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y MultiQC [398] para verificar la calidad por muestra y del set completo por tratamiento respectivamente, así mismo Cutadapt [248] fue empleado para eliminar las secuencias de los adaptadores y SortMeRna [249] para buscar y eliminar secuencias contaminantes de ARN ribosomal. Las lecturas resultantes (lecturas limpias) fueron utilizadas para los análisis subsiguientes.

Seguidamente las lecturas limpias de las 12 librerías fueron mapeadas al genoma de referencia de *T.cacao* Criollo Belice B97-61/B2 (Criollo\_cocoa\_genome\_V2, ensamble GCA\_000208745.2) [72] cuyas secuencias y anotaciones se obtuvieron de EnsemblPlants (<http://www.plants.ensembl.org>) versión 45 usando HISAT con los parámetros predeterminados [254]. Seguidamente se verificó la calidad de los alineamientos con el programa bam\_stat.py del paquete RSeQC [399].

### **Cuantificación de la expresión génica y análisis de expresión diferencial**

El recuento de las lecturas que fueron asignadas a los diferentes genes anotados del genoma de referencia se realizó con el programa featureCounts con la especificación de lecturas pareadas y conteo por fragmentos [263]. La matriz de los conteos resultante fue utilizada como entrada para la normalización de los niveles de expresión de los genes y el análisis de expresión diferencial que se llevó a cabo con el paquete DESeq2 [267] en la versión 3.6.1 de Rstudio [330]. Las muestras de las plantas provenientes de la condición control (CCE=EET8\_C y CCT=TSH565\_C) fueron comparadas con las muestras de las plantas sometidas al estrés por déficit hídrico (DHE=EET8\_DH y DHT=TSH565\_DH) utilizando un término de interacción para evaluar para cuales genes el efecto del tratamiento fue diferente en cada uno de los clones (TSH565\_C vs TSH565\_DH; EET8\_C vs EET8\_DH), y extraer las diferencias entre ellos. Se consideraron genes diferencialmente expresados (GDE) aquellos con valor p ajustado  $\leq 0.05$ . DESeq2 emplea el método de Benjamini y Hochberg para corregir por las múltiples inferencias (*multiple testing*) y controlar la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Este método calcula un valor p (probabilidad de que el log2FC sea tan fuerte como el observado o mayor que en la hipótesis nula) ajustado para cada gen y lo compara con un umbral fijado ( $p\text{-adjust} \leq 0.05$ ) para determinar la fracción de falsos descubrimientos. En este caso se considera aceptable una fracción de 5% de falsos positivos.

Igualmente, para determinar la variabilidad de las réplicas biológicas y la relación entre las muestras en cuanto al clon y tratamiento aplicado, la matriz de conteos obtenida con featureCounts fue normalizada y transformada con la función VST (*variance stabilizing transformation*) del paquete DESeq2 [267] y se realizó un análisis de componentes principales (ACP).

## **Análisis de enriquecimiento funcional**

A partir de los genes diferencialmente expresados se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional por set de genes basado en las ontologías génicas (GO) y las rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para acceder a las funciones biológicas representadas por estos. Para cada set de GDE, se detectaron las categorías GO enriquecidas con el programa AgriGO [400] el cual emplea el método de sobrerrepresentación mediante el uso de un test hipergeométrico para calcular la significancia del término funcional asociada con los genes introducidos. Para acceder a la información de las rutas metabólicas se utilizó el programa g:Profiler [269]. El umbral de selección para las categorías GO y las rutas KEGG fue el valor p ajustado (FDR) de  $\leq 0.05$ .

## **Selección de genes candidatos de tolerancia a estrés por déficit hídrico**

Diversas aproximaciones metodológicas fueron empleadas para la identificación de GDE que pudieran ser propuestos como genes asociados a la tolerancia al estrés por déficit hídrico en *T. cacao*. Para esto se consideraron los resultados del análisis de enriquecimiento funcional, la anotación funcional de los genes, la ortología con genes de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Matina 1-6* (*T. cacao*) u otra especie de acuerdo con los reportes encontrados en la literatura, la significancia de la expresión diferencial (FDR  $\leq 0.05$ ), el mayor factor de cambio ( $\log_2FC$ ) y la información de los reportes en la literatura acerca de la relación de los genes con la respuesta a déficit hídrico.

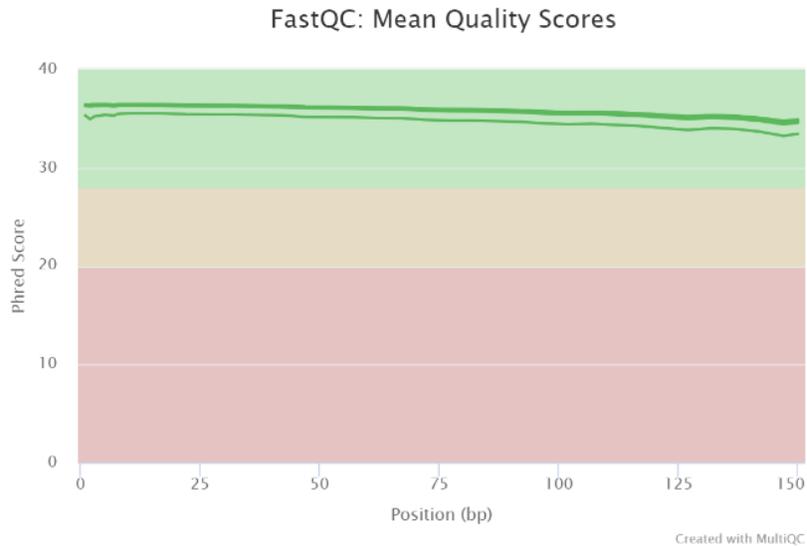
## **6.4 Resultados**

### **Análisis RNAseq. Características transcripcionales de *T.cacao* en respuesta al estrés por déficit hídrico**

La secuenciación con extremos pareados de las 12 librerías generó en total 354 millones de lecturas, con un promedio de 30 millones de lecturas por muestra.

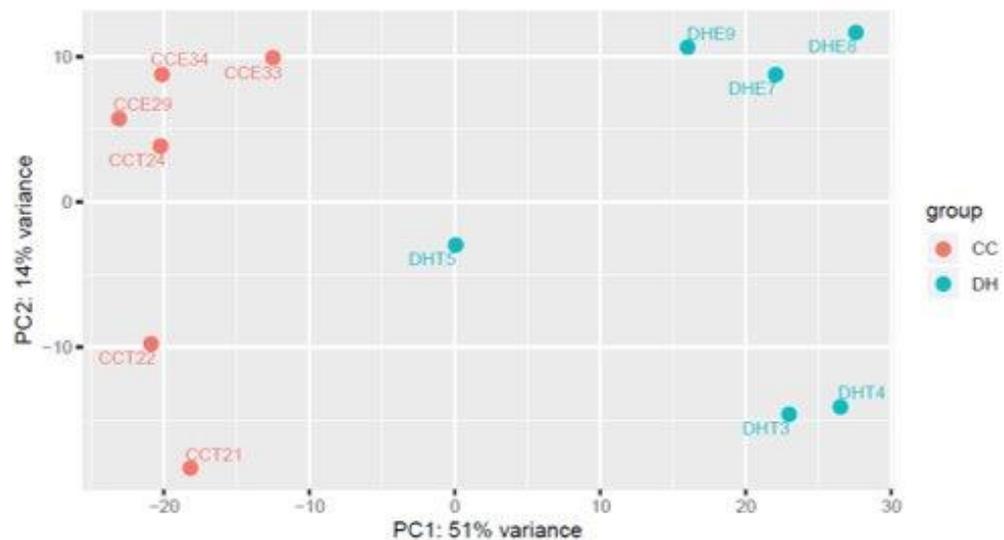
La calidad de las lecturas utilizadas en los análisis tenía un promedio de Phred score de 37 lo que indica una precisión del 99.9% en la llamada de la base durante la secuenciación (Figura 6-1). Así mismo, el porcentaje de mapeo de las lecturas con el genoma de referencia fue alto con un rango entre 87% y 93 %. Porcentajes similares de alineamiento han sido reportados con el genoma de criollo Belize [247,401] .

En promedio el 84% de las lecturas de cada librería fueron asignadas a los 24561 genes presentes en la base de datos del genoma de Criollo Belize Versión 2 utilizada ([https://plants.ensembl.org/Theobroma\\_cacao\\_criollo/Info/Index?db=core](https://plants.ensembl.org/Theobroma_cacao_criollo/Info/Index?db=core))

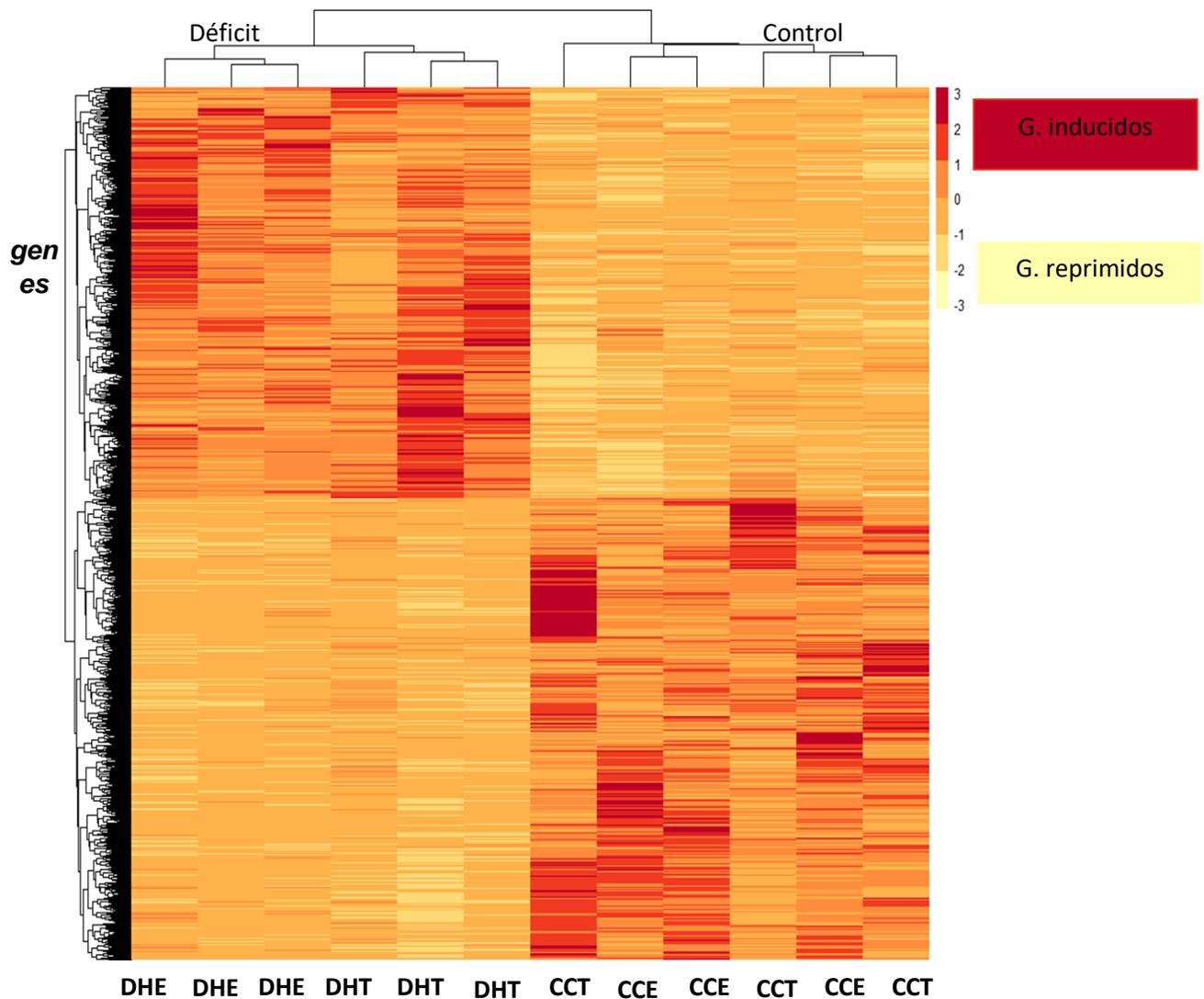


**Figura 6- 1 Calidad de las secuencias.**

Los resultados del ACP indicaron que la mayoría de la variación en la expresión génica fue consecuencia del tratamiento de déficit hídrico (Figura 6-2), observándose que la primera componente principal (PC1) explicó el 51.2% de la varianza total y separó las muestras de acuerdo con la condición hídrica, mientras que la segunda componente principal (PC2) explicó el 14.2% de la variación entre las muestras y las separó de acuerdo con el clon evaluado. Estos resultados muestran cierta reproducibilidad entre las réplicas biológicas, la cual fue mucho más alta para el clon EET8 que para TSH565, así como que los cambios en los perfiles de expresión de los genes (Figura 6-3) fueron ocasionados tanto por el tratamiento de DH como por las diferencias entre los dos clones en las muestras control y en respuesta al DH.

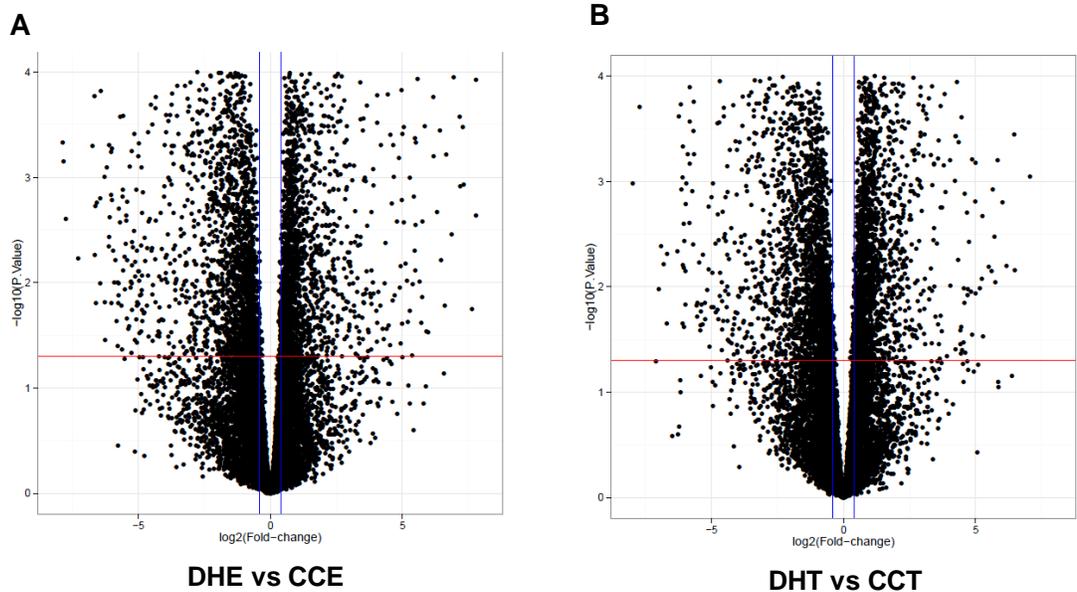


**Figura 6- 2 Análisis de componentes principales del perfil transcriptómico de los clones EET8 y TSH565 bajo condición control (CCE; CCT) y de déficit hídrico (DHE; DHT). E= EET8, T= TSH565. Los números hacen referencia a la réplica biológica.**



**Figura 6- 3 Cambios en la expresión de los genes de los clones de cacao EET8 y TSH565 bajo condición control (CCE; CCT) y de déficit hídrico (DHE; DHT). E = EET8 y T = TSH565.**

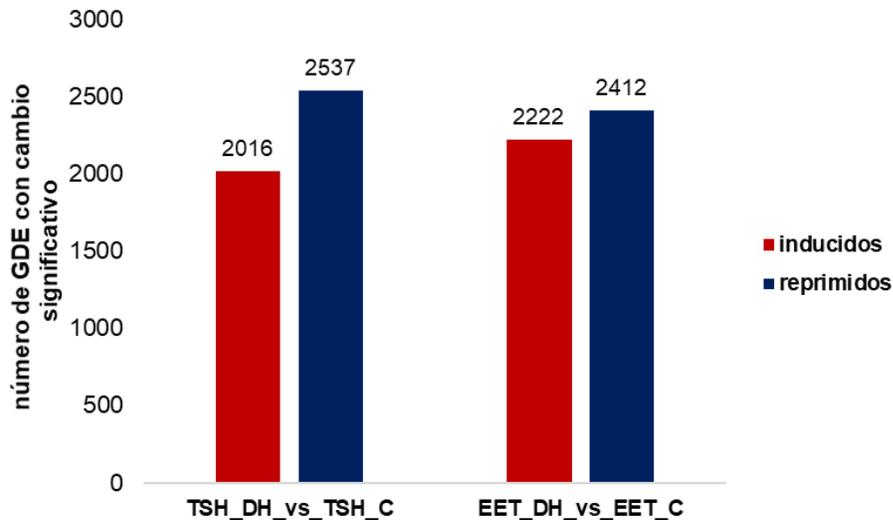
Además, con el volcano plot (Figura 6-4) se visualizaron e identificaron los cambios más significativos en la expresión génica combinando una medida de significancia estadística ( $\log_{10}p.value$ ) con la magnitud del cambio ( $\log_2FC$ ), por lo que en la parte superior del gráfico se evidenciaron los genes con mayor magnitud en el cambio de su expresión (de ahí que estén a la izquierda o a la derecha del centro), así como con una alta significancia estadística.



**Figura 6- 4** Volcano plot de los perfiles transcriptómicos de EET8 y TSH 565 en respuesta a déficit hídrico. **A)** EET8 y **B)** TSH565. condición control (CCE; CCT), déficit hídrico (DHE; DHT), E = EET8 y T = TSH565.

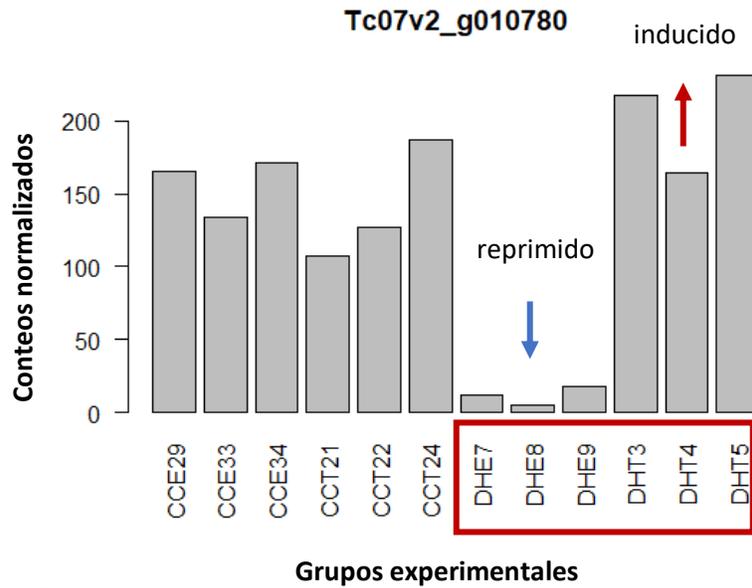
### Respuesta global de los clones TSH565 y EET8 al estrés por déficit hídrico

Con el fin de evaluar la diferencia en la expresión génica global en cada clon en respuesta al tratamiento de déficit hídrico, se evaluaron los genes diferencialmente expresados (GDE) según la significancia ( $FDR \leq 0.05$ ) en los diferentes grupos establecidos mencionados anteriormente. Como se muestra en las Figuras 6-4 y 6-5, el número de genes diferencialmente expresados en cada clon en respuesta al tratamiento de déficit fue similar. Igualmente se evidenció que el número de genes inducidos en respuesta al estrés en los dos clones fueron un poco menos que los reprimidos bajo esta condición. Con una ligera diferencia el clon TSH565 tuvo mayor cantidad de genes con cambio de expresión (4643) que el clon EET8 (4634). Se encontraron 2222 y 2016 genes inducidos en los clones EET8 y TSH565 respectivamente, mientras que 2412 y 2537 genes (EET8 y TSH565 respectivamente) fueron reprimidos en respuesta al tratamiento de DH (Figura 6-5).

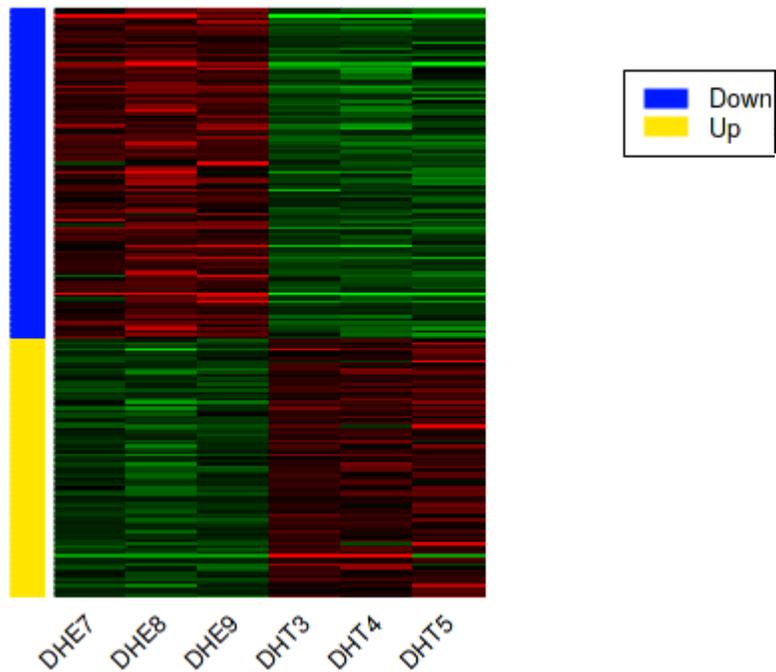


**Figura 6- 5 Cantidad de genes diferencialmente inducidos y reprimidos de forma significativa en los clones EET 8 y TSH 565 en respuesta al déficit hídrico.** Los contrastes realizados entre el clon y tratamiento corresponden a EET\_C vs EET\_DH; TSH\_C vs TSH\_DH.

Adicionalmente, para determinar si el efecto del tratamiento de déficit hídrico en la expresión de los genes fue diferente entre clones, se empleó un término de interacción entre el tratamiento (DH) y el clon en el diseño del análisis de expresión diferencial llevado a cabo con DESeq2 (EET8\_DH\_vs\_TSH565\_DH), básicamente esta comparación mostró los genes con perfiles de expresión inversa o perfiles con diferencias en órdenes de magnitud en la inducción o en la represión de los genes entre clones por efecto del tratamiento, por ejemplo un gen reprimido en EET8 en respuesta al DH, que en TSH565 fue inducido por este tratamiento (Figura 6-6A). Los resultados arrojaron una diferencia significativa en la expresión de 319 genes, en los cuales se concentraron los mayores cambios en la expresión génica debida al tratamiento de DH entre los clones (Figura 6-6B).

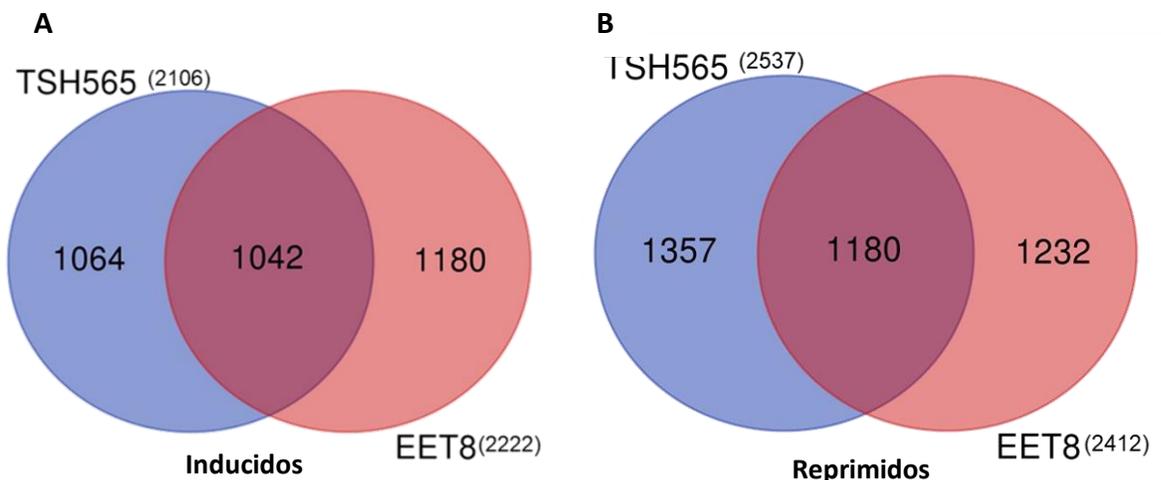


**B**



**Figura 6- 6 Cambio en la expresión de los genes entre clones bajo el tratamiento de déficit hídrico. A)** Cambio en la expresión del gen con mayor significancia entre grupos de muestras. **B)** Genes con perfiles de expresión inversa entre los clones EET8 y TSH 565 bajo DH. CCE= EET8\_C, CCT= TSH\_C, DHE= EET8\_DH, DHT=TSH565\_DH. Los números hacen referencia a la réplica biológica

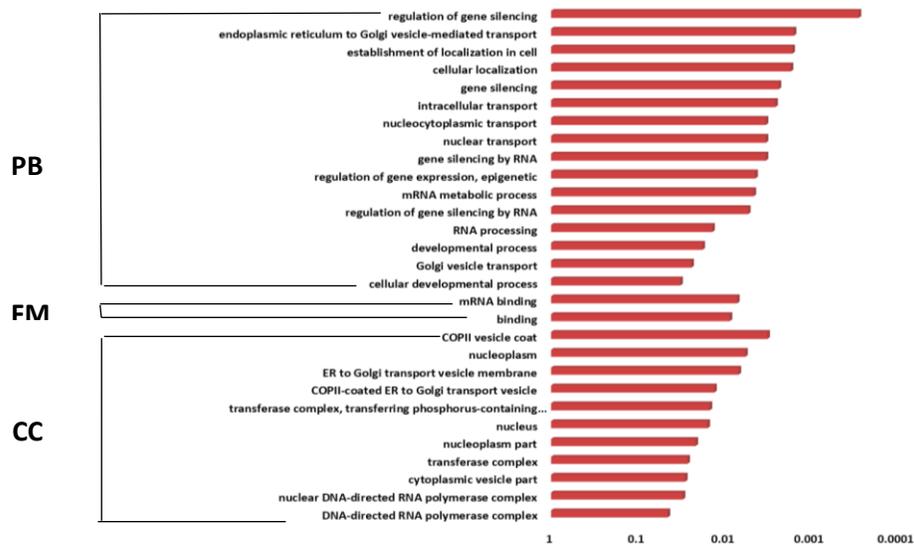
Además, se buscó identificar los genes comunes y únicos de cada clon expresados diferencialmente de forma significativa, en respuesta al tratamiento de estrés (Figura 6-7). Los resultados permitieron identificar un total de 1042 genes inducidos y 1180 reprimidos compartidos entre clones (Figura 6-7A y B). En el clon TSH565 se encontraron 1064 genes inducidos y 1357 reprimidos en respuesta al tratamiento de déficit hídrico, mientras que en el clon EET8 se encontraron 1180 y 1232 inducidos y reprimidos respectivamente. Resultados similares en cuanto al número de genes diferencialmente expresados en respuesta a tratamientos de estrés abiótico y biótico han sido reportados en *T. cacao* y en otras especies de plantas con cantidades similares de genes anotados [244,247,389,401–403].



**Figura 6- 7 Comparación entre genes diferencialmente inducidos y reprimidos de forma significativa entre los clones EET 8 y TSH 565 en respuesta al déficit hídrico. A)** genes inducidos comunes y únicos de cada clon. **B)** genes reprimidos comunes y únicos de cada clon.

Seguidamente, con el propósito de explorar la información funcional de los genes arrojados para cada set a partir de los diagramas de Venn (comunes y únicos) (Figura 6-7), se realizó un análisis de enriquecimiento funcional basado en las ontologías génicas (GO) y las rutas KEGG. Los 1042 genes comunes inducidos por el tratamiento de déficit hídrico en los dos clones estuvieron representados por procesos biológicos asociados con la respuesta a estrés como la regulación de la expresión génica (epigénética) (Figura 6-9), regulación del silenciamiento génico, procesos metabólicos del ARNm, procesamiento del ARN, el transporte intracelular, como el transporte al núcleo y entre este y el citoplasma, así como el transporte entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi mediado por vesículas (COPII), o procesos de desarrollo celular. La función molecular predominante fue la unión al ARNm y en general la unión a otras moléculas, con la ocurrencia de estos procesos y funciones moleculares en los compartimentos celulares como el núcleo, la membrana de la vesícula (COPII) que transporta sustancias del RE al aparato de

Golgi, vesícula citoplasmática, complejo de ARN polimerasa, así como el complejo con actividad transferasa (Figura 6-8).

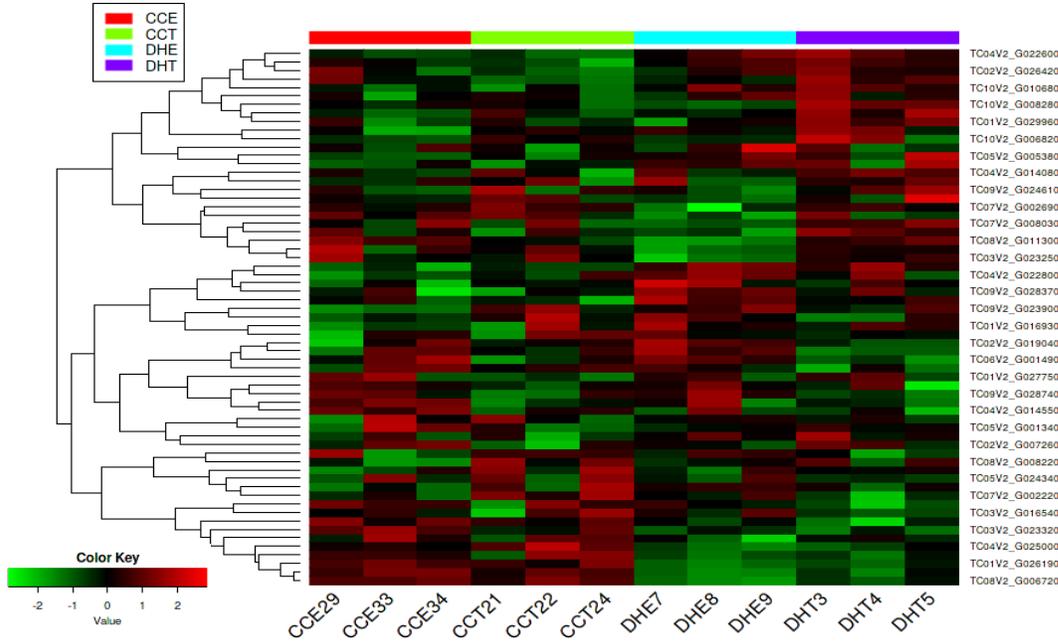


**Figura 6- 8 Categorías GO enriquecidas por los genes comunes inducidos entre los clones TSH565 y EET8 en respuesta al DH.** PB: Proceso biológico, FM: Función molecular y CC: Componente celular.

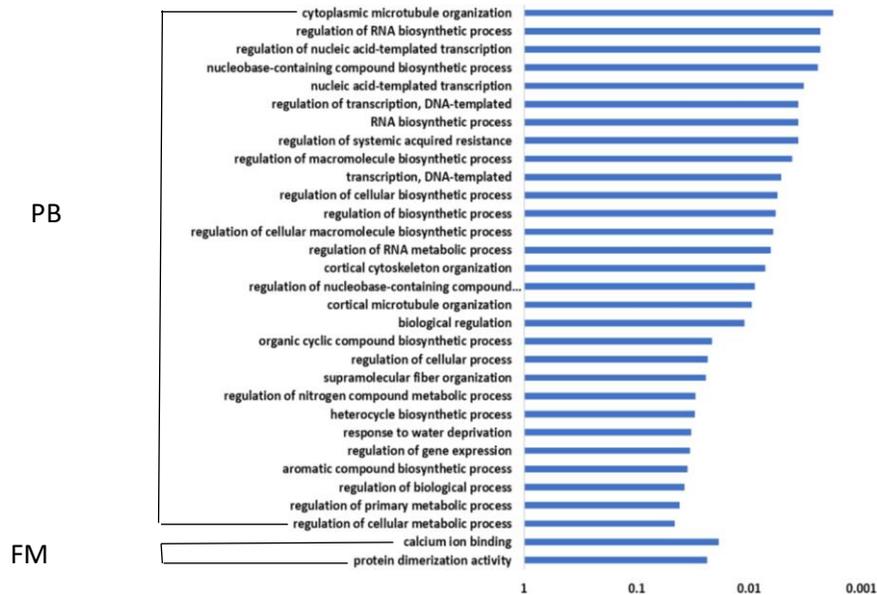
Por otra parte, los genes reprimidos en los dos clones en respuesta a DH se encontraron representados por las categorías relacionadas con la regulación de procesos biológicos como procesos biosintéticos del ARN, de la transcripción, de la expresión génica, de procesos biosintéticos celulares, de procesos metabólicos primarios, así como de la resistencia sistémica adquirida, resaltando algunos genes con funciones relacionadas con la respuesta a la falta de agua. Las funciones moleculares se centraron en la unión al calcio y la actividad de dimerización de proteínas (Figura 6-10).

En la búsqueda de diferencias entre la respuesta de los clones al DH se exploraron las ontologías génicas y las rutas KEGG en cada uno de los genes inducidos y reprimidos que no se compartieron entre clones, encontrándose que los 1064 genes inducidos en el clon TSH565 por el déficit hídrico enriquecieron procesos biológicos principalmente de fosforilación de proteínas, modificación de macromoléculas, procesos metabólicos de proteínas, así como procesos metabólicos que involucran el fósforo. Dentro de las funciones moleculares asociadas a estos procesos se encontraron las categorías de unión al ADN, a proteínas y otras moléculas destacando la actividad catalítica y la actividad quinasa (Figura 6-11). Todas estas funciones y procesos biológicos tienen relevancia en la respuesta de las plantas al estrés como las rutas de señalización MAPK y la transducción de señales mediada por fitoreguladores del crecimiento y desarrollo, como lo indican las rutas de este tipo que se encontraron igualmente enriquecidas en este clon (Figura 6-12 y 6-13).

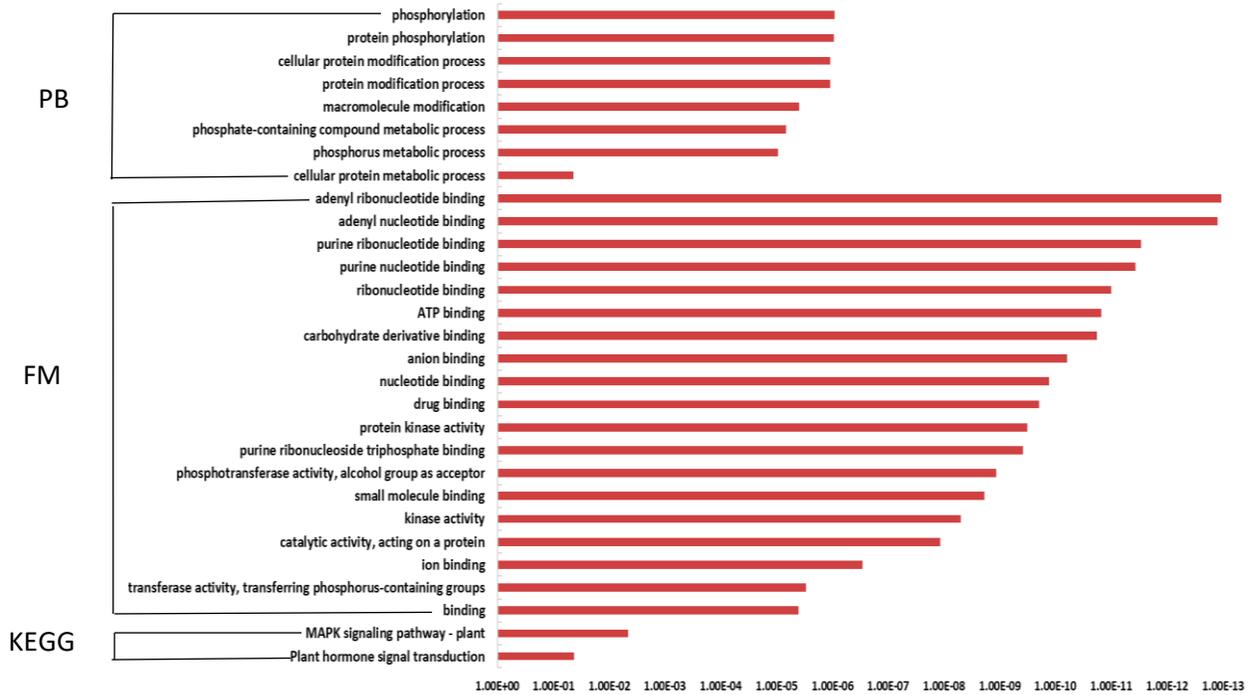
Estos resultados muestran que diversos reguladores de crecimiento intervienen en la respuesta de este clon al DH siendo uno de ellos el ABA, así como la implicación de las MAPK quinastas en la ruta de señalización y transducción de señales en la respuesta de este clon.



**Figura 6- 9 Cambio en la expresión de los genes enriqueciendo la categoría regulación de la expresión génica, epigénética.**



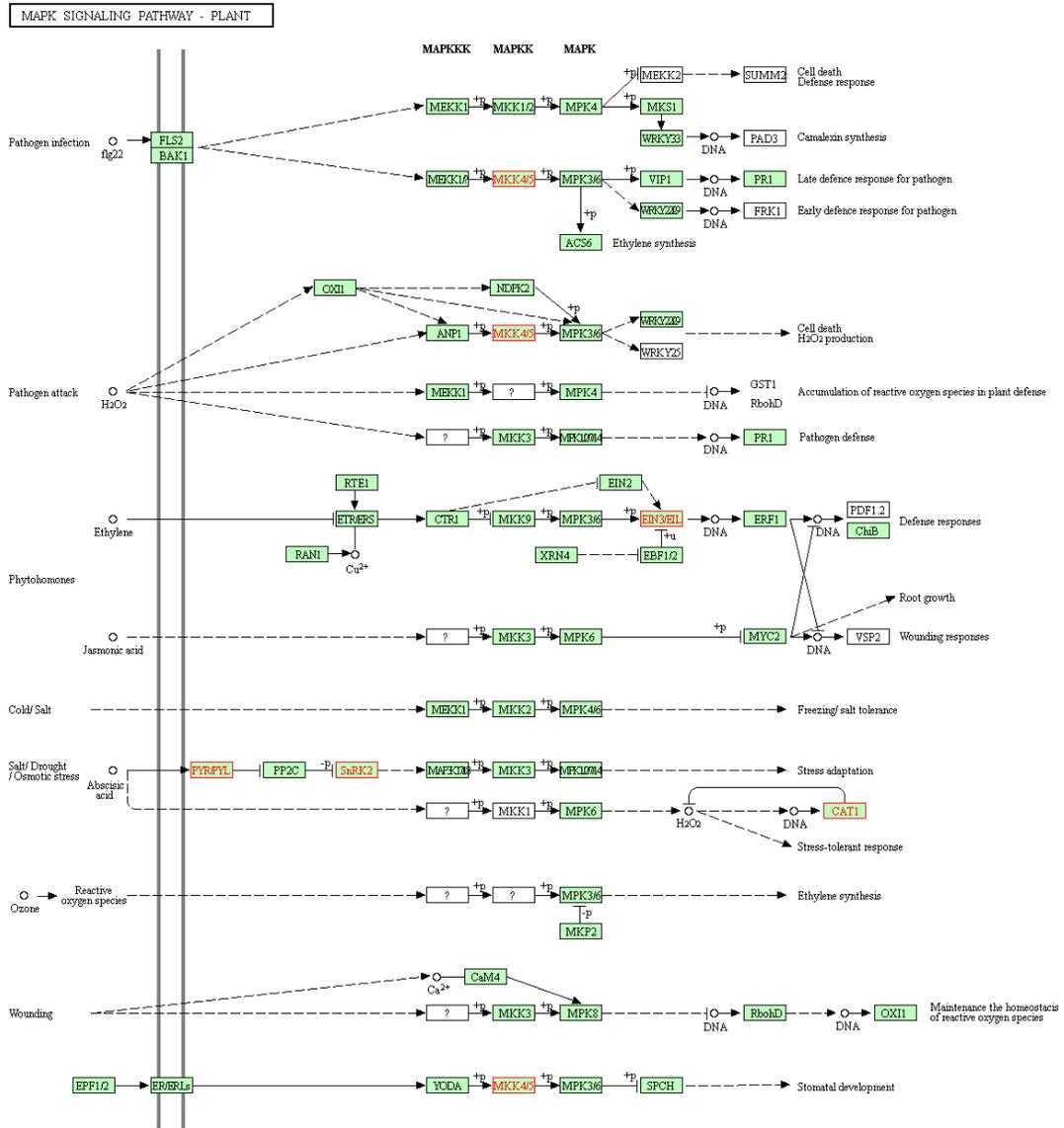
**Figura 6- 10 Categorías GO representadas en los genes comunes reprimidos entre los clones TSH565 y EET8 en respuesta al DH. PB: Proceso biológico y FM: Función molecular.**



**Figura 6- 11 Categorías GO y rutas metabólicas enriquecidas por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH.** PB: Proceso biológico, FM: Función molecular y CC: Componente celular. KEGG: ruta metabólica de la enciclopedia Kyoto de genes y genomas.

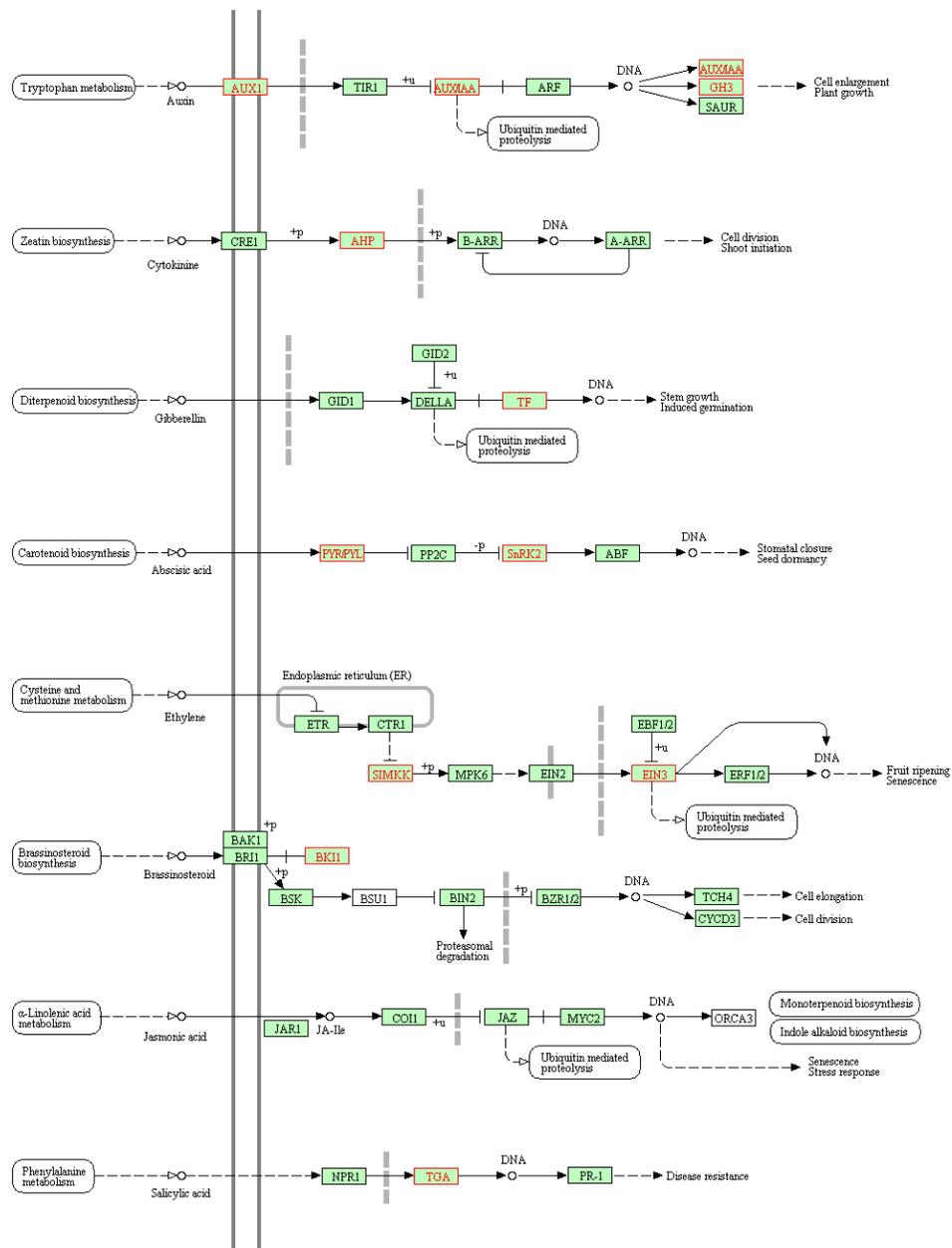
Con relación a los genes reprimidos bajo la condición de DH en este clon se encontró que están representados por procesos biológicos asociados a procesos metabólicos en donde se involucra el ATP, así como procesos metabólicos de compuestos que contienen purinas y nucleótidos de base. La función molecular principal encontrada es la actividad catalítica y resaltan dentro de los genes reprimidos en este clon, productos relacionados con los componentes celulares como el complejo de la cadena respiratoria, el respirasoma, así como membranas y complejos de proteínas de la mitocondria (Figura 6-14).

Estos resultados reflejan que el DH ocasionó una reducción en la expresión de los genes del metabolismo energético celular. Por lo que queda el interrogante si esto representa un impacto negativo para el clon TSH 565 o si por el contrario es una respuesta dirigida al ahorro energético como mecanismo de tolerancia al estrés. Así, tal vez este clon pueda implementar mecanismos alternativos para sobrevivir a la condición de baja energía ocasionada por el estrés, lo que podría ser parte de un mecanismo de tolerancia.

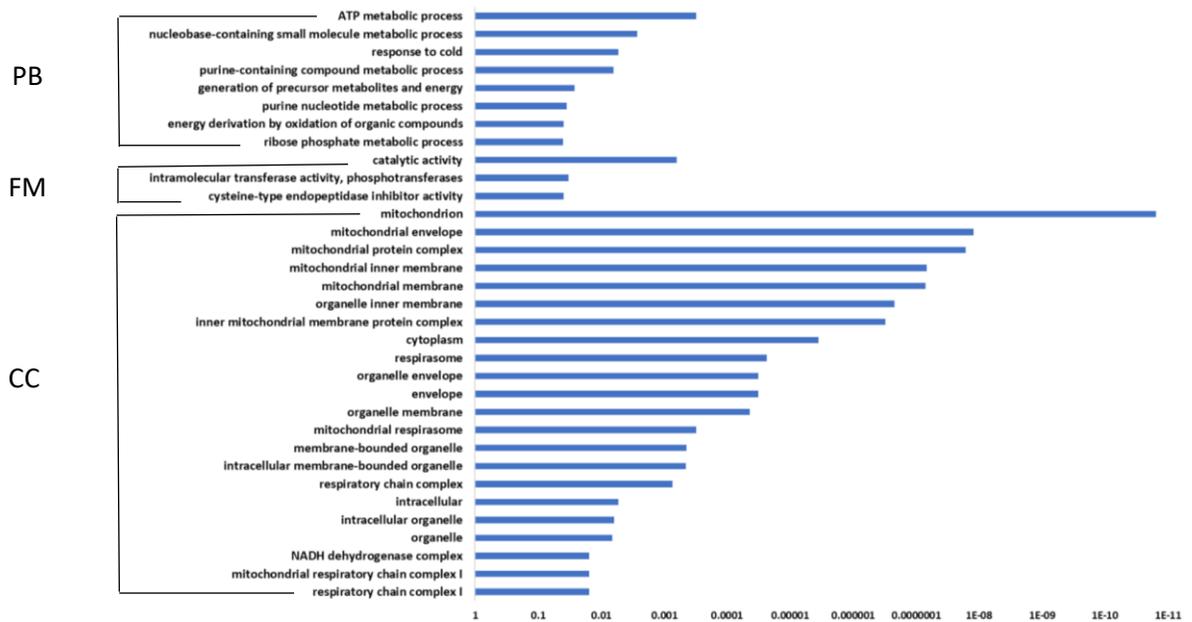


**Figura 6- 12 Ruta de señalización MAPK enriquecida por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH. Las cajas delineadas en rojo señalan los genes significativamente inducidos.**

PLANT HORMONE SIGNAL TRANSDUCTION

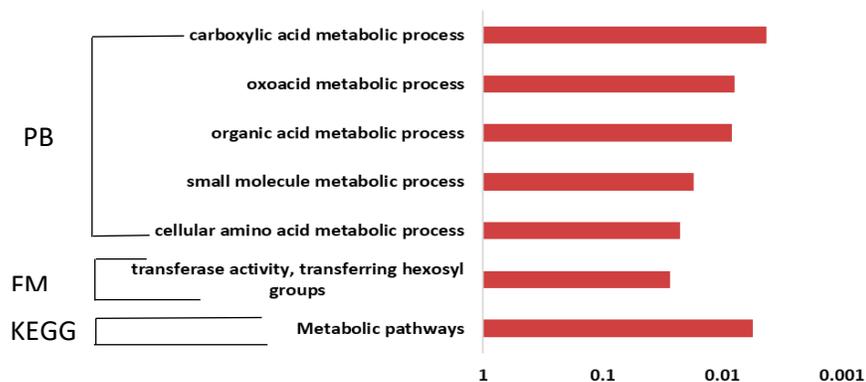


**Figura 6- 13 Ruta de transducción de señales mediada por hormonas enriquecida por los genes inducidos en el clon TSH565 en respuesta al DH. Las cajas delineadas en rojo señalan los genes significativamente inducidos.**



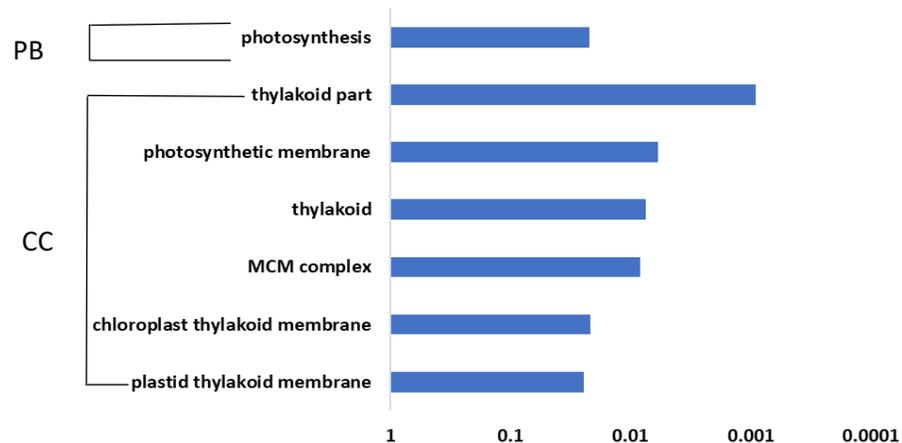
**Figura 6- 14 Categorías GO representadas en los genes reprimidos en el clon TSH565 en respuesta al DH.** PB: Proceso biológico, FM: Función molecular y CC: Componente celular.

Por otra parte, en los genes inducidos por el DH en el clon EET8 se encontraron categorías relacionadas con procesos metabólicos por lo que en la búsqueda de las rutas KEGG, la ruta de metabolismo fue enriquecida por estos genes (Figura 6-15). Los genes estaban relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico, el metabolismo de carbohidratos, de lípidos, del piruvato, de la lignina, del triptófano, así como de la metionina y la galactosa además de procesos catabólicos y biosintéticos. Aunque dentro de estos procesos podría haber algunos de relevancia en la respuesta al DH, pareciera que este clon respondió al estrés mediante la activación de diferentes rutas metabólicas más que mediante la activación de rutas específicas enfocadas en la respuesta al estrés como lo hizo el clon TSH565.



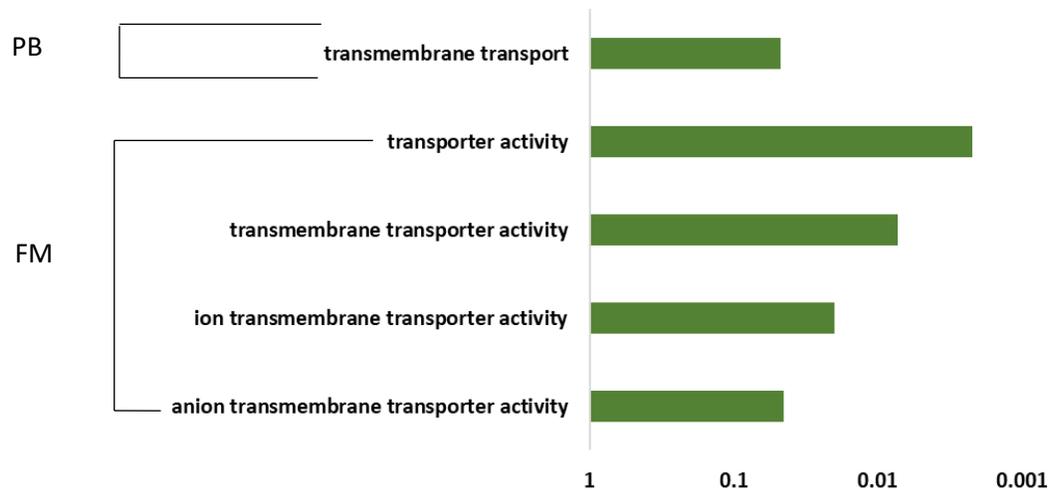
**Figura 6- 15 Categorías GO y rutas metabólicas enriquecidas por los genes inducidos en el clon EET8 en respuesta al DH.** PB: Proceso biológico, FM: Función molecular y KEGG: ruta metabólica de la enciclopedia Kyoto de genes y genomas.

Adicionalmente los genes reprimidos en este clon a consecuencia del déficit hídrico estuvieron representados por el proceso biológico de la fotosíntesis (Figura 6-16) con ocurrencia en los tilacoides, la membrana fotosintética y el complejo MCM requerido para la iniciación y regulación de la replicación del ADN, como lo mostraron los componentes celulares más representados. Estos resultados indican que el DH ocasionó una disminución de la expresión de los genes de la maquinaria fotosintética lo que podría representar la razón por la que este clon mostró mayor afectación en este proceso a nivel fisiológico (Capítulo 5).



**Figura 6- 16 Categorías GO representadas en los genes reprimidos en el clon EET8 en respuesta al DH.** PB: Proceso biológico y CC: Componente celular.

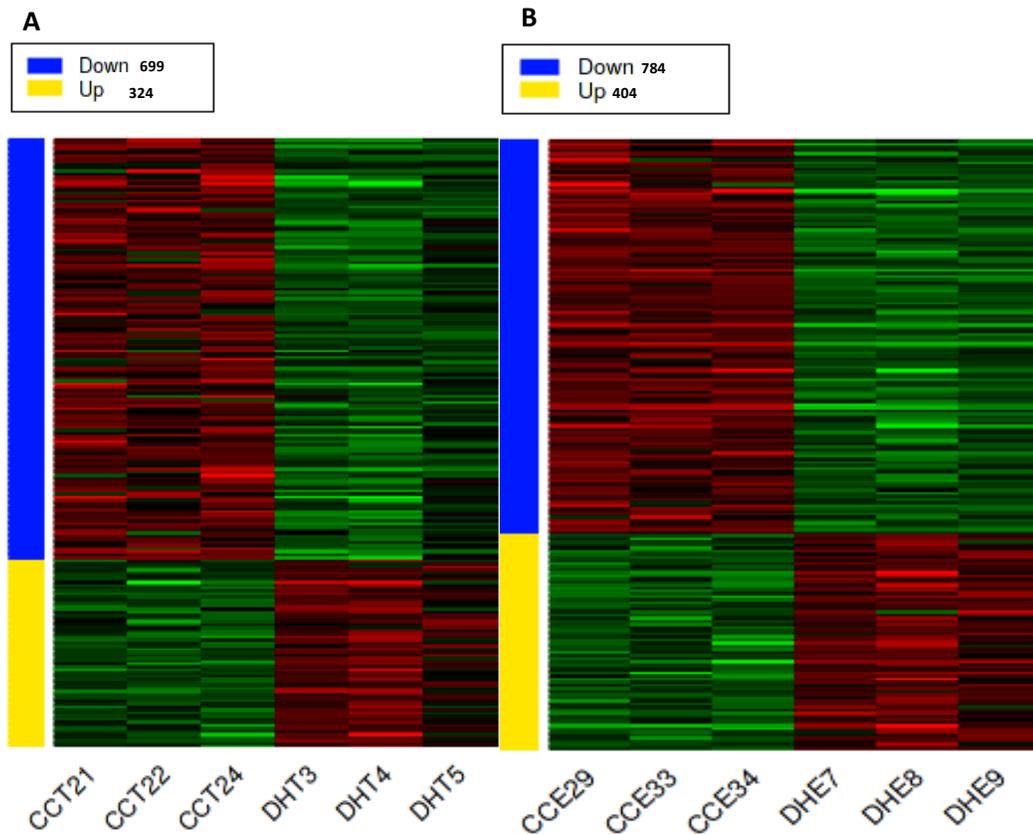
Con el propósito de identificar las principales diferencias en la respuesta de los clones al tratamiento de DH, se comparó la expresión de los genes de ambos clones bajo esta condición (TSH-DH vs EET-DH). Producto de este contraste se obtuvieron 319 genes cuyos valores de  $\log_2FC$  indican la divergencia en la expresión de los genes entre los clones, más no la dirección de dicho cambio (inducido/reprimido), por lo que el análisis de enriquecimiento funcional se realizó en el conjunto total de genes (319) para determinar las funciones en las que se concentran dichas diferencias. Interesantemente, las principales diferencias en el cambio de expresión de los genes entre clones producto del DH se encontraron enriqueciendo el proceso biológico relacionado con el transporte transmembrana y las funciones moleculares asociadas al mismo como la actividad de transporte de iones y aniones entre membranas (Figura 6-17). Llama la atención que los genes comunes inducidos por el déficit hídrico en ambos clones enriquecieron categorías relacionadas con el transporte intracelular y el transporte entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi mediado por vesículas (COPII) y que, de acuerdo con el resultado de este análisis, las principales diferencias entre clones se concentran en esta categoría. Esto es un indicio importante que señala que en *T. cacao* los procesos de transporte intracelular podrían ser de gran relevancia en la respuesta de tolerancia al DH.



**Figura 6- 17 Diferencia en la respuesta al tratamiento de déficit hídrico entre los clones EET8 y TSH 565 (EET8\_DH\_vs\_TSH565\_DH).** PB: Proceso biológico y CC: componente celular

### Identificación de posibles genes candidatos de tolerancia al DH

Con el propósito de identificar posibles genes candidatos de tolerancia al déficit hídrico se aplicó un filtro sobre el factor de cambio ( $\log_2FC$ ) de los genes definidos previamente como diferencialmente expresados por su significancia ( $FDR \leq 0.05$ ) considerándose aquellos genes con un  $\log_2FC \geq 2$  como inducidos y los reprimidos aquellos genes con un  $\log_2FC \geq -2$ . Luego de la aplicación de este filtro se encontraron 404 genes inducidos en el clon EET8 y 324 genes en el clon TSH565 con el mayor cambio en su expresión en respuesta al DH (Figuras 6-18) . De este set de genes 136 hicieron parte de la respuesta en común de los clones mientras que 192 y 268 fueron genes exclusivamente inducidos por el DH en los clones TSH565 y EET8 respectivamente. El número de genes reprimidos en el clon TSH565 fue de 699 y en el EET8 fue de 784 genes observándose mayor cantidad de genes reprimidos que inducidos por el DH (Figuras 6-18). De estos, 332 genes fueron comunes entre clones mientras que 367 correspondieron a la respuesta del clon TSH565 y 450 a la del clon EET8.



**Figura 6- 18 Cambios en los perfiles de expresión de los genes diferencialmente expresados de forma significativa con un factor de cambio  $\log_2FC \geq 2$  (inducido) y  $\log_2FC \leq -2$  (reprimido) entre clones. A) TSH565\_DH\_vs\_TSH565\_C. B) EET8\_DH\_vs\_EET8\_C**

Para identificar las funciones representadas en estos sets de genes se les realizó el análisis de enriquecimiento funcional. Los genes inducidos en ambos clones en respuesta a DH se encontraron enriqueciendo las categorías funcionales asociadas a procesos biológicos como respuesta a estrés, respuesta a estímulos, respuesta de defensa, respuesta a niveles de oxígeno, biosíntesis de flavonoides principalmente con funciones moleculares enmarcadas en categorías de unión a otras moléculas y funciones catalíticas, resultados que indican que los genes con mayor factor de cambio en su expresión comunes entre clones están relacionados con la respuesta a estrés.

Los genes reprimidos en respuesta al DH en los clones EET8 y TSH565 estuvieron representados por las categorías de procesos biológicos relacionadas con la morfogénesis celular, la biogénesis de la pared celular al igual que la respuesta al estrés osmótico, al estímulo abiótico y respuesta al estrés salino con la región extracelular como el compartimento celular asociado a dichos procesos. De acuerdo con esto, el DH ocasionó una reducción de la expresión de genes asociados con procesos de crecimiento, así como de respuesta a estrés por lo que se podría pensar que algunos mecanismos de respuesta inmediata al estrés pudieron haber

sido relevados por mecanismos de tipo metabólico, energético, de crecimiento y desarrollo entre otros, puesto que el efecto del DH se evaluó en un estado avanzado del estrés o, posiblemente dentro de los productos de los genes inducidos relacionados con estas categorías se concentró la activación de mecanismos que requiere el *T. cacao* para sobreponerse al estrés.

En el caso de los 192 genes inducidos exclusivamente en TSH solo dos categorías funcionales relacionadas con procesos biológicos resultaron enriquecidas, respuesta a estímulos y respuesta a estrés con una función molecular relacionada con la unión a proteínas desplegadas. Estos resultados sugieren que, en este clon, la reprogramación de la expresión génica estuvo dirigida de forma específica a solventar la situación ocasionada por el tratamiento de DH y sobreponerse tal como se observó en la respuesta global presentada anteriormente. Es de resaltar que entre los genes que se encuentran enriqueciendo estas dos categorías, están incluidos aquellos que intervienen en los procesos de señalización y transducción de señales mediados por el ABA, como se observó en la respuesta global, por lo que se confirma que este fitoregulador de crecimiento es clave en la respuesta al DH en *T.cacao*.

Mientras que, en el caso de los genes reprimidos en este clon, se encontraron representadas las categorías relacionadas con procesos biológicos como el metabolismo de flavonoides, el desarrollo de brotes, la respuesta a estímulos por el ácido jasmónico, la morfogénesis de la hoja, las respuestas a estímulos externos entre otros. Es interesante que haya una reducción en la expresión de los genes relacionados con el desarrollo de brotes y morfogénesis de la hoja en este clon pues una de las estrategias observadas a nivel fisiológico fue la reducción del área foliar y el incremento en el crecimiento de las raíces para maximizar la absorción de agua del suelo.

Por otra parte, en los genes inducidos solo en el clon EET8 se encontraron categorías funcionales de procesos biológicos como respuesta a estímulo químico, respuesta a estrés osmótico, respuesta a peróxido de hidrogeno, respuesta a la falta de agua, respuesta a estrés salino, respuesta a estímulo abiótico, respuesta a estrés, respuesta a estímulo por ABA, respuesta de defensa, respuesta a fitoreguladores de crecimiento como el etileno, y las giberelinas, procesos metabólicos secundarios entre otras. Se encontraron como funciones moleculares asociadas a estos procesos las categorías de unión a otras moléculas, funciones catalíticas, así como la actividad de factores de transcripción con ocurrencia a nivel de la membrana plasmática, así como a nivel de pared celular y de la región extracelular. Es importante mencionar que los mismos genes pueden estar enriqueciendo diferentes categorías, como en el caso de respuesta a estrés, respuesta a estímulo por ABA, o respuesta a la falta de agua y el estrés abiótico. En efecto, factores de transcripción de tipo NAC, WRKY, MYB, ERF/AP2, SRG1, CRF2, bHLH, Zinc finger\_C2H2, ARF5, IAA6, ERF114 son transversales a estas respuestas y se han reportado por estar relacionados con la respuesta al déficit hídrico en la ruta dependiente e independiente del ABA (Tabla 6-1) [75,187]. Estos

resultados indican una fuerte regulación de la respuesta a estrés mediada por diversos factores de transcripción para la activación de diversos genes y proteínas con relevancia en los mecanismos que conducen a la tolerancia de este clon al DH.

**Tabla 6- 1 Factores de Transcripción inducidos bajo déficit hídrico en el clon EET8.**

<b>Gen ID</b>	<b>Log2 FC</b>	<b>Descripción</b>
Tc08v2_g005990	3.51	AT-hook motif nuclear-localized protein 17
Tc01v2_g026410	2.63	Putative Probable WRKY transcription factor 23
Tc03v2_g007590	2.87	NAC domain-containing protein 100
Tc06v2_g008240	2.12	Putative Auxin-responsive protein IAA6
Tc03v2_g011610	3.05	Putative Ethylene-responsive transcription factor ERF114
Tc10v2_g000450	2.00	Scarecrow-like protein 3
Tc06v2_g012830	2.59	Probable WRKY transcription factor 28
Tc03v2_g024410	2.03	Putative Ethylene-responsive transcription factor CRF2
Tc01v2_g019070	2.11	Putative Protein LATE FLOWERING
Tc04v2_g004130	3.61	AP2/ERF domain-containing transcription factor-like protein isoform 1
Tc08v2_g000320	2.58	Basic helix-loop-helix DNA-binding superfamily protein, putative isoform 1
Tc02v2_g018900	2.64	Zinc finger CCCH domain-containing protein 15
Tc03v2_g011360	2.22	Putative Transcription factor bHLH137
Tc08v2_g003450	2.87	Auxin response factor 5
Tc03v2_g010890	6.17	WRKY-type DNA binding protein 1
Tc02v2_g016800	2.40	NAC domain-containing protein 83
Tc01v2_g000720	3.57	NAC domain-containing protein, putative
Tc08v2_g015040	4.78	Integrase-type DNA-binding superfamily protein, putative
Tc03v2_g006270	2.17	Putative Probable WRKY transcription factor 61
Tc01v2_g014130	2.55	Homeodomain-like superfamily protein isoform 1
Tc02v2_g019590	2.24	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein, putative
Tc09v2_g007510	2.38	Putative Heat shock factor protein HSF30
Tc02v2_g025780	2.99	Transcription factor, putative
Tc01v2_g013820	2.16	Putative Probable WRKY transcription factor 71
Tc07v2_g011900	3.82	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1
Tc04v2_g005190	2.06	Protein SCARECROW

En el caso de los genes reprimidos en este clon y en respuesta al DH, se encontraron categorías de procesos biológicos relacionadas con la regulación de los niveles de hormonas, el transporte de hormonas, la respuesta a auxinas, a etileno, a estrés, a estrés oxidativo, a estímulos endógenos, a procesos de desarrollo, al tropismo y gravitropismo, así como a la biogénesis de la pared celular. Es de resaltar la reducción de la expresión de genes relacionada con procesos de crecimiento y desarrollo, así como de otras categorías asociadas al tropismo y gravitropismo, puesto que el clon EET8 redujo su crecimiento debido al DH y dentro de los factores de transcripción inducidos en este clon se encuentra el SRG1

(protein SCARECROW), el cual se ha reportado como un represor de la ruta de señalización de GA (ácido giberélico), involucrado en el control del crecimiento de las plantas [187].

Finalmente considerando los procesos biológicos enriquecidos por los genes comunes y únicos de los clones y su relación con la respuesta a estrés, así como el mayor factor de cambio (inducidos) presentado por estos, se seleccionaron algunos de ellos para realizar una búsqueda bibliográfica sobre su posible relación con la respuesta al estrés por déficit hídrico, complementando la información encontrada con las relaciones de ortología entre los genes seleccionados y los reportados en otros organismos en la literatura encontrada (Tabla 6-2).

Los genes con mayor cambio en su expresión debido al DH están relacionados con mecanismos de osmoprotección, crecimiento celular, síntesis del precursor del ABA, transporte, señalización, defensa, regulación de la expresión por factores de transcripción, así como protección del daño oxidativo por el sistema antioxidante (Tabla 6-2). Además, todos estos genes han sido reportados como inducibles por el déficit hídrico y están involucrados en diversos mecanismos de respuesta a esta condición. Igualmente, teniendo en cuenta la información proporcionada por el análisis de enriquecimiento funcional y la literatura, se realizó una búsqueda de los genes asociados con los procesos más relevantes en la respuesta al DH. Además, se realizó una búsqueda centralizada en los genes del sistema antioxidante, de biosíntesis de osmolitos, así como aquellos relacionados con el funcionamiento del PSII. También, se verificó la expresión de genes que son referenciados como genes blanco o de interacción con algunos genes que mostraron el mayor cambio en su expresión en respuesta a DH (Tabla 6-2). De esta forma, el compendio de los genes con mayor implicación en la respuesta al déficit hídrico en *T. cacao* se presenta en las Tablas 6-2 y 6-3, proponiéndose como de genes candidatos de tolerancia aquellos que se inducen significativamente en los dos clones o en alguno de ellos.

Estos genes candidatos deben ser validados en cuanto a expresión diferencial, al igual que a nivel funcional para verificar su relación directa con la respuesta de tolerancia al DH.

**Tabla 6- 2 Detalle de los genes diferencialmente expresados (GDE) con mayor factor de cambio (Top 40) entre los genes comunes y específicos de cada clon relacionados con la respuesta de tolerancia al Déficit hídrico. Se proponen como genes candidatos de Tolerancia al DH.**

Gen ID	Log2FC		Descripción	Funciones	Referencia
	TSH565	EET8			
<b>Osmoprotección</b>					
Tc04v2_g025290	10.8	13.04	Galactinol synthase 2	Estabilización membrana celular, protección complejo fotosintético	[75,404]
Tc02v2_g026970	9.03	7.63	Isocitrate lyase	Gluconeogénesis, azúcares, equilibrio osmótico, metabolismo de la energía	[405,406]
<b>Crecimiento celular</b>					
Tc03v2_g020060	7.04	10.7	Expansin-like B1	Expansión y alargamiento de la pared celular	[407]
<b>Factores de transcripción</b>					
Tc04v2_g024560	7.1	N/S	Putative bZIP transcription factor 53	Regulación rpta. Baja energía	[408–411]
Tc09v2_g024900	6	5.75	Putative Protein SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1	Hub TF, tolerancia a múltiples estreses, arquitectura de la raíz	[412,413]
Tc01v2_g008170	5.49	8.41	Putative Transcription factor bHLH96	Morfogénesis, red regulatoria rpta.estrés abiotico mediada por JA	[414–416]
<b>Transportadores</b>					
Tc01v2_g031670	7.09	N/S	Protein cornichon homolog 4	Proteína transmembrana, cargo receptor, transporte mediado por vesículas	[417–419]
Tc07v2_g000280	6.15	6.18	Probable amino acid permease 7	Transporte y absorción de aminoácidos (aa) (prolina), tolerancia a salinidad	[420]
Tc09v2_g011110	5.15	8.43	Putative Early nodulin-like protein 1	Transporte nutrientes, aa, solutos, fitoreguladores; rpta. estrés osmótico	[421–424]
Tc09v2_g013360	N/S	7.3	WAT1-related protein At4g28040	Transporte transmembrana de aa y auxinas	[425,426]
Tc03v2_g005540	3.67	N/S	Probable aquaporin TIP3-2	Proteínas transmembrana del tonoplasto, transporte de agua, Tolerancia a sequía	[128,129,244,427–429]
<b>Rutas de señalización GA</b>					

Tc06v2_g016620	6.37	4.46	Protein MOTHER of FT and TFL1	Controla ruta de señalización ABA-GA; regulación negativa de señalización ABA	[188,430–432]
Tc08v2_g005270	N/S	7.27	12-oxophytodienoate reductase 2	Promueve síntesis de ABA, eliminación de ROS	[433]
<b>Metabolitos secundarios</b>					
Tc03v2_g023770	7.04	7.16	Beta-carotene 3-hydroxylase 1, chloroplastic	Síntesis de zeaxantina, tolerancia a alta luz, altas temperaturas	[434,435]
Tc01v2_g014460	6.17	N/S	UDP-glycosyltransferase 82A1	Biosíntesis de antocianinas, eliminación de ROS, tolerancia a estrés abiótico	[362]
Tc03v2_g023630	N/S	9.39	(-)-alpha-terpineol synthase	Terpenoide, señalización daño oxidativo, adaptación a sequía	[436–440]
<b>Senescencia</b>					
Tc09v2_g011920	6.48	7.7	Protein SRG1	Inducción en hojas senescentes, retículo endoplasmático, rpta. antioxidante	[441–443]
<b>Proteína Kinasa-señalización-receptor</b>					
Tc09v2_g029520	6.18	N/S	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13, putative	Fosforilación, transducción de señales, regulador crecimiento y desarrollo, tolerancia a sequía	[215,444–446]
Tc09v2_g024060	5.64	3.03	Putative Histidine-containing phosphotransfer protein 1	Regulación tolerancia a sequía y salinidad, señalización medida por citoquininas	[447,448]
Tc02v2_g028060	5.73	N/S	Putative Receptor-like protein kinase FERONIA	Expansión celular, nodo de señalización múltiples	[449–455]
Tc10v2_g001630	N/S	4.39	Receptor-like protein kinase FERONIA	fitoreguladores de crecimiento, inhibición elongación, metabolismo energético, rpta	
<b>Metalochaperona</b>					
Tc08v2_g009510	5.82	6.59	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 22	Transporte y equilibrio de metales pesados; detoxificación, tolerancia a cadmio; rpta. a frío y sequía; interacción planta-patógeno	[456–458]
<b>Antioxidante</b>					
Tc06v2_g008460	5.7	7.29	Inositol oxygenase 1	Biosíntesis de ácido ascórbico, protección daño oxidativo, mejora crecimiento, reduce pérdida de	[459,460]

				agua; rpta. a sequía y estrés oxidativo	
Tc05v2_g020470	5.25	11.09	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	Biosíntesis de melatonina, Tolerancia a sequía, eliminación de ROS, acumulación de prolina	[461,462]
Tc08v2_g003200	N/S	10.3	Putative Aldehyde oxidase GLOX1	Generación y regulación de ROS, defensa a hongos (mildeo)	[463,464]
Tc06v2_g015890	3.82	7.24	Polyphenol oxidase, chloroplastic	Eliminación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , mediación tolerancia a estrés	[27,48,465]
<b>Proteína de resistencia (R-protein)</b>					
Tc07v2_g003430	14.3	N/S	Putative Probable disease resistance protein At4g27220	Resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía, adaptación estrés abiótico	[466–469]
<b>Inducido por estrés-miscelaneo</b>					
Tc06v2_g008300	6.43	N/S	Oxidative stress 3, putative isoform 2	Tolerancia a metales pesados (cadmio), tolerancia a estrés oxidativo, control de la floración, resistencia a virus	[470–472]
Tc03v2_g022930	N/S	9.2	Thaumatococcus-like protein	Rpta. deshidratación, tolerancia estrés osmótico, adaptación bajo Ψ, acumulación de prolina, tolerancia estrés biótico	[473–478]
Tc04v2_g015520	4.99	8.49	Cannabidiolic acid synthase (CBDA synthase)	Biosíntesis de alcaloides, rpta. estrés, rpta. defensa, formación de biomasa, tolerancia a salinidad	[479–481]
Tc08v2_g000020	N/S	7.78	Probable carbohydrate esterase At4g34215	Resistencia a patógenos, rpta. a estrés abiótico, crecimiento, metabolismo secundario	[482–484]
Tc02v2_g029520	5.71	3.40	Cytochrome P450 704B1	Biosíntesis de compuestos de defensa, ácidos grasos y fitoreguladores de crecimiento, Tolerancia sequía y salinidad	[485–487]
<b>Defensa</b>					
Tc05v2_g012420	2.32	7.45	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase (BG1)	Metabolismo de carbohidratos, defensa a patógenos, rpta. estrés biótico y abiótico. Mediar conversión de ABA-GE a ABA	[75,488,489]

\*N/S: No significativo. Los valores positivos indican inducción.

**Tabla 6- 3 Propuesta de genes candidatos de tolerancia en la respuesta al DH de acuerdo con reportes de literatura y que están relacionados con los genes de la Tabla 6-2 en los mecanismos de respuesta a DH.** Se proponen como candidatos de tolerancia los genes inducidos significativamente en los dos clones o en uno de los dos.

Gen ID	Log2FC		Descripción
	TSH565	EET8	
<b>Relacionado con ABA</b>			
Tc09v2_g026720	3.79	N/S	Abscisic acid 8'-hydroxylase 2
Tc02v2_g004500	1.57	N/S	Putative Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic
Tc04v2_g010900	1.5	N/S	Protein ABA DEFICIENT 4, chloroplastic
Tc01v2_g028880	2.15	N/S	Abscisic acid receptor PYL9
Tc10v2_g004320	1.38	N/S	ABC transporter B family member 20
Tc06v2_g008110	1.64	2.13	ABC transporter G family member 36
Tc06v2_g014400	N/S	3.81	Putative ABC transporter C family member 3
Tc01v2_g008390	2.89	2.86	ABC transporter G family member 11
Tc08v2_g002910	2.25	N/S	Dehydration-responsive element-binding protein 2D (DREB2D)
Tc08v2_g015860	1.76	N/S	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.10
Tc04v2_g005660	1.92	N/S	Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.8
Tc04v2_g001240	N/S	2.5	NRT2.7
Tc09v2_g010760	N/S	1.92	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.2
Tc03v2_g022100	N/S	-1.92	Guard cell S-type anion channel (SLAC)
Tc09v2_g028570	1.55	N/S	SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-1
Tc03v2_g010520	1.12	N/S	SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1
Tc02v2_g007660	0.77	N/S	Serine/threonine-protein kinase SRK2E (SnRK2) (OST1)
Tc02v2_g007300	N/S	-0.44	Serine/threonine-protein kinase SRK2B
Tc01v2_g024780	N/S	1.29	Protein RALF-like 33
Tc05v2_g025930	-3.11	N/S	Protein RALF-like 33
Tc08v2_g002060	3.2	3.54	Respiratory burst oxidase homolog protein D
<b>Modificación de proteínas</b>			
Tc01v2_g033910	2.49	3.3	E3 ubiquitin-protein ligase ATL4
Tc01v2_g016680	1.59	2.47	Probable E3 ubiquitin-protein ligase XERICO
Tc10v2_g011740	1.11	0.92	E3 ubiquitin-protein ligase KEG
<b>Receptores RLKs</b>			
Tc09v2_g018390	1.77	N/S	Putative G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1
Tc06v2_g017330	2.22	0.91	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 26
Tc05v2_g022360	4.04	2.15	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL1
Tc09v2_g003060	1.01	0.56	Cysteine-rich RLK 34, putative isoform 1
<b>WAKs</b>			
Tc05v2_g006540	1.86	0.96	Putative Wall-associated receptor kinase-like 20

Tc04v2_g022700	4.61	3.88	Putative Wall-associated receptor kinase-like 8
Tc08v2_g001480	3.42	2.78	Wall-associated receptor kinase-like 14
Tc02v2_g028520	0.68	N/S	Wall-associated receptor kinase-like 8
Tc08v2_g011440	1.54	1.94	Putative Wall-associated receptor kinase 2
Tc04v2_g015340	N/S	-1.89	Putative wall-associated receptor kinase-like 11
<b>PERKs</b>			
Tc06v2_g007360	0.73	0.6	Proline-rich receptor-like protein kinase PERK2
Tc09v2_g009480	0.79	1.14	Proline-rich receptor-like protein kinase PERK2
Tc02v2_g031280	N/S	0.83	Putative Proline-rich receptor-like protein kinase PERK13
<b>AHKs</b>			
Tc02v2_g017440	0.97	N/S	Histidine kinase 3
Tc09v2_g000870	-2.42	-2.4	Histidine kinase 5
Tc01v2_g016100	N/S	1.16	Histidine kinase 2
<b>MAPK Kinases y Proteínas dependientes de calcio</b>			
Tc08v2_g001100	1.46	N/S	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5, putative isoform 1
Tc01v2_g029720	0.47	N/S	Mitogen-activated protein kinase homolog MMK2
Tc09v2_g007280	0.72	N/S	Mitogen-activated protein kinase kinase 2
Tc06v2_g001440	0.69	N/S	Mitogen-activated protein kinase kinase 4
Tc01v2_g011190	N/S	0.81	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
Tc04v2_g013100	N/S	0.58	Mitogen-activated protein kinase homolog MMK1
Tc04v2_g014970	3.04	3.54	Calcium-dependent protein kinase 24
Tc04v2_g012430	2.26	N/S	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 11
Tc09v2_g001460	2.23	1.66	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25
Tc10v2_g013630	1.43	N/S	CBL-interacting protein kinase 18
<b>Fotosíntesis</b>			
<b>PSII</b>			
Tc05v2_g025770	2.2	N/S	PsbP domain-containing protein 7, chloroplastic
Tc05v2_g010720	1.42	N/S	PsbP domain-containing protein 6, chloroplastic
Tc05v2_g027100	1.29	N/S	PsbP domain-containing protein 1, chloroplastic
Tc05v2_g023360	N/S	-2.26	Photosystem II reaction center W protein, chloroplastic
Tc04v2_g018910	N/S	-1.01	Photosystem II 11 kDa protein-related
Tc07v2_g012390	N/S	-1.4	Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic
<b>PSI</b>			
Tc02v2_g000920	N/S	-1.79	Photosystem I reaction center subunit psaK, chloroplastic
Tc06v2_g007470	N/S	-1.45	Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic (PsaH)
Tc06v2_g011150	N/S	-1.42	Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic (PsaF)
<b>Antenas cosechadoras de luz</b>			
Tc06v2_g012730	N/S	-3.1	Chlorophyll a-b binding protein 21, chloroplastic
Tc02v2_g011830	N/S	-1.74	Chlorophyll a-b binding protein CP24 10A, chloroplastic

<b>Transporte de e<sup>-</sup></b>			
Tc06v2_g007790	N/S	-0.82	Photosynthetic NDH subunit of subcomplex B 3, chloroplastic
Tc04v2_g021410	N/S	-1.28	Protein PROTON GRADIENT REGULATION 5, chloroplastic
Tc03v2_g022330	N/S	-0.90	PGR5-like protein 1A, chloroplastic
<b>Sistema antioxidante</b>			
Tc01v2_g000540	1.2	N/S	Catalaze isozyme 2
Tc09v2_g018080	1.58	1.7	Peroxidase 15
Tc09v2_g018110	N/S	5.27	Peroxidase 15
Tc09v2_g001090	2.01	2.37	Peroxidase 46
Tc10v2_g013550	2.5	5.94	Peroxidase 4
Tc01v2_g006100	N/S	1.45	Peroxidase 73
Tc01v2_g008350	N/S	1.04	Peroxidase 17
Tc08v2_g015120	N/S	1.06	Peroxidase 12
Tc09v2_g030330	2.01	5.41	Peroxidase 4
Tc08v2_g010840	N/S	1.09	L-ascorbate peroxidase T isoform 2
Tc05v2_g002430	N/S	1.8	Glutathione S-transferase U8
Tc09v2_g026200	1.92	1.34	Glutathione S-transferase U7
Tc04v2_g020880	0.72	1.16	Probable Glutathione S-transferase
Tc01v2_g024670	2.8	N/S	Putative Glutathione S-transferase
Tc03v2_g018170	N/S	1.2	Alcohol dehydrogenase-like 4
Tc08v2_g008710	-1.6	N/S	Alcohol dehydrogenase-like 5
Tc05v2_g018190	-1.5	-2.7	Putative Alcohol dehydrogenase-like 5
Tc06v2_g015890	3.8	7.2	Polyphenol oxidase, chloroplastic,
Tc06v2_g015940	1.07	0.8	Polyphenol oxidase, chloroplastic,
Tc10v2_g014220	-0.5	N/S	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
Tc05v2_g020780	N/S	-0.6	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2
Tc05v2_g001000	-1.73	N/S	Pyruvate decarboxylase 1
Tc04v2_g002120	N/S	4.96	17.5 kDa class I heat shock protein
Tc03v2_g023820	4.66	N/S	Heat shock protein 83
Tc05v2_g002350	-2.27	-3.23	17.3 kDa class I heat shock protein
Tc04v2_g019080	N/S	-0.87	17.6 kDa class II heat shock protein
Tc06v2_g001750	4.82	N/S	22.7 kDa class IV heat shock protein
<b>Proteínas LEA</b>			
Tc04v2_g019000	2.67	2.09	Late embryogenesis abundant protein D-34
Tc04v2_g023610	1.11	1.18	Late embryogenesis abundant protein Lea5-D
Tc07v2_g000600	1.93	N/S	Late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein family, putative
Tc04v2_g025800	1.7	N/S	Late embryogenesis abundant protein D-29
Tc04v2_g022040	N/S	1.92	Putative Late embryogenesis abundant protein Dc3

<b>Osmoprotección</b>			
Tc05v2_g002790	1.73	3.29	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)
Tc02v2_g029680	2.54	N/S	Putative Protein HOTHEAD (biosíntesis Glicina-betaina)
Tc03v2_g000180	N/S	0.77	Betaine aldehyde dehydrogenase 1, chloroplastic
Tc01v2_g008970	N/S	1.83	Probable trehalose-phosphate phosphatase J
Tc02v2_g021440	2.49	N/S	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 9
Tc09v2_g013840	3.02	2.37	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 11
Tc06v2_g013560	1.16	N/S	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 7
<b>Bosíntesis de asparagina</b>			
Tc09v2_g024970	4.99	3.76	Asparagine synthetase (glutamine hydrolyzing)1
Tc03v2_g016250	1.37	1.75	Glutamate synthase [NADH], amyloplastic
Tc01v2_g013010	1.17	1.73	Aspartate aminotransferase, mitochondrial
Tc08v2_g006680	1.32	N/S	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]
<b>Acuaporinas</b>			
Tc02v2_g004580	N/S	-2.67	Probable aquaporin PIP2-8
Tc05v2_g011200	-0.45	-0.76	Probable aquaporin SIP2-1
Tc05v2_g001730	-2.31	-2.83	Probable aquaporin PIP1-4
Tc06v2_g003200	N/S	-2.81	Aquaporin NIP6-1
Tc09v2_g028700	-1.16	-0.79	Probable aquaporin PIP2-2
Tc10v2_g006030	N/S	0.74	Aquaporin PIP2-1
Tc01v2_g030070	-1.72	N/S	Aquaporin PIP1-2
Tc05v2_g005230	-1	N/S	Aquaporin PIP2-2
Tc02v2_g005410	-5.1	N/S	Putative Probable aquaporin PIP1-2
Tc03v2_g017710	-2.13	N/S	Probable aquaporin NIP5-1
Tc05v2_g006060	-0.94	N/S	Aquaporin TIP1-1
Tc10v2_g012390	-0.66	N/S	Aquaporin SIP1-1
Tc10v2_g004290	-3.24	N/S	Aquaporin TIP1-3

\*N/S: No significativo. Los valores positivos indican inducción y los valores negativos represión. L

## 6.5 Discusión

### Respuesta de *T.cacao* al estrés por déficit hídrico.

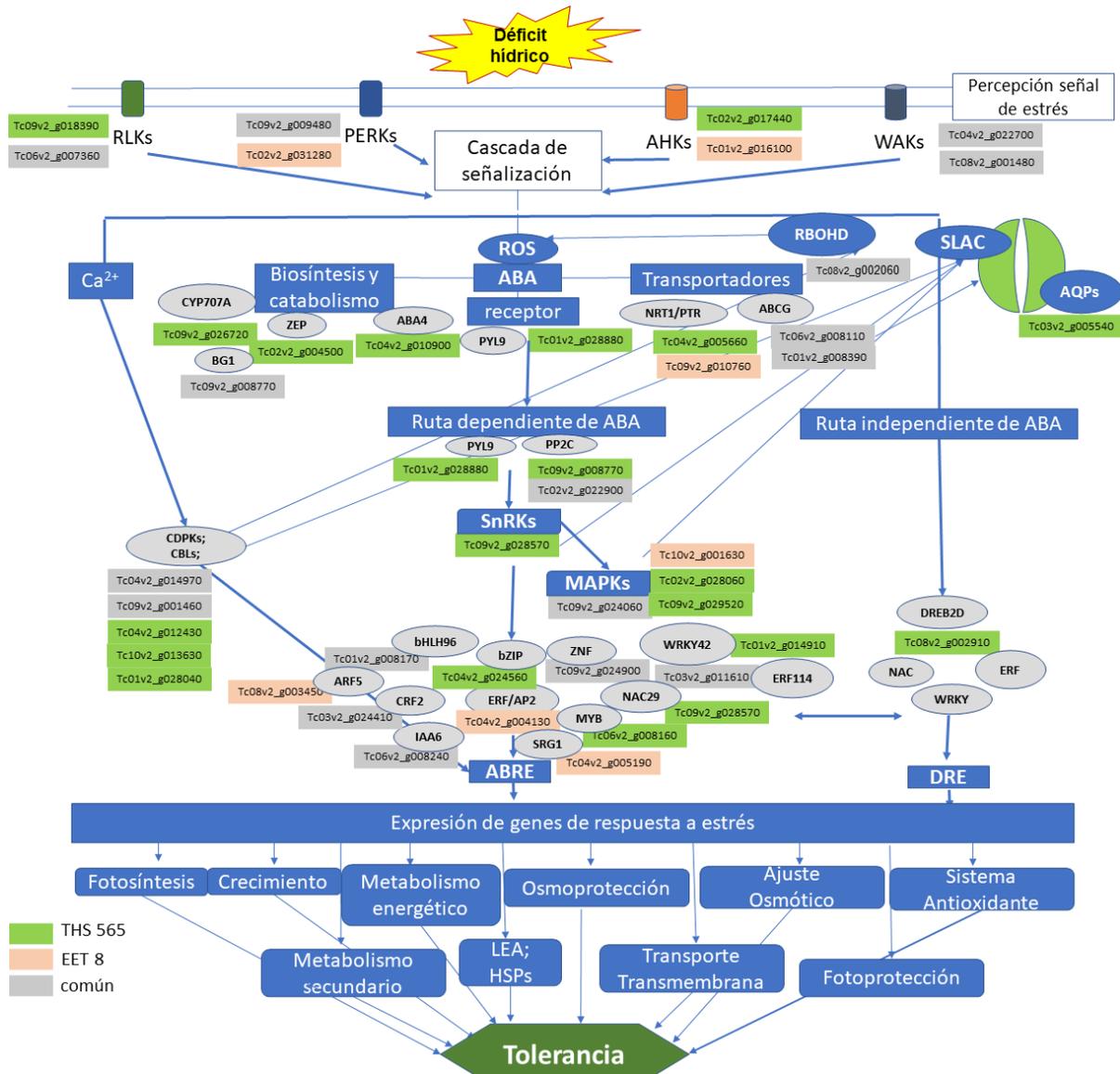
El primer paso en la cascada de señalización para responder al estrés es la percepción del estímulo estresante, la señal percibida es amplificada y transmitida para desencadenar una respuesta. Así por ejemplo, cuando se producen cambios en el potencial osmótico del suelo debido a la reducción del contenido de agua en el mismo, los osmosensores y sensores hidráulicos localizados en la membrana plasmática de las células perciben este estímulo y la señal es transducida conllevando a la generación de segundos mensajeros (ROS,  $\text{Ca}^{2+}$ , nucleótidos cíclicos, inositol fosfatos) que desencadenan una cascada de fosforilación y desfosforilación de proteínas para la activación de factores de transcripción de genes de respuesta a estrés cuyos productos son responsables de los mecanismos que permiten a las plantas tolerar o aclimatarse a esta condición [75,81]. Las funciones asociadas a los genes con expresión diferencial en los clones TSH 565 y EET 8 estuvieron distribuidas a lo largo de todas las diferentes etapas que constituyen la respuesta de aclimatación de las plantas al déficit hídrico. Lo anterior permite poder reconstruir un primer modelo de cómo se establece esta respuesta en cacao, resaltando tanto las vías o mecanismos comunes, como las particularidades identificadas en cada clon evaluado (Figura 6-19).

### Implicación del ABA en la respuesta de *T.cacao* al DH

Con un rol central en la respuesta a estrés, el ácido abscísico (ABA) un fitorregulador del crecimiento y desarrollo vegetal es considerado como el fitorregulador del estrés, pues es producido en condiciones de sequía y es responsable de desencadenar una respuesta rápida (cierre estomático) y una lenta (ruta de señalización dependiente de ABA) al déficit hídrico [168]. Ambas respuestas están reguladas por múltiples fuentes de ABA (tejido vascular de raíz y hojas, células guarda) y transportadores para garantizar su distribución a través de la planta, así como, los niveles requeridos para desencadenar la respuesta de tolerancia al DH [79]. La biosíntesis *de novo* del ABA a partir del carotenoide zeaxantina, es el principal mecanismo relacionado con la acumulación de esta molécula durante el DH, no obstante, otros mecanismos como su catabolismo a ácido faseico y luego a ácido dihidroxifaseico, el recambio de ABA como formas conjugadas (ABA-GE) y el transporte entre órganos, también están implicados en la reserva de ABA [490]. Así, una de las primeras respuestas observadas tras la percepción del déficit hídrico es la acumulación de ABA, cuyo movimiento y por lo tanto su transporte se incrementa por la deshidratación.

Los perfiles transcriptómicos permitieron evidenciar la inducción de algunos genes involucrados en la biosíntesis, catabolismo, conversión, señalización y transporte de este fitorregulador (Tabla 6-2 y 6-3). Los genes ZEP (zeaxantina epoxidasa), CYP707A2 (Abscisic acid 8'-hydroxylase 2), y el ABA4 (Protein ABA DEFICIENT 4, chloroplastic) involucrados en la síntesis y catabolismo del ABA se encontraron inducidos solo en el clon TSH 565 al igual que el receptor intracelular de ABA, PYL9 (Tc01v2\_g028880) involucrado en la activación de la cascada de señalización mediada por este fitoregulador

de crecimiento, confirmando la intermediación de este fitoregulador en la cascada de señalización y transducción de señales para la activación de genes de respuesta a estrés en este clon, lo que se ha observado en genotipos tolerantes al DH [173].



**Figura 6- 19 Representación esquemática de la señalización dependiente e independiente de ABA durante la respuesta a estrés por déficit hídrico en cacao.** Los recuadros verdes, gris y rosa contienen el gen ID de cacao, los óvalos indican el nombre del gen.

Además, el gen codificante de la BCH (Beta-carotene 3-hydroxylase 1, chloroplastic), se encontró inducido en los dos clones (Tabla 6-2). Se considera que la BCH también está implicada en la síntesis de zeaxantina, que además hace parte del ciclo de las xantofilas relacionado con la protección de la membrana tilacoidal y la disipación del exceso de la energía lumínica absorbida durante la fotosíntesis, en forma de calor [122,434]. La sobre expresión de este gen en arroz fue asociada con un incremento de la tolerancia de las

plantas al estrés como consecuencia del incremento en la actividad del ciclo de las xantofilas y los mecanismos de respuesta mediados por el ABA [434]. Igualmente, en *Arabidopsis* se hace referencia a la posibilidad de mejorar la tolerancia de los cultivos al estrés mediante la manipulación genética de esta enzima [435]. Es interesante que este gen se encontrara altamente inducido en los dos clones puesto que en uno de ellos (TSH565) no se observó alteración en la maquinaria fotosintética y en el otro (EET8), a pesar de la afectación en los fotosistemas observada, logró sobrevivir al periodo de estrés y recuperarse. Al parecer la respuesta de los dos clones al DH se relaciona con la activación de diversos mecanismos de protección contra los efectos deletéreos del déficit hídrico.

Tal como se mencionó anteriormente, bajo DH los niveles endógenos de ABA se incrementan principalmente mediante la síntesis *de novo* de esta molécula en las hojas y el transporte desde la raíz, no obstante, el contenido de ABA también se regula a través de su catabolismo que se da mediante dos vías la hidroxilación o ruta oxidativa y la conjugación [491,492]. En la primera el ABA es hidroxilado en la posición C8' por monoxigenasas de la familia CYP707A (ABA 8' hidroxilasas) para generar 8'-OH-ABA que es isomerizado a ácido faseico, una forma inactiva de ABA. En la segunda vía el ABA es conjugado con glucosa para formar ABA glucosil éster (ABA-GE), una forma de almacenamiento y transporte de ABA en una reacción mediada por una glicosiltransferasa. Esta reacción es reversible, por lo que la hidrólisis del ABA-GE mediada por una  $\beta$ -glicosidasa localizada en el RE resulta en la liberación del ABA. Lee et al., (2006) [492] demostraron que la ruptura del ABA-GE se da por intermediación de la glicosidasa AtBG1 como una forma de producir ABA activo para ajustar rápidamente los niveles de esta molécula en respuesta a la deshidratación. Además, se propone que el ABA-GE tiene un papel fundamental en la homeostasis de ABA permitiendo su almacenamiento cuando los niveles en tejido son elevados [490]. El gen Tc05v2\_g012420 (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase) el cual es ortólogo de los genes de *Arabidopsis* BG1 y BG2 implicados en la hidrólisis del ABA-GE se encontró altamente inducido en los dos clones, aunque en mayor proporción en EET 8 ( $\log_2FC=7.5$  vs 2.32 en TSH565), mientras que, en el clon TSH 565 se observó la inducción del gen CYP707A2 (Abscisic acid 8'-hydroxylase 2), pudiendo provocar, un aumento rápido de los niveles de ABA en los clones en respuesta al estrés [75].

En relación con el transporte del ABA a los órganos blancos una vez sintetizado, se encontraron inducidos en los dos clones los genes ABCG11 y 36 (Tabla 6-2) pertenecientes a la familia de transportadores ATP-binding cassette family G involucrada en el cierre estomático y la sensibilidad a ABA en *Arabidopsis* [79]. Estos genes son homólogos del gen AtABCG25, codificante de un transportador importador de ABA. Además se encontraron varios genes de la familia NRT1/ PTR, involucrados con la misma función [75,79,173].

## Cierre estomático mediado por ABA

En la vía de señalización rápida de respuesta al DH, los niveles de ABA en las células guarda se incrementan, activando los canales de aniones en estas células, ya sea de forma dependiente o independiente de calcio. Otros mecanismos de señalización que involucran moléculas como las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  también se activan, y en conjunto con la proteína quinasa independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  OST1 (open stomata 1) o SnRK2 (Serine/threonine-protein kinase SRK2E), al igual que mediante las proteínas quinasas dependientes de calcio de la familia CPK, activan el canal de aniones SLAC1 (estimulando su fosforilación por OST1), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y los canales de eflujo de  $\text{K}^+$ , mientras que, los canales de influjo de  $\text{K}^+$  (KAT1) y la bomba de  $\text{H}^+$  son inhibidos. Este eflujo de iones y agua de las células guarda conduce a la pérdida de turgencia que impulsa el cierre estomático [167].

En relación con los genes implicados en el cierre estomático como el canal de aniones de tipo lento SLAC (S-type anion channel), se encontró que en el clon EET 8 el SLAC1 (Tc03v2\_g022100) estaba reprimido ( $\log_2\text{FC}$  de -1.92). Además, tres genes codificantes de proteínas fosfatasa de tipo PP2C se encontraron inducidos en TSH565 y uno de ellos en EET8, así como el gen SRK2E se encontró inducido en TSH565 y el SRK2B se encontró reprimido en EET 8. El modelo de la apertura y cierre estomático descrito por Hauser et al., (2017) [167] se menciona que en la ausencia de ABA o a niveles basales de esta molécula el gen PP2C (activo) inhibe el SLAC1 y el SnRK2 impidiendo el eflujo de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de las células guarda y permitiendo el influjo de  $\text{K}^+$ , condición bajo la cual el estoma estaría abierto. Mientras que en condición de sequía el incremento en los niveles de ABA inhibe el gen PP2C y el SRK2 fosforila el SLAC1 ocasionando la salida de aniones de las células guarda y la pérdida de turgencia, lo que provoca el cierre estomático. Es interesante que los patrones de inducción y represión de los genes relacionados con este mecanismo en EET 8 parecieran sugerir un posible menor cierre estomático, que estaría en concordancia con los valores más altos de gs observados en este clon y la mayor pérdida de agua con la consecuente reducción en el potencial hídrico, y el %CRA observados a nivel fisiológico. Es interesante que este clon es procedente de Ecuador, en los cuales se han encontrado mayores valores gs en relación con los observados en otros grupos genéticos en *T.cacao* [39,117].

En la respuesta del cierre estomático también se han referenciado la implicación de las explosiones localizadas de ROS que actúan como moléculas señalizadoras que regulan diversos procesos como el crecimiento, el desarrollo y las respuestas a estrés en las plantas. En *Arabidopsis* la familia de estas proteínas tiene 10 miembros (A-J) de los cuales las RBOHD y RBOHF están implicadas en la producción de ROS en respuesta a diversos estreses abióticos en hojas y raíces. En las células guarda, son activadas por el ABA para crear una explosión de ROS que conlleva al cierre estomático en respuesta a DH [493]. El gen de la RBOHD (Tc08v2\_g002060) se encontró inducido en igual proporción en los dos clones (Tabla 6-2). Estos resultados sugieren que en *T.cacao* esta proteína podría relacionada con la señalización dependiente del ABA para la producción de ROS y, posiblemente desencadenar el cierre estomático [493,494].

## Señalización dependiente e independiente de ABA

En la vía de señalización lenta se involucra la activación de factores de transcripción dependientes de ABA de tipo AREB, así como FT independientes de este fitorregulador de crecimiento (DREB) para la expresión de genes relacionados con la tolerancia a sequía [75,168].

Las proteínas quinasas y fosfatasa cumplen un papel fundamental en el proceso de percepción y transducción de señales, encontrándose varios genes codificantes de éstas inducidos en los dos clones de cacao (Tabla 6-2): quinasas semejantes a receptores (RLKs), implicadas en percibir señales hidráulicas, proteínas quinasas asociadas a la pared (WAKs) las cuales intervienen en el equilibrio celular del agua, regulando la extensión celular, así como las quinasas de tipo *proline-rich extension-like receptor kinases* (PERKs), a las cuales se les atribuye la función de percibir la integridad de la pared celular, y las histidinas quinasas (AHKs), involucradas en la percepción del turgor celular [75,495]. En ambos clones se observó la inducción de genes compartidos codificantes de las proteínas quinasas de tipo RLKs y WAKs, mientras que el caso de las AHKs un gen se indujo en EET8 y otro en TSH 565. El hecho de que diversos genes codificantes de receptores de tipo RLKs y WAKs se hayan encontrado inducidos en los dos clones podría sugerir su importancia en la percepción y establecimiento de la respuesta al estrés por déficit hídrico en *T. cacao*. No obstante, la represión observada de algunos de estos genes en respuesta al estrés (Tabla 6-2), ha sido asociada tanto a la redundancia funcional existente como posible estrategia adaptativa en la búsqueda de una optimización entre percepción y eficiencia en la respuesta transducida, y a su vez, fruto de la complejidad de la red de señalización y su necesaria articulación con diversos elementos para lograr esta aclimatación [82].

Seguidamente, en este modelo de señalización y transducción de señales, se encontró un gen que codifica una histidina fosfotransferasa (HP) (Tc09v2\_g024060) inducido por DH en los dos clones (Tabla 6-2). Las HPs juegan un papel clave en los sistemas de señalización de dos componentes con los que se asocian, transfiriendo la señal de fosforilación recibida por parte de las histidinas quinasas (HKs) a los reguladores de la respuesta [447]. El gen encontrado aquí es ortólogo del gen de arroz (OsAHP1), el cual se ha reportado que funciona como un regulador positivo de la ruta de señalización por citoquininas con diferentes roles en la tolerancia a estrés por salinidad y sequía [448].

Igualmente, en los clones EET8 y TSH565 se encontraron altamente inducidos, dos genes que codifican el receptor quinasa FERONIA (Tc10v2\_g001630 en EET8 y Tc02v2\_g028060 en TSH565) (Tabla 6-2). FER desempeña un rol fundamental en el control del crecimiento vegetativo de las plantas a través de su interacción con el péptido del factor de alcalinización rápida (RALF) del cual se relaciona su expresión en diferentes tipos de células, con la función central de inhibir el crecimiento celular [452,496]. RALF induce un rápido incremento en el  $C^{2+}$  citosólico como una señal de activación de FER. FER también funciona como un nodo que media la interacción entre diferentes redes de señalización integrando rutas reguladoras cuyo blanco es la expansión celular, el metabolismo energético y la respuesta a estrés, por lo que se considera como un

regulador versátil que controla el crecimiento celular de formas diferentes y en distintos tipos de células en respuesta a señales ambientales [452,454]. Se ha propuesto un mecanismo de activación de FER por el ABA y una interacción entre este fitoregulador de crecimiento y RALF para controlar el crecimiento de las plantas y las señales de respuesta a estrés [455]. Es interesante que FER se haya encontrado inducido en los dos clones, y a su vez, que RALF se encontrara inducido en EET8 (Tc01v2\_g024780) y reprimido en TSH565 (Tc05v2\_g025930), por lo que queda el interrogante de si la interacción entre FER y RALF (ambos inducidos) en el clon EET8 pudiera haber tenido influencia en la reducción del crecimiento observada en este clon, mientras que, en el clon TSH565, el hecho de que FER se encontrara inducido y RALF reprimido hubiera permitido que este clon redireccionara el metabolismo energético hacia el crecimiento bajo la condición de déficit hídrico, pues este clon logró maximizar la absorción de agua y mantener el turgor celular, un clásico mecanismo que permite incrementar el uso eficiente de agua [455]. Debido a las diferentes funciones atribuidas a FER en la respuesta a estrés y los importantes procesos regulados, este gen podría proponerse como un candidato de tolerancia al DH en *T.cacao*.

Dentro de la vía de transducción de señales, las cascadas de proteínas MAPK son activadas de forma secuencial mediante la fosforilación de al menos 3 proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKKK, MAPKK, MAPK). Los estudios previos realizados en esta vía de señalización indican que la misma actúa como un eje regulador central para el desarrollo de la planta y la respuesta a varios tipos de estrés [215]. En este estudio, un gen que codifica una proteína quinasa que interviene en el primer paso de esta cascada de transducción de señales, la MAPKKK13 (Tc09v2\_g029520), se encontró altamente inducido sólo en el clon TSH565 (Tabla 6-2). Este gen es ortólogo del gen de *Arabidopsis thaliana* MAPKKK14 el cual juega un importante rol en la ruta de señalización mediada por ABA [497]. Investigaciones llevadas a cabo en especies como arroz, maíz, algodón, yuca, pepino y tomate también han evidenciado la inducción de estas proteínas quinasas en respuesta a estrés, por lo que proponen que los genes que intervienen en las cascadas MAPK son importantes candidatos para el mejoramiento de la tolerancia de los cultivos a diversos tipos de estrés, entre los cuales se encuentra el estrés por sequía [444–446,498–500].

De la misma forma, en esta compleja respuesta al estrés, el transporte a través de endomembranas (*endomembrane trafficking*), se ha vinculado a las vías de señalización debido a la necesidad de satisfacer los cambios que se dan en los procesos celulares de tráfico intracelular, maduración o secreción, y asegurar la entrega correcta de las moléculas de carga implicadas en dicha respuesta [184]. En el clon TSH565 el gen CNIH4 (protein cornichon homolog 4) mostró una alta inducción bajo DH (Tabla 6-2). Este gen codifica un receptor de carga que pertenece a una familia conservada de proteínas que participan en la selección de las proteínas integrales de membrana como carga para su correcta localización [417,419]. En *Arabidopsis* son esenciales para la clasificación, el transporte y la localización de los canales de receptores de glutamato (GLRs) implicados en el transporte de  $Ca^{2+}$  bajo diversos escenarios [418]. Mientras que en arroz, una de estas proteína cornichon (OsCNIH1) localizada en las membranas del retículo

endoplasmático y el aparato de Golgi, interactúa con un transportador de sodio para su correcta localización en la membrana del aparato de Golgi [185]. Cabe resaltar que, dentro de las principales diferencias entre clones, quedó manifiesto el transporte transmembranal. Considerando que la inducción en la expresión de este gen se dio solo en el clon TSH565, sería interesante dilucidar su rol a través de la interacción de este y las proteínas que transporta, durante la respuesta de tolerancia de *T. cacao* al DH.

### **Factores de Transcripción implicados en la respuesta al DH en *T.cacao***

En relación con otros genes situados corriente abajo en la vía de transducción implicados en las rutas de respuesta al DH dependientes e independientes de ABA se encuentran los factores de transcripción y demás genes reguladores de la respuesta a estrés, al igual que los genes efectores [75,76,378]. Los factores de transcripción (FT) son considerados como los reguladores máster de la expresión génica [76,187], debido a que son los responsables de la activación de los genes efectores que terminan mediando la respuesta al estrés. Algunos FT se encontraron dentro del grupo de genes con mayor inducción en respuesta al DH, dos de ellos el STOP1 (Tc09v2\_g024900) y el bHLH96 (Tc01v2\_g008170) fueron inducidos en los dos clones, mientras que el bZIP53 (Tc04v2\_g024560) solo se encontró inducido en el clon TSH565. A STOP1, se le atribuye la regulación de la tolerancia a múltiples tipos de estrés porque puede ser activado por diversos estímulos estresantes y regular varios tipos de genes implicados en la activación de diferentes mecanismos que conducen a la tolerancia a estos variados tipos de estrés, por lo que se considera como un FT central (hub) en la respuesta a múltiples estreses abióticos [412]. Dentro de los estreses a los cuales se les ha atribuido un rol en la tolerancia están la sequía, los bajos niveles de oxígeno, y la toxicidad por metales pesados [412,413,501–503].

Por otra parte, la familia de FT bHLH es extensa y está involucrada en la morfogénesis de las plantas y las respuestas, tanto a estímulos bióticos, como abióticos. Además se reporta que tienen un rol importante en la red reguladora mediada por el ácido jasmónico en la respuesta a estrés abiótico [414–416], pudiendo ser un regulador positivo del entrecruzamiento de respuestas a estrés abiótico y biótico. Igualmente, múltiples FTs de este tipo son sustratos de las quinasas de respuesta a ABA (AKs) e implicados en el control de la apertura estomática mediante la regulación de los genes de canales de potasio (KAT1). Se ha encontrado que la quinasa activada por el ABA SNRK2 (SNF1-related protein kinase 2s) fosforila a las AKs reprimiendo su actividad, lo que promueve el cierre estomático [75]. Por ejemplo, en maíz un miembro de esta familia confiere tolerancia a sequía mediante la promoción del crecimiento de la raíz y la síntesis de ABA [415]. La alta inducción de este gen observada en DH deja el interrogante sobre la(s) función(es) que están desempeñando en la respuesta de *T.cacao* al déficit hídrico y si está relacionada con los niveles de tolerancia observados en los clones.

Igualmente, en el clon TSH565 el FT bZIP53 (Tabla 6-3), altamente inducido por el DH, se ha reportado como involucrado en la transducción de señales relacionadas con la condición de baja energía que conduce a la reprogramación metabólica en respuesta a la inanición. Se considera que el estrés ambiental que ocasiona un bajo estado energético

en la célula interfiere con el metabolismo primario, contribuyendo en la red de señalización de la inanición [504]. En *Arabidopsis* la sobreexpresión de este FT, incrementó los niveles de transcritos de genes claves en la ruta de biosíntesis de la asparagina (Asn) como: asparagina sintasa (ASN1), glutamato sintasa (GLNS), aspartato aminotransferasa (ASP) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PepCK), revisados aquí (Tabla 6-2). Además, se ha encontrado que este gen es blanco de fosforilación de la proteína quinasa SnRK1-like kinases (SNF1- related protein kinases 1) cuya función es regular el balance de energía que es fundamental para sobrevivir al estrés [408]. Es interesante que todos los genes mencionados anteriormente se encontraron inducidos en el clon TSH565, en el cual, según el análisis funcional de los genes reprimidos, demostró la afectación en el metabolismo energético producto del DH. Queda el interrogante si en el clon TSH565 la inducción de este factor de transcripción y los demás genes descritos en esta ruta de respuesta cumplieron la función de lograr el balance de energía que repercutió en la sobrevivencia y tolerancia de este clon a DH.

Los factores de transcripción DREB/CBF son una subfamilia de la familia de factores de transcripción AP2/ERF que regula la expresión de genes de respuesta a sequía independientemente del ABA. En *Arabidopsis* se identificaron dos grupos DREB1 y DREB2, al primero se le atribuye la tolerancia a sequía, salinidad y congelamiento, en especies como arroz, papa, sorgo, tabaco y tomate [85,192], mientras que el DREB2 se ha relacionado con la respuesta a estrés osmótico y la tolerancia a la desecación [86,197,198]. En el clon TSH 565 se observó la inducción de un gen de este tipo, el DREB2D (Tc08v2\_g002910) (Tabla 6-2). Hay poca información sobre las funciones específicas de este FT en la respuesta al estrés abiótico, no obstante una investigación reciente en *A. thaliana* lo propone como un regulador novel de la tolerancia a la desecación en semillas [505], una en sésamo lo propone como un regulador clave en la respuesta a sequía [506] y una en melón lo relaciona con el mejoramiento de la tolerancia al déficit hídrico severo [507]. Considerando estas investigaciones y que los reportes de los FT de este tipo (DREB2) se han relacionado con la respuesta al déficit hídrico y tolerancia, sería posible proponer que este FT estuviese implicado en la respuesta de tolerancia al DH del con TSH 565.

Además, en el clon EET 8 se encontraron inducidos diferentes factores de transcripción (Tabla 6-1) de tipo NAC, WRKY, MYB, ERF/AP2, SRG1, CRF2, bHLH, Zinc finger\_C2H2, ARF5, IAA6, ERF114 que están implicados en la regulación de la expresión génica de diversos genes de respuesta a estrés por déficit hídrico en la ruta dependiente e independiente del ABA [75,187]. De acuerdo con esto, la expresión de los diferentes genes activados por este clon para desplegar una respuesta de Tolerancia al DH involucró la regulación de diversos factores de transcripción.

## Regulación epigenética de la expresión génica en *T.cacao*

En la respuesta de las plantas al estrés la regulación de la expresión génica también es orquestada por diferentes procesos epigenéticos que involucran principalmente la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, el remodelamiento de la cromatina, y la regulación mediada por los ncRNA (ARN no codificantes). La metilación del ADN regula la estructura de la cromatina, la estabilidad del ADN y los cambios en la expresión génica sin que ocurran cambios en la secuencia de ADN, se ha encontrado que por lo general la metilación en la región promotora reprime la expresión génica, mientras que a lo largo del gen está asociada con una expresión activa [508]. En trigo sometido a condiciones de déficit hídrico se observó un mayor grado de metilación del ADN en el genotipo tolerante lo que se asoció a una respuesta más rápida al DH [509]. Las acetilación y metilación de las histonas son consideradas marcadores epigenéticos de la expresión génica pues tienen una correlación positiva con la activación transcripcional al igual que otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la ubiquitinación. Las enzimas acetiltransferasas (HATs), metiltransferasas, quinasas y ubiquitininas catalizan estas modificaciones, mientras que enzimas como las deacetilasas (DHATs), fosfatasa, demetilasas y deubiquitininas remueven dichas modificaciones [510]. La acetilación de las histonas incrementa el acceso al ADN debido a la neutralización de las cargas básicas de estas proteínas, mientras que la metilación de éstas altera su asociación con otras proteínas con la consecuente modificación en la estructura de la cromatina que resulta en la activación o represión transcripcional. En *Arabidopsis* la tecnología CRISPR/Cas fue empleada para generar plantas transgénicas que expresaran la quimera dCas-HAT y promover la activación de la expresión del FT At-AREB1 mejorando la tolerancia a sequía [511].

Dentro de los genes inducidos en los dos clones, se encontraron 63 relacionados con la regulación de la expresión génica a nivel epigenético (Figura 6-8 y 6-9). Las funciones descritas se asociaron principalmente con la acetilación de las histonas, la actividad metiltransferasa, la metilación y demetilación del ADN, el remodelamiento de la cromatina, y la producción de miRNA involucrados en el silenciamiento génico. Es evidente que la reprogramación y regulación de los genes de respuesta al DH en los clones *T.cacao* implicó diversos elementos y procesos epigenéticos descritos por su importancia en la respuesta de tolerancia de las plantas a diversos estreses ambientales, lo que pudo estar relacionado con la capacidad de los clones de responder y sobrevivir al DH impuesto.

Además, en el clon TSH 565 se observó la inducción ( $\log_2FC$  de 4.2) altamente significativa ( $1.9e^{-12}$ ) del gen Tc07v2\_g010780 (Figura 6-6 A) que corresponde a un ARN no codificante largo (LncRNA). A pesar de que los LncRNA tienen un papel fundamental en la regulación biológica de diversos procesos de desarrollo y en la respuesta a estrés biótico y abiótico de las plantas [512], en las cuales varios genes de este tipo han sido identificados, el mecanismo molecular implicado en la respuesta y adaptación al estrés abiótico permanece desconocido [513,514]. No obstante, algunos LncRNA han sido reportados como diferencialmente expresados en diferentes especies y tejidos bajo distintas condiciones de estrés y se considera que actúan mediante la modulación de la

cromatina, la modulación de la transcripción antisentido y la regulación directa de los genes de respuesta a estrés entre otros [514–517]. En *Arabidopsis* se relacionó un lncRNA (*DROUGHT INDUCED LncRNA - DRIR*) con la regulación positiva de la respuesta al estrés por déficit hídrico y al estrés salino cuya sobreexpresión en plantas transgénicas incrementó la tolerancia a estos tipos de estrés [513]. De acuerdo con la literatura es posible que este gen estuviera implicado en la respuesta observada en este clon, lo que sería interesante confirmar en ensayos funcionales posteriores.

### **Genes efectores y reguladores implicados en la respuesta de *T.cacao* al DH**

Entre las múltiples proteínas efectoras en la respuesta a estrés por déficit hídrico, el rol de las acuaporinas es, sin lugar a duda, crucial en la respuesta de las plantas a este tipo de estrés. Las acuaporinas son proteínas transmembranales que facilitan el flujo bidireccional de agua y otros sustratos a través de las membranas celulares [123]. Se dividen en 5 subfamilias de acuerdo con su secuencia y localización celular. Las TIPs (proteínas intrínsecas del tonoplasto) y las PIPs (Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática) tienen como principal sustrato el agua. Las TIPs y PIPs forman canales en la membrana de la vacuola y la membrana plasmática respectivamente, funcionando como reguladores del flujo intracelular de agua por lo que cumplen un rol relevante en la regulación del turgor celular [128].

Se evidenció que, en ambos clones, la mayoría de los genes codificantes de acuaporinas presentaron represión transcripcional, sin embargo, en el clon TSH565, el gen TIP3-2 (Tc03v2\_g005540), codificante de una acuaporina tonoplástica, se encontró inducido (Log2FC de 3.67) (Tabla 6-3). Estas diferencias en el comportamiento de la expresión de las acuaporinas en respuesta a estrés por DH ha sido ampliamente reportada en hojas de diversas especies de plantas, encontrándose mayoritariamente un patrón de represión de los respectivos genes, como un mecanismo para reducir el movimiento intracelular de agua y posibles pérdida de turgor en estos órganos fotosintéticos [129]. No obstante, también se ha observado patrones de inducción de miembros de estas acuaporinas en respuesta al estrés. Incluso, la sobreexpresión empleando ingeniería genética de una acuaporina de este tipo (TIP) en tomate, resultó en un aumento de la tolerancia a sequía, confiriéndole una mayor habilidad a las plantas para regular su tasa de transpiración bajo condiciones de DH [128,518]. Así, se ha reportado gran diversidad de respuestas bajo condiciones de estrés abiótico, probablemente relacionadas con la particularidad de estas proteínas de transportar otros sustratos diferentes al agua y que cumplen papel tanto de equilibrio osmótico como de señalización, por lo que se considera que estas proteínas actúan conjuntamente para concentrar el agua en donde más se requiere incrementando su transporte en esa zona, mientras se disminuye en otras células o tejidos [519], dificultando el poder discernir la verdadera contribución individual de cada una de ellas y su mecanismo experimentalmente.

En el caso del clon EET8 la PIP2-1 (Tc10v2\_g006030) se encontró levemente inducida (Log2FC de 0.74) mientras que otros genes pertenecientes a las subfamilias NIP (proteínas intrínsecas del tipo nodulin-26), PIP y SIP (proteínas intrínsecas básicas

pequeñas) se encontraron reprimidos (Tabla 6-3). Es muy interesante que la menor reducción en el  $\Psi$ , así como del contenido relativo de agua (%CRA) luego de 52D de DH, se observara en el clon TSH 565 y que además este clon presentara un incremento en el uso eficiente de agua mientras que el clon EET8 mostró en total concordancia, la mayor reducción en el %CRA y el  $\Psi$ . Es de resaltar esta diferencia en la expresión de los genes de las acuaporinas entre clones, pues concuerda con la divergencia observada a nivel fisiológico en el mantenimiento del turgor celular en los clones y el uso eficiente del agua, lo que podría estar correlacionado con un mecanismo de regulación de la conductividad hidráulica para el incremento o disminución del flujo del agua desde la raíz a las hojas en respuesta al DH [173,519,520].

Por otra parte, dentro de los genes efectores con mayor cambio en su expresión en respuesta al DH (Tabla 6-2), se encontró altamente inducido (Log2FC de 9.2) el gen TPL (Thaumatococcus-like protein) en el clon EET8. Las taumatinas son proteínas de la familia PR5 (Pathogenesis-related 5) y están asociadas a respuestas ante estrés biótico, osmótico y sequía [473]. También se les conoce como OPL (Osmotin-like protein) debido a la homología de su secuencia con la osmotina, proteína que se acumula en altos niveles cuando las células empiezan a adaptarse a ambientes de bajo potencial hídrico [474]. Se ha reportado que líneas de sésamo transgénico que sobreexpresan una taumatina, presentaron simultáneamente tolerancia al estrés hídrico, osmótico y por salinidad, así como a un patógeno fúngico. Igualmente, las plantas mostraron una mayor tasa de sobrevivencia bajo condiciones de DH, lo que se atribuyó a cambios en parámetros fisiológicos, bioquímicos derivados de importantes cambios en la regulación de la expresión génica [476]. Un resultado similar se encontró en plantas transgénicas de tabaco, en donde la sobreexpresión de un gen codificante de una osmotina mejoró significativamente la tolerancia a estrés por sequía [475]. Así, las TPL constituyen sin lugar a dudas genes candidatos prometedores en fitomejoramiento, con el fin de incrementar la tolerancia de los cultivos a los estreses bióticos y abióticos [473]. En este estudio, a pesar de la mayor reducción del  $\Psi$  en el clon EET8, este logró recuperarse del DH una vez reanudado el riego, por lo que, considerando los estudios en otras especies, se podría sugerir que la intermediación de este gen estuvo relacionada con la respuesta observada en este clon, posiblemente mediante la acumulación de la respectiva proteína codificada, lo que podría haber tenido influencia en la aclimatación observada en este clon a esta condición y su supervivencia al DH.

Igualmente reguladas por el estrés abiótico, las proteínas de la pared celular denominadas expansinas son necesarias para el crecimiento y desarrollo pues están implicadas en la absorción de agua, la relajación celular y el incremento del tamaño de la célula por su intervención en el crecimiento de la pared celular [521]. Se ha reportado que la expresión de estas proteínas puede estar relacionada con un mecanismo de adaptación al estrés ambiental mediante la regulación del crecimiento y la expansión celular bajo esta condición [522]. En los dos clones aquí evaluados se encontró altamente inducido el gen EXLB1 (Tabla 6-2) que codifica una expansina relacionada con la respuesta a diferentes factores en *Brassica rapa*, dentro de los que se encuentra el estrés por sequía [521]. Posiblemente en *T.cacao*, la inducción de este gen esté contribuyendo

favorablemente con la regulación de las modificaciones de la pared celular y expansión celular juntos con otros genes, en respuesta a DH.

También, los metabolitos tienen un rol fundamental en la respuesta de tolerancia al déficit hídrico [75]. Debido a que los niveles de expresión de los genes encargados de su biosíntesis se ven incrementados bajo DH y que estos se correlacionan con su acumulación, se han puesto en marcha estrategias que consisten en incrementar la expresión de estos genes como un mecanismo para mejorar la tolerancia al DH [75]. En este estudio, dentro de los genes con una alta inducción en los dos clones (Tabla 6-2) se encontró el gen de la galactinol sintasa (GoIS2). La GoIS cataliza el primer paso en la biosíntesis de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO-rafinosa y estaquiosa) y juega un rol clave en la generación de galactinol y rafinosa en condiciones de DH, dentro de la estrategia global de ajuste osmótico. Estos metabolitos actúan como osmoprotectores estabilizando las membranas celulares y eliminando igualmente las ROS, por lo que protegen el aparato fotosintético. La sobreexpresión del gen de la GoIS2 se ha relacionado con el mejoramiento de la tolerancia a DH por el incremento en los niveles endógenos de los metabolitos que sintetiza [75,404].

De la misma forma, la acumulación de prolina, otro conocido soluto osmocompatible involucrado en la estrategia de ajuste osmótico, se ha correlacionado con la tolerancia al estrés hídrico y salino [75]. Se ha reportado que la sobreexpresión del gen P5CS (Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase) resulta en altos niveles de prolina, con el consecuente aumento en tolerancia a DH. En este estudio los clones TSH565 y EET8 mostraron ambos inducción del gen P5CS (log<sub>2</sub>FC de 1.73 y 3.29 respectivamente) (Tabla 6-3). La prolina es un osmolito compatible a los cuales se les atribuye tener implicación en el ajuste osmótico celular, la eliminación de ROS, la protección de la integridad de la membrana y la estabilización de enzimas/proteínas. En el caso de la prolina se le atribuye el mecanismo de osmoprotección, pues protege los componentes celulares del daño ocasionado por la deshidratación [220]. En *T.cacao* se ha reportado que la prolina es el compuesto que más se acumula en las hojas [61], así como que dicha acumulación es dependiente del genotipo [53]. Así mismo, la acumulación de prolina en las hojas de clones tolerantes de *T. cacao* al déficit hídrico se ha asociado con un mayor %CRA y una menor apertura estomática [53]. De acuerdo con los niveles de expresión del gen P5CS observados aquí, se podría inferir que el clon EET8 podría tener una mayor acumulación de prolina que el clon TSH565, así como que los dos clones emplearon el mecanismo de ajuste osmótico en respuesta al DH y contaron con la protección ante la deshidratación atribuida a este compuesto.

Sin embargo, para ahondar en la respuesta de ajuste osmótico se identificaron otros genes inducidos relacionados con la síntesis de osmolitos compatibles como la glicina-betaína, (GB) a la cual también se le atribuye la protección de la membrana tilacoidal y el mantenimiento de la eficiencia fotosintética durante condiciones de estrés [220] y la trealosa a la que se relaciona con la protección de la membrana plasmática. En relación con estos osmolitos, en el clon TSH565 se encontró inducido (log<sub>2</sub>FC 2.54) el gen de la colina deshidrogenasa (EC:1.1.99.1), mientras que en el clon EET8 se encontró ligeramente inducido (log<sub>2</sub>FC 0.77) el gen de la betaína-aldehído deshidrogenasa

(EC:1.2.1.8), ambos implicados en la biosíntesis de la GB. En cuanto a los genes relacionados con la síntesis de trealosa, se encontraron tres de ellos inducidos en el clon TSH565 (Tc02v2\_g021440, Tc09v2\_g013840, Tc06v2\_g013560) y dos en el clon EET8 (Tc09v2\_g013840, Tc01v2\_g008970) (Tabla 6-2). De acuerdo con la diferencia en los niveles de inducción de estos genes, la síntesis de GB y trealosa podría ser mayor en el clon TSH565. Es interesante, por ejemplo, que la inducción del gen Tc02v2\_g029680, que participa en la síntesis de la GB, a la cual se le atribuye la protección del aparato fotosintético, sea mucho mayor en el clon TSH565, el cual no presentó afectación de la maquinaria fotosintética bajo al DH, como lo indicaron los parámetros fotosintéticos ( $F_v/F_m$ ) y fisiológicos asociados, como si fue el caso para el clon EET8.

La inducción del anterior grupo de genes, observada en mayor o menor medida en los dos clones, es indicativa que el ajuste osmótico es un mecanismo de respuesta crucial en *T. cacao* para hacer frente al déficit hídrico, sin embargo, en el clon TSH 565 pudieron haber tenido una mayor repercusión en la protección del daño ocasionado por la deshidratación.

Otro grupo de proteínas efectoras relevantes para contrarrestar daños en complejos enzimáticos y estructuras celulares en respuesta a estreses como el DH o estrés por salinidad, son las proteínas LEA (late embryogenesis abundant) y las proteínas de choque térmico (HSP). A las proteínas LEA se les atribuye entre otras funciones redireccionar la distribución intracelular del agua, unirse a iones inorgánicos para evitar el daño relacionado a las altas concentraciones de iones bajo DH y prevenir la deshidratación, así como controlar la expresión de otros genes por unión a los ácidos nucleicos e incrementar la tolerancia a la desecación [523]. Las proteínas HSP se describen con un rol primordial en la tolerancia a estreses bióticos y abióticos por su función como chaperonas que incrementan la estabilidad de las membranas y regulan el sistema antioxidante interviniendo en la detoxificación de las ROS [225]. Al contrario, cinco genes codificantes de las proteínas LEA y dos de HSP se encontraron inducidos en el clon TSH565 en comparación con tres y uno en el EET8 respectivamente, siendo dos genes codificantes de proteínas LEA comunes entre clones (Tc04v2\_g019000 y Tc04v2\_g023610), y los genes de las HSP fueron específicamente inducidos en cada clon. La participación de estas proteínas en la respuesta al DH es crítica al asegurar la estabilización de la membrana, de las proteínas y su estructura así como en la prevención de la formación de agregados de proteínas y el replegado de las proteínas desplegadas [225,524]. Por sus diversas funciones y roles en la protección de las plantas bajo DH y su empleo exitoso en el mejoramiento por transgénesis para el incremento de la tolerancia a sequía mediante la sobreexpresión de sus genes codificantes [222,525–528], estos genes podrían considerarse como candidatos de tolerancia al DH en *T. cacao*.

## Regulación de la maquinaria fotosintética frente al DH

Consecuentemente, con los resultados anteriores y los observado a nivel fisiológico, se detectó cambio en la expresión de los genes relacionados con el funcionamiento de la maquinaria fotosintética en los clones. En el clon TSH565 se encontraron tres genes inducidos relacionados con la proteína PsbP (Tabla 6-3). Esta proteína es una subunidad extrínseca del PSII y participa en el funcionamiento normal de la oxidación fotosintética del agua [529]. En un estudio en tabaco se confirmó que PsbP es indispensable para la regulación y la estabilización del PSII. Mutantes de *A. thaliana* con pérdida de función en este gen, mostraron una importante reducción en el crecimiento, hojas verde pálido y una marcada reducción de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) a valores de 0.47 [529]. Igualmente en *Arabidopsis*, se confirmó la necesidad de esta proteína para el ensamble y la estabilidad del PSII, así como para la fotoautotrofia de las plantas [530], así como su implicación en la respuesta de tolerancia al estrés por déficit hídrico mediante la regulación del movimiento de los estomas [531]. De acuerdo con esto, es posible sugerir que la inducción de estos genes en el clon TSH565 pudo estar implicada en la estabilización y funcionamiento normal del PSII durante el tratamiento de DH, lo que junto a la osmoprotección mediada por los solutos osmocompatibles, tuvo repercusión en que la maquinaria fotosintética no se viera afectada.

Por otra parte, en el clon EET8, como lo mostró el análisis de enriquecimiento funcional (Figura 6-16), un total de quince genes relacionados con la fotosíntesis, se encontraron reprimidos, dentro de ellos el PSBW (Photosystem II reaction center W protein) el cual es un componente central del PSII con roles en la estabilización de su estructura y en la fotosíntesis [532,533]. La falta de esta proteína inhibe la formación del complejo PSII-LHCII (PSII-light harvesting complexII), lo que conlleva a la reducción en la eficiencia de la transferencia de energía entre las unidades del PSII y una lenta regulación de este complejo bajo condiciones de exceso de luz [534]. Interesantemente, en dos genotipos de mijo (*Pennisetum glaucum*) tolerantes a sequía, este gen se encontró inducido en respuesta al DH [245]. Además, en *Populus tomentosa* se le atribuyó un rol en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Igualmente se menciona que las plantas transgénicas que con una mutación en esta proteína son más vulnerables a la fotoinhibición [535].

Dentro de los demás genes que se encontraron reprimidos en este clon, dos pertenecen a las antenas cosechadoras de luz (LHC), tres (PsaF, PsaH, Psak) son subunidades del centro de reacción del PSI (fotosistema 1), tres están relacionados con el transporte de electrones y dos más hacen parte del PSII (Tabla 6-3). Estos resultados indican que el DH ocasionó una fuerte represión del aparato fotosintético en este clon. No obstante, en un estudio proteómico de plantas de maíz sometidas a DH, se relaciona la reducción en la abundancia de algunos componentes de las LHC como una estrategia para proteger las plantas del daño foto-oxidativo. As su vez, los autores atribuyen la menor reducción en la actividad del PSI comparado con la del PSII observada en estas plantas, a una mayor tolerancia del PSI al DH en plantas que se encuentran en desarrollo [536]. En otro estudio transcritoómico en plantas de maíz sometidas a déficit hídrico, se evidenció la represión de diferentes genes asociados con el PSI y el PSII similares a los encontrados

aquí, con la consecuente reducción en los parámetros de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila, respuesta que fue atribuida a la severidad del estrés. Además se reportó que los niveles de expresión de los genes retornaron a los niveles de las plantas control o se encontraron inducidos después en la recuperación [537]. Estos resultados representan una clara diferencia en la respuesta al DH entre los clones evaluados, soportando molecularmente el origen de la reducción en la actividad fotosintética observada. Así, para el clon EET8, la regulación a la baja de estos genes se perfila como un mecanismo de protección del aparato fotosintético frente a los mayores daños en el mismo experimentados por este clon.

### **Activación del Sistema antioxidante frente al DH en *T.cacao***

Es importante mencionar que el daño ocasionado a componentes celulares y estructuras de la maquinaria fotosintética de la célula durante el estrés por déficit hídrico es consecuencia del incremento en la producción de diversas especies reactivas del oxígeno (ROS) como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La respuesta primaria de las plantas frente a esta ráfaga oxidativa se basa en la activación del sistema antioxidante con una primera línea de defensa basada en la producción de enzimas detoxificadoras de ROS como superóxido dismutasas (SOD), catalasas, peroxidasas o glutatión S-transferasas [81,155], cuya inducción fue evidenciada en los perfiles transcriptómicos de ambos clones en respuesta a DH

Así, fue interesante encontrar que los genes de peroxidasas fueron los principalmente inducidos en el clon EET8, siendo los que contribuyeron a enriquecer la categoría GO de respuesta al estrés osmótico. También, se encontraron inducidos en este clon tres genes codificantes de glutatión S-transferasas y uno codificante de una aldehído deshidrogenasa (Tabla 6-2). Entre tanto, en el clon TSH565 se encontró inducido el gen de una catalasa, cuyo ortólogo en *A.thaliana* hace parte de los genes de la ruta de señalización mediada por MAPK y ABA y que conduce a la tolerancia al DH [538–540](Figura 6-11). Cabe anotar que se encontró una menor cantidad de genes codificantes de enzimas peroxidasas y glutatión S-transferasas inducidos este clon en comparación con el clon EET8, pudiendo sugerir posibles diferencias en el grado del estrés oxidativo sufrido en estos clones y respectivos daños generados, como ya ha sido mencionado anteriormente. En efecto, la mayor inducción de estos genes observada en el clon EET8 puede sugerir la necesidad de una mayor protección contra el daño oxidativo, en respuesta a una mayor acumulación de daños asociados, como se pudo observar para el aparato fotosintético en este clon.

Adicionalmente, dentro de los genes altamente inducidos en los dos clones por el DH, se encontraron genes asociados con el metabolismo antioxidante o redox, y que se inscriben más dentro de una segunda línea de aclimatación frente al estrés oxidativo, contribuyendo en la homeostasis o reequilibrio del metabolismo redox como parte del sistema antioxidante tanto enzimático como no enzimático (metabolitos secundarios): la MIOX (inositol oxigenasa 1), la COMT (3-*o*-metiltransferasa de ácido cafeico), y las PPOs (Polifenol oxidasas cloroplastídicas) (Tabla 6-2). La MIOX cataliza la conversión del mio-inositol en ácido D-glucurónico (D-GlcUA), los cuales se han reportado como implicados

en la biosíntesis de ácido ascórbico, que es un importante antioxidante para contrarrestar el daño oxidativo [460]. En arroz, se evidenció que la sobreexpresión de este gen contribuyó en mejorar la tolerancia a sequía, activando la biosíntesis de la prolina, eliminando las ROS y disminuyendo el daño oxidativo [459]. Por su parte la COMT actúa en un paso clave en la biosíntesis de melatonina implicada en diferentes procesos de desarrollo de las plantas y respuesta a estrés abiótico. Se reportó que la sobreexpresión de un gen de COMT de trigo en *Arabidopsis* aumentó la síntesis de melatonina y la tolerancia a déficit hídrico [461]. Así mismo se ha reportado que la aplicación de melatonina en el nogal chino (*Carya cathayensis*) tuvo influencia en la recuperación del crecimiento, en el mejoramiento de la eficiencia fotosintética, así como en la defensa del sistema antioxidante para la eliminación de las ROS. También se atribuye a la melatonina un rol en el desencadenamiento de la síntesis y acumulación de solutos compatibles como la prolina y azúcares solubles cuya contribución en la regulación, mantenimiento y estabilización de la membrana celular reduce el daño oxidativo ocasionado por el DH [462,541,542]. Así mismo, las PPOs participan en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como parte de un mecanismo de protección adaptativo frente a estas especies ROS acumuladas bajo estrés tanto abiótico como biótico [231,465,543]. Interesantemente, este incremento en la actividad de las PPOs inducido por el DH ha sido reportado previamente en *T.cacao* [26].

Se ha reportado ampliamente la importancia del sistema antioxidante enzimático y no enzimático en la respuesta al DH, por su papel en la regulación de los niveles de ROS dentro de la célula [544], lo cual es un proceso muy relevante para asegurar tanto la protección del daño oxidativo ocasionado por estos, como su acción como mensajeros secundarios en los procesos de señalización celular asociados al estrés [81,545].

De acuerdo con lo anterior, los perfiles transcriptómicos confirman que el déficit hídrico desencadenó en estos dos clones de cacao, la activación del sistema antioxidante en respuesta a la aparición de ROS, como pudo ser evidenciado previamente (Capítulo 5) empleando RT-qPCR, sugiriendo que el metabolismo antioxidante es de gran relevancia en la aclimatación de *T. cacao* y su tolerancia al DH.

## 6.6 Conclusiones

Los perfiles transcriptómicos obtenidos permitieron aportar nuevos elementos para dilucidar en gran medida, los mecanismos y bases moleculares de la respuesta de *T. cacao* al déficit hídrico y a lo largo de los diferentes niveles de la cascada de señalización, desde la percepción del estrés, hasta la activación de genes efectores. A su vez, permitieron confirmar la respuesta observada a nivel fisiológico en los clones de *T.cacao* evaluados, y ahondar en algunas diferencias claras en sus mecanismos de respuesta a un periodo prolongado de déficit hídrico, logrando sin embargo sobrevivir y recuperarse una vez reanudado el riego.

*T. cacao* tiene componentes de la respuesta a estrés conservados, como vías de percepción y transducción de la señal, así como genes efectores responsables de la respuesta antioxidante y ajuste osmótico.

En la expresión diferencial frente al DH se evidenció la implicación de genes específicos de cada clon involucrados en que las plantas pudieran sobrellevar y recuperarse del DH, estos genes se proponen como candidatos de tolerancia al DH en *T.cacao*.

La reprogramación de la expresión génica en el clon TSH565 estuvo encaminada a la activación de mecanismos para la protección de los tejidos contra la deshidratación, sin observarse alteración en la maquinaria fotosintética.

La reprogramación de la expresión génica en el clon EET8 conllevó a la activación de mecanismos para proteger los tejidos de la deshidratación, al igual que para lograr la aclimatación al ambiente de bajo potencial hídrico, y la protección de la maquinaria fotosintética.

El ajuste osmótico, la activación del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, y la osmoprotección tienen un rol importante en la respuesta de tolerancia de *T.cacao* al DH.

## Capítulo 7. Discusión General

El déficit hídrico se constituye como uno de los factores ambientales de estrés que limita el crecimiento, y productividad de las plantas y causa pérdidas de los cultivos poniendo en riesgo la agricultura de especies vegetales cultivadas adaptadas a las condiciones propias del trópico como *T. cacao*. Los efectos de la baja disponibilidad hídrica en el suelo sobre el metabolismo y funcionamiento óptimo de las plantas se han acentuado en el siglo actual debido al calentamiento global y aunque son múltiples sus efectos a nivel fisiológico, uno de los procesos que se reducen durante las épocas de sequía es la fotosíntesis que de forma directa conlleva a reducción del rendimiento los cultivos [88,122].

Los resultados presentados a través de los diferentes capítulos de este documento permiten proponer que los clones de cacao evaluados presentan diferentes niveles de tolerancia al estrés por déficit hídrico, al activar diversos y a su vez diferentes mecanismos que les permitieron superar y sobreponerse a esta condición. Lo anterior teniendo en cuenta que en esta respuesta de tolerancia al estrés, se considera fundamental la capacidad de recuperación de las plantas luego de la reanudación del riego, capacidad que fue observada en los siete clones (Capítulo 5 y Capítulo 6) a pesar de la severidad del estrés que fue impuesto [89,166]. Además, los resultados del perfil transcriptómico de los clones que presentaron mayor contraste en las respuestas observadas a nivel fisiológico (EET 8 y TSH 565) fueron congruentes, y permitieron evidenciar que, en términos generales, la reprogramación de la expresión génica frente al DH, estuvo encaminada a la protección de las células de la deshidratación al igual que a promover la síntesis y acumulación de metabolitos involucrados en los mecanismos de evitación del estrés y tolerancia que ayudaron a las plantas a superar el estrés. Lo anterior gracias a una adecuada orquestación de la activación de las vías de transducción de señales y de la expresión de genes de respuesta a estrés [174].

Estas respuestas observadas a nivel fisiológico y molecular constituyeron la base fundamental para la construcción del modelo propuesto que integra los diferentes componentes del mecanismo de tolerancia que los clones de cacao evaluados han desarrollado para contender el estrés por déficit hídrico (Figura 6-19 y Figuras 7-1 y 7-2). En términos generales el mecanismo de tolerancia y respuesta al déficit hídrico desplegado por cada uno de los clones de cacao se inició mediante la percepción y reconocimiento de señales asociadas con el estímulo de DH, seguido por la síntesis de productos derivados de los genes inducidos que están involucrados en la protección, para que las plantas puedan superar el estrés y recuperarse de esta condición una vez reanudado el riego (Figura 6-19). Así, la baja disponibilidad de agua en el suelo producto de largos periodos de suspensión de riego (26 y 52 días), ocasionó una reducción significativa del %CVA y consecuentemente del  $\Psi$  ocasionado déficit hídrico. La señal de estrés fue percibida en los dos clones por los osmosensores y sensores hidráulicos localizados en la membrana plasmática de las células de la raíz (WAKs, RLKs), que activaron a segundos mensajeros para la transducción de las señales y la activación de

factores de transcripción de genes de respuesta a este tipo de estrés por la ruta dependiente e independiente de ABA.

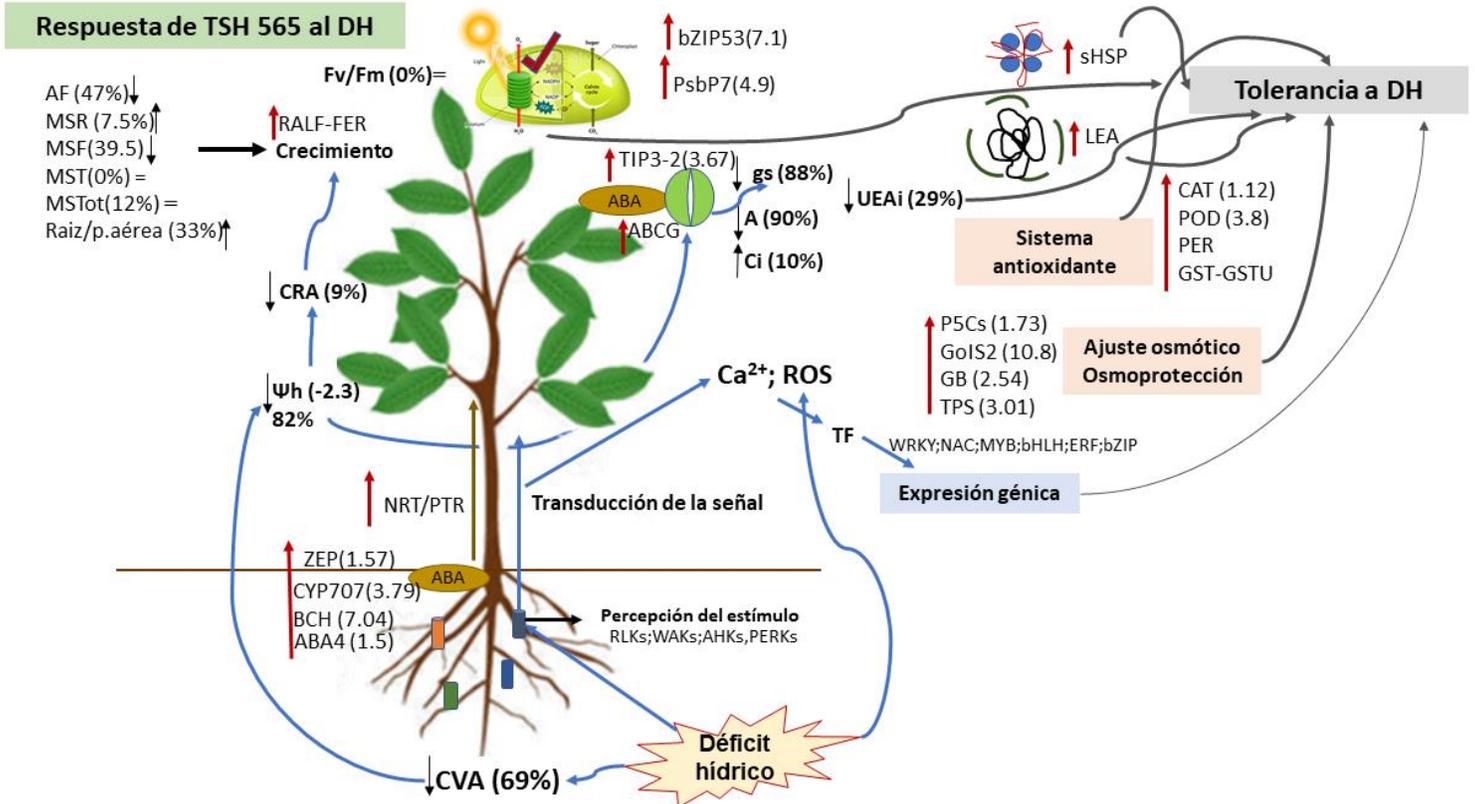
Como una respuesta rápida al DH mediada por el ABA, los siete clones de *T.cacao* evaluados cerraron estomas como parte del mecanismo de evitación para reducir la pérdida de agua por transpiración, con la consecuente limitación en la asimilación del CO<sub>2</sub> fotosintético como fue evidenciado por la reducción de los parámetros de intercambio de gases evaluados en las dos caracterizaciones fisiológicas realizadas [75,76,88,91,122]. Concordantemente, el perfil transcriptómico de los clones EET 8 y TSH 565 permitió evidenciar el cambio en la expresión de los genes relacionados con este mecanismo de cierre estomático.

A medida que el déficit hídrico fue más prolongado la afectación a nivel metabólico (limitación no estomática) se convirtió en otro factor limitante de la fotosíntesis ocasionando afectación del aparato fotosintético en la mayoría de los clones que fue evidenciada con la reducción de la eficiencia cuántica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ). Si bien esta afectación fue reversible o temporal al evidenciar que después de la rehidratación, las plantas sometidas a DH alcanzaron en más del 50% los valores de las plantas CC. Esta respuesta de tolerancia se atribuyó a los mecanismos activados por los diferentes genes de respuesta a estrés encaminados a la reparación de daños en el fotosistema, a la acción del sistema antioxidante, a los compuestos osmoprotectores y demás proteínas y chaperonas moleculares sintetizadas para ayudar a las plantas a superar la condición de DH [75,226,384,385].

A nivel molecular, en esta respuesta lenta al DH estuvo implicada la regulación de la activación y represión de los genes por diversos FT, activados de forma dependiente e independiente de ABA. En la variedad de productos génicos se evidenciaron las estrategias comunes y específicas de cada clon para contrarrestar el daño ocasionado por el DH, proteger las células de la deshidratación y recuperarse (Figura 6-19).

La integración de las respuestas observadas a nivel fisiológico (Capítulos 4 y 5) y el perfil transcriptómico del clon TSH 565 permitió proponer un posible modelo acerca de la respuesta de tolerancia al DH evidenciada en este clon (Figura 7-1). En este modelo se propone que la intermediación del ABA en TSH 565 produjo la reducción de la conductancia estomática (cierre estomático) para evitar la pérdida de agua por transpiración ocasionando la reducción en la fotosíntesis neta debido a la disminución en la difusión del CO<sub>2</sub> atmosférico al mesófilo de la hoja como consecuencia de la reducción del CVA del suelo y el  $\Psi$  ocasionados por el DH. Además, se sugiere la implicación del gen la acuaporina TIP3-2 en el incremento de la conductividad hidráulica y el flujo de agua en este clon para el mantenimiento de la turgencia celular y la hidratación [128,518]. El mantenimiento de un alto  $\Psi$  en condiciones de DH, se considera como una importante adaptación fisiológica a la sequía, empleándose como un parámetro clave para catalogar genotipos tolerantes [11,113,336].

En condiciones de baja disponibilidad hídrica, la modificación de la arquitectura de las raíces, mediante la acción de fitoreguladores como las auxinas y la redistribución de los fotoasimilados, es una respuesta de evitación que busca aumentar la captación de agua bajo DH y que ha sido reportada previamente en cacao. De hecho, se considera como uno de los parámetros, junto con la biomasa seca total (Msto), de mayor relevancia para la selección de genotipos tolerantes a la sequía [27,32,34,75], parámetro para el cual no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos en este clon.



**Figura 7- 1 Modelo de respuesta al DH del clon TSH 565.** Las flechas negras indican reducción o incremento expresado en porcentaje (según su dirección) de los parámetros fisiológicos evaluados (capítulo 5); las flechas rojas indican inducción del gen cuyo nombre y log2FC se indican al lado de esta.

La continuación del crecimiento a pesar del DH pudo estar relacionada con el mecanismo regulatorio mediado por FER-RALF [455], que permitió la expansión de raíz ( incremento del 7.5% en la biomasa seca) para la maximización de la captación de agua y el incremento en el EUAi, pues con una mínima apertura estomática y en consecuencia, con una menor pérdida de agua por transpiración, este clon logró valores de  $\Psi$  y %CRA más altos. Esta respuesta pudo estar relacionada con la intermediación del mecanismo de ajuste osmótico que ocasionó un incremento en la acumulación de osmolitos compatibles como la prolina, la GB y la trealosa, siendo éstos dos últimos los que

mostraron mayor inducción en sus genes biosintéticos en este clon, pudiendo constituir un mecanismo complementario decisivo en el fenotipo de tolerancia al estrés [122].

Además, se sugiere que debido al mantenimiento del turgor celular, no se presentó afectación en la maquinaria fotosintética en TSH 565 como se evidenció en el mantenimiento de los valores de  $F_v/F_m$  similares al control, y, la implicación en esta respuesta del gen PsbP encargado de la estabilidad y normal funcionamiento del PSII [460,529,530], al igual que de genes implicados en la síntesis de osmoprotectores y componentes del sistema antioxidante enzimático y no enzimático y proteínas chaperonas moleculares [546–550].

El modelo de respuesta de TSH 565 propone además que el ABA tuvo un rol fundamental en la respuesta de este clon al DH, y, que el gen DREB2D pudo estar relacionado con la respuesta de tolerancia observada [507]. Igualmente, en esta respuesta se presentó la intervención e integración de otras vías mediadas por otros fitoreguladores de crecimiento vegetal. Evidentemente, la reprogramación de la expresión génica en el clon TSH565 estuvo dirigida a la activación de un conjunto de mecanismos directamente relacionados con la respuesta a estrés.

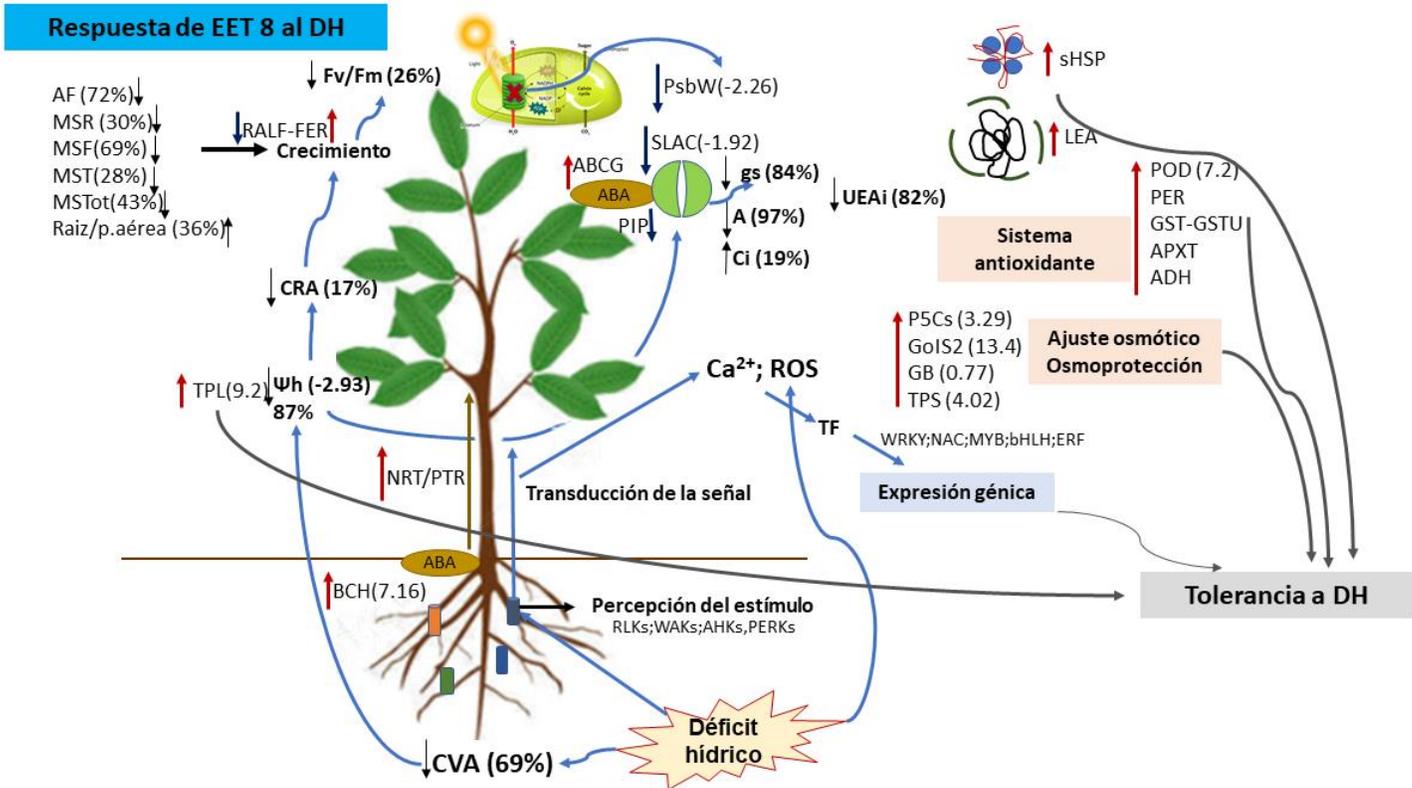
Por otra parte, en el modelo de respuesta del clon EET 8 al DH (Figura 7-2), se propone que pese a la reducción en la disponibilidad del agua en el suelo este clon presentó un menor cierre estomático que ocasionó más pérdida de agua por transpiración alcanzando un  $\Psi$  y CRA más bajo. Este clon presentó los valores de  $g_s$  más altos en los dos períodos de déficit hídrico evaluados (26 y 52 días) lo que le permitió tener mayor eficiencia en la asimilación de  $CO_2$  y no llegar a valores negativos de A, en comparación con los demás clones (Capítulo 4). De acuerdo con el perfil de expresión génica en este clon, el gen codificante del canal de aniones SLAC1, implicado en la respuesta de cierre estomático se encontró reprimido debido al DH lo que posiblemente ocasionó el menor cierre estomático observado, permitiéndole continuar con la absorción de  $CO_2$  atmosférico, aunque a expensas de perder agua por transpiración [168,169].

En este sentido, se sugiere que esta diferente regulación estomática, pudo sin embargo requerir un mecanismo adicional para frenar la pérdida de agua como podría ser el caso de la represión de los genes de las acuaporinas (PIP), contribuyendo así a reducir la conductividad hidráulica y con ella el flujo de agua dentro de las células. Tanto la inducción como la represión de genes de acuaporinas se ha relacionado con la tolerancia a estrés, ya sea por el incremento en el flujo de agua, como por la reducción de este que evitaría que las plantas pierdan agua con mayor facilidad por transpiración. Lo evidente es que la regulación de este tipo de genes es variable y parece tener relación con diversos factores como el genotipo, el nivel de estrés, el tejido entre otros. No obstante, en esta investigación el control de su expresión fue divergente entre clones y fue concordante con otras regulaciones observadas, por lo que pareciera que esta coordinación en la expresión de genes permitió a cada clon responder según su mecanismo adaptativo desarrollado y sobrellevar el estrés [15,79,123,551].

Adicionalmente, se propone que el  $\Psi$  bajo fue contrarrestado con la inducción del gen TPL (taumatina) que permitió a este clon aclimatarse al entorno de baja disponibilidad hídrica [473] junto con la activación del mecanismo de ajuste osmótico. Los niveles de inducción del gen P5CS se han correlacionado con la acumulación de prolina en mayor o menor proporción de acuerdo con la intensidad y periodo de estrés en genotipos tolerantes y susceptibles a la sequía y esta respuesta ha sido asociada también con un incremento en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante y la tolerancia al estrés [82,244,547,550,552]. Es posible que el nivel de inducción del gen P5CS en EET 8 se debiera a que, en este clon, el DH ocasionó una mayor reducción en el potencial hídrico foliar.

A parte de la reducción en la asimilación de  $\text{CO}_2$  con la consecuente reducción de A (limitación estomática), el DH claramente ocasionó la represión de un grupo de genes implicados en el funcionamiento del PSII, el PSI, las antenas colectoras de luz y el transporte de electrones. Se ha propuesto que la regulación a la baja de proteínas y el ARNm de los PSI y PSII puede tener un rol crucial en la respuesta al estrés por déficit hídrico. De igual manera, el daño en alguno de los componentes individuales de la fotosíntesis ocasiona reducción en la capacidad fotosintética, la cual puede ser permanente o temporal [553,554]. La recuperación de los valores de  $F_v/F_m$ , similares a los de las plantas control, hacen pensar que la represión observada en los genes fotosintéticos fue parte de un mecanismo eficiente de protección contra el daño foto-oxidativo debido a la recuperación de la tasa fotosintética (A) y el rendimiento cuántico del PSII. Además, la inducción de diversos genes del componente enzimático y no-enzimático del sistema antioxidante, que fue mayor en este clon (EET8) que en el TSH 565, así como la inducción de genes de biosíntesis de compuestos osmoprotectores como la GoS2, la MIOX, y otros genes de protección como los codificantes de chaperonas moleculares o proteínas LEA, constituyeron presuntivamente mecanismos adicionales para asegurar esta tolerancia y recuperación [89,523].

En cacao, este es el primer estudio que aborda desde una aproximación integrada, la respuesta de la planta al estrés por déficit hídrico. Aquí fue posible evidenciar que algunos componentes esenciales de la respuesta a estrés en *T. cacao* son conservados con respecto a los descritos en otras plantas o cultivos modelos, principalmente en cuanto a las vías de percepción y transducción de la señal de estrés, así como en algunos genes efectores. No obstante, la expresión específica de otros genes de este tipo puede depender del genotipo y de las condiciones evaluadas difiriendo entre organismos [82,165]. Fue precisamente en esos genes que se encontraron las principales diferencias que permiten a una planta tener mayor o menor afectación por la condición de estrés como se observó con los clones aquí evaluados. Además, cabe mencionar que, en el caso de *T. cacao*, son varios los genes que no tienen aún una anotación funcional y que pudieran tener un rol relevante en esta respuesta, por lo que su caracterización sería de gran importancia, en futuros estudios.



**Figura 7- 2 Modelo de respuesta al DH del clon EET 8.** Las flechas negras indican reducción o incremento expresado en porcentaje (según su dirección) de los parámetros fisiológicos evaluados (capítulo 5); las flechas rojas indican inducción y las azules represión del gen cuyo nombre y log<sub>2</sub>FC se indican al lado de esta.

Así pues, en este estudio tanto la evaluación fisiológica como el análisis de perfiles transcriptómicos, permitieron evidenciar diferencias entre las respuestas de los clones de *T. cacao* al DH, diferencias a su vez asociadas con los diferentes niveles de tolerancia.

La integración de los resultados referentes con las respuestas de las plantas de *T. cacao* a nivel molecular, bioquímico y fisiológico frente al estrés por déficit hídrico, permitió identificar rasgos de tolerancia mostrados por los clones evaluados como nuevo conocimiento importante, relacionado con la forma en que los factores ambientales como la sequía influyen en los procesos y mecanismos de respuesta adoptados por las plantas para hacerle frente y contrarrestar los daños ocasionados por esta condición. De esta forma, el conocimiento generado en esta tesis doctoral podría contribuir en facilitar futuras investigaciones complementarias, así como la selección y el desarrollo de variedades más tolerantes a la baja disponibilidad de agua en el suelo, variedades requeridas para la adaptación del cultivo a este impacto derivado del cambio climático.

## **Capítulo 8. Conclusiones y Recomendaciones**

## 8.1 Conclusiones

- Los periodos de suspensión de riego aplicados en la caracterización fisiológica ocasionaron un estrés por déficit hídrico severo en los siete clones de cacao evaluados
- Vinculada al mecanismo de evitación, la regulación del cierre estomático se constituyó como respuesta temprana al DH, en los siete clones de *T.cacao*.
- Con la prolongación del déficit hídrico, se presentó limitación metabólica con la disminución de la eficiencia fotosintética y el desencadenamiento de estrés oxidativo.
- Los clones EET 8, TSH 565 e ICS 60 mostraron las respuestas más diferenciadas al período de déficit hídrico de 26 días de duración.
- Los clones EET 8 y TSH 565 presentaron diferencias contrastantes en la respuesta al periodo de suspensión de riego de 52 días.
- El clon TSH 565 mostró el potencial hídrico más alto, reducción en la pérdida de agua, eficiencia en el uso del agua, mayor turgencia celular, aparato fotosintético funcional en DH, rasgos de los genotipos considerados tolerantes.
- El clon EET 8 presentó alteración de la eficiencia fotosintética como consecuencia de la fotoinhibición ocasionada por el DH.
- Los siete clones de *T. cacao* desplegaron componentes relacionados con la respuesta al DH que les permitieron recuperarse mostrando diferentes niveles de tolerancia, como fue confirmado por los perfiles de expresión génica observados en los clones con respuestas más contrastantes.
- *T. cacao* tiene componentes esenciales de la respuesta a estrés conservados en relación con otras plantas o cultivos modelo, como las vías de percepción y transducción de la señal de estrés, y algunos genes efectores responsables de la respuesta antioxidante y ajuste osmótico.
- La reprogramación de la expresión génica transcripcional en el clon TSH565 condujo a la activación de mecanismos directamente implicados en la respuesta de protección de los tejidos contra la deshidratación, sin la alteración en la maquinaria fotosintética.
- El clon EET8 mostró mayor afectación por el déficit hídrico, no obstante, se observó la activación de diversos mecanismos o estrategias como la regulación a

la baja del PSII, y la aclimatación al ambiente de bajo  $\Psi$ , que convergieron para contrarrestar los efectos del DH.

- Los mecanismos de ajuste osmótico, la protección por parte del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, así como la osmoprotección cumplen un rol crucial en la respuesta de tolerancia de *T.cacao* al estrés por déficit hídrico.
- En la expresión diferencial frente al estrés por déficit hídrico de los genes específicos de cada clon, se observaron las principales diferencias detrás de los mecanismos que les permitieron sobrellevar y recuperarse de esta condición, constituyéndose en importantes genes candidatos de tolerancia al estrés hídrico en cacao.

## 8.2 Recomendaciones

Esta investigación presenta resultados novedosos en cuanto a la respuesta a nivel molecular de *T. cacao* al estrés por déficit hídrico, lo que constituye un insumo importante para los programas de mejoramiento genético de esta especie, no obstante, considerando la complejidad de esta respuesta, se recomienda el empleo de otras aproximaciones metodológicas para complementar y ampliar la información acerca de los mecanismos involucrados en la respuesta al DH en esta especie:

- Se requiere validar la expresión diferencial de los genes candidatos propuestos diferencialmente expresados mediante RT-qPCR.
- Debido a que los niveles del ARNm pueden dar una indicación de la activación de un producto génico, pero no es confirmatorio de su actividad, se recomienda realizar pruebas de actividad enzimática, y/o acumulación y cuantificación de algunas de las proteínas y /o metabolitos más relevantes en la respuesta al DH. Esto se puede realizar tanto a través del empleo de aproximaciones proteómicas y metabolómicas, como por medio de técnicas más dirigidas a algunos productos génicos y metabólicos identificados en este estudio transcriptómico.
- Monitorear y determinar la dinámica de acumulación de los niveles de ABA en las hojas de los clones evaluados en función de la severidad del estrés y en diversos clones, como una variable adicional de tolerancia.
- Evaluar la respuesta transcriptómica en diferentes puntos de la respuesta al DH.
- Evaluar la respuesta al DH en raíz, dada la importancia de este órgano en la absorción de agua y nutrientes.
- Caracterizar la respuesta al DH en estadios de desarrollo más avanzados de las plantas, como en el periodo de floración / fructificación y producción.

- Validar la función de los genes candidatos de tolerancia propuestos, al igual que en genes sin función conocida con expresión diferencial significativa, empleando aproximaciones de genética inversa (knock down o knock out), o de ganancia de función (sobreexpresión), por medio de las nuevas herramientas de edición genómica disponibles o por expresión heteróloga en plantas modelo.
- Evaluar la respuesta al DH en clones pertenecientes a otros grupos genéticos, así como en materiales silvestres de cacao, con el fin encontrar respuestas más contrastantes frente al DH, y otros posibles genes candidatos de tolerancia.
- Incluir en la evaluación de la respuesta al DH a nivel transcriptómico el patrón empleado para la injertación con el fin de la evaluar la interacción entre la copa y este.
- Complementar el análisis transcriptómico con estrategias adicionales por ejemplo a nivel genómico o metabolómico.
- Identificar polimorfismos genéticos tipo SNP/SSR asociados a genes implicados en la respuesta al DH.

## Capítulo 9. Bibliografía

- [1] Bunn C., Lundy M., Läderach P., Castro F. Global climate change impacts on cocoa. *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*,:11, 2017. Available at: <https://www.icco.org/wp-content/uploads/2019/07/T4.152.-GLOBAL-CLIMATE-CHANGE-IMPACTS-ON-COCOA-1.pdf>
- [2] Dai A., Zhao T., Chen J. Climate Change and Drought: a Precipitation and Evaporation Perspective. *Current Climate Change Reports*,:301–12, 2018. Doi: 10.1007/s40641-018-0101-6
- [3] Dai A. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2(1):45–65, 2011. Doi: 10.1002/wcc.81
- [4] Dai A. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*, 3(1):52–8, 2013. Doi: 10.1038/nclimate1633
- [5] Lahive F., Hadley P., Daymond A. The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(1):5, 2019. Doi: 10.1007/s13593-018-0552-0
- [6] Perea Villamil A., Martínez Guerrero N., Aranzazu Hernández F., Cadena Cala T. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares, 2017
- [7] Ramos Ospino ADC., Gómez Álvarez MS. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Dibulla, Guajira, 2019. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/10901/17815>
- [8] Osorio-Guarín JA., Berdugo-Cely J., Coronado RA., Zapata YP., Quintero C., Gallego-Sánchez G., Yockteng R. Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of *Theobroma cacao* L. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01994
- [9] Gultinan MJ., Verica J., Zhang D., Figueira A. Genomics of *Theobroma cacao*, “the Food of the Gods.” In: Moore PH, and Ming R, editors. *Genomics of Tropical Crop Plants*, New York, NY: Springer New York, 145–70, 2008. Doi: 10.1007/978-0-387-71219-2\_6
- [10] Motamayor JC., Risterucci AM., Lopez PA., Ortiz CF., Moreno A., Lanaud C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5):380–6, 2002. Doi: 10.1038/sj.hdy.6800156
- [11] Medina V., Laliberte B. A review of research on the effects of drought and temperature stress and increased CO<sub>2</sub> on *Theobroma cacao* L., and the role of genetic diversity to address climate change. *Costa Rica: Bioersivity International*, 2017. Available at: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/89084>
- [12] Schroth G., Laderach P., Martinez-Valle AI., Bunn C., Jassogne L. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: Patterns, opportunities and limits to

adaptation. *Science of the Total Environment*, 556:231–41, 2016. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.024

- [13] Läderach P., Martinez-Valle A., Schroth G., Castro N. Predicting the future climatic suitability for cocoa farming of the world's leading producer countries, Ghana and Côte d'Ivoire. *Climatic Change*, 119(3–4):841–54, 2013. Doi: 10.1007/s10584-013-0774-8
- [14] Gateau-Rey L., Tanner EVJ., Rapidel B., Marelli J-P., Royaert S. Climate change could threaten cocoa production: Effects of 2015-16 El Niño-related drought on cocoa agroforests in Bahia, Brazil. *PLOS ONE*, 13(7):e0200454, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0200454
- [15] Martínez Covalada HJ., Espinal CF., Ortiz Hermida L. La cadena del cacao en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005, 2005. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11348/5890>
- [16] Rodriguez-Medina C., Arana AC., Sounigo O., Argout X., Alvarado GA., Yockteng R. Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*,:373–82, 2019. Doi: 10.1270/jsbbs.19011
- [17] ICCO. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLVI, No.1, Cocoa year 2019/20*
- [18] Sánchez Castillo V., Gamboa Tabares JA. Escuelas De Campo De Agricultores De *Theobroma Cacao* L. En El Bajo Caguan (Experiencia, Resultados Y Lecciones Aprendidas). *Luna Azul*, (38):231–51, 2014. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321731214014>
- [19] Farrell AD., Rhiney K., Eitzinger A., Umaharan P. Climate adaptation in a minor crop species: is the cocoa breeding network prepared for climate change? *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 42(7):812–33, 2018. Doi: 10.1080/21683565.2018.1448924
- [20] Schroth G., Läderach P., Martinez-Valle AI., Bunn C., Jassogne L. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: Patterns, opportunities and limits to adaptation. *Science of the Total Environment*, 556:231–41, 2016. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.024
- [21] Lozano JG., Fonseca LPM. Respuestas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. En etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agronomica*, 65(1):44–50, 2016. Doi: 10.15446/acag.v65n1.48161
- [22] Cardona BS. Acuerdo 003. Clones para Cacao en Colombia. *Chocoandino*, Bogotá, 2010. Recuperado de: [http://huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS PRODUCTIVAS/CLONES DE CACAO PARA COLOMBIA.pdf](http://huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS_PRODUCTIVAS/CLONES_DE_CACAO_PARA_COLOMBIA.pdf)
- [23] Almeida A-A., Brito RCT., Aguilar MAG., Valle RR. Water relations' aspect of *Theobroma cacao* L. clones. *Agrotropica*, 14(2):35–44, 2002. Available at:

<https://www.researchgate.net/publication/303146788>

- [24] De Almeida J., Tezara W., Herrera A. Physiological responses to drought and experimental water deficit and waterlogging of four clones of cacao (*Theobroma cacao* L.) selected for cultivation in Venezuela. *Agricultural Water Management*, 171:80–8, 2016. Doi: 10.1016/j.agwat.2016.03.012
- [25] Bae H., Kim SH., Kim MS., Sicher RC., Lary D., Strem MD., Natarajan S., Bailey BA. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(2):174–88, 2008. Doi: 10.1016/j.plaphy.2007.10.014
- [26] Rada F., Jaimez RE., García-Núñez C., Azócar A., Ramírez ME. Relaciones hídricas e intercambio de gases en *Theobroma cacao* var. Guasare bajo períodos de déficit hídrico. *Rev Fac Agron*, 22:112–20, 2005. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1222368>
- [27] dos Santos IC., Almeida A-A., Anherth D., da Conceicao AS., Pirovani CP., Pires JL., Valle RR., Baligar VC. Molecular, Physiological and Biochemical Responses of *Theobroma cacao* L. Genotypes to Soil Water Deficit. *Plos One*, 9(12), 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0115746
- [28] Zakariyya F., Indradewa D. Biochemical Changes of Three Cocoa Clones (*Theobroma cacao* L.) Under Drought Stress. *Ilmu Pertanian (Agricultural Science)*, 3(2):82, 2019. Doi: 10.22146/ipas.37495
- [29] Moreno LP. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2):179, 2009. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316234006>
- [30] Lass RA., Wood GAR. Cocoa production: present constraints and priorities for research, 1985
- [31] Alvim R., Alvim P de T. Hydroperiodicity in cocoa tree. *Proceedings of the 5th International Cocoa Research Conference*, 204–9, 1977
- [32] Santos EA dos., Almeida A-AF de., Branco MC da S., Santos IC dos., Ahnert D., Baligar VC., Valle RR. Path analysis of phenotypic traits in young cacao plants under drought conditions. *PLOS ONE*, 13(2):e0191847, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0191847
- [33] Fraga Junior LS., Vellame LM., de Oliveira AS., da Silva Paz VP. Transpiration of young cocoa trees under soil water restriction. *Scientia Agricola*, 78(2):8, 2020. Doi: 10.1590/1678-992x-2019-0093
- [34] dos Santos EA., de Almeida A-AF., Ahnert D., Branco MCD., Valle RR., Baligar VC. Diallel Analysis and Growth Parameters as Selection Tools for Drought Tolerance in Young *Theobroma cacao* Plants. *Plos One*, 11(8), 2016. Doi:

10.1371/journal.pone.0160647

- [35] De Almeida J., Ávila-Lovera E., Jaimez RE., Araque O., González R., Tezara W. Características fotosintéticas de cuatro clones de cacao en un sistema agroforestal en Barlovento, Edo. Miranda. *Investigación y Saberes*, 6(3):3–21, 2017
- [36] Avila-Lovera E., Coronel I., Jaimez R., Urich R., Pereyra G., Araque O., Chacon I., Tezara W. Ecophysiological traits of adult trees of Criollo cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) from a germplasm bank in Venezuela. *Experimental Agriculture*, 52(01):137–53, 2016. Doi: 10.1017/S0014479714000593
- [37] Tezara W., Pereyra G., Ávila-Lovera E., Herrera A. Variability in physiological responses of Venezuelan cacao to drought. *Experimental Agriculture*, 56(3):407–21, 2020. Doi: 10.1017/S0014479720000058
- [38] Tezara W., Urich R., Jaimez R., Coronel I., Araque O., Azocar C., Chacón I. Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as Forastero? *Botanical Sciences*, 94(3):563–74, 2016. Doi: 10.17129/botsci.552
- [39] Tezara W., Valencia E., Reynel V., Bolaños M., Blanco H. Actividad fotosintética y su relación con el rendimiento de diez clones de cacao nacional. *Revista ESPAMCIENCIA*, 11(1):19–27, 2020
- [40] Tezara W., De Almeida J., Valencia E., Cortes JL., Bolaños MJ. Actividad fotoquímica de clones élites de cacao (*Theobroma cacao* L.) Ecuatoriano en el norte de la provincia Esmeraldas. *Investigación y Saberes*, IV(3):37–52, 2015
- [41] Lahive F., Hadley P., Daymond AJ. The impact of elevated CO<sub>2</sub> and water deficit stress on growth and photosynthesis of juvenile cacao (*Theobroma cacao* L.). *Photosynthetica*, 56(3):911–20, 2018. Doi: 10.1007/s11099-017-0743-y LB - Lahive2017
- [42] Hebbar KB., Apshara E., Chandran KP., Prasad PVV. Effect of elevated CO<sub>2</sub>, high temperature, and water deficit on growth, photosynthesis, and whole plant water use efficiency of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of Biometeorology*, 64(1):47–57, 2020. Doi: 10.1007/s00484-019-01792-0
- [43] Balasimha D., Apshara SE., Jose CT. Genotypic variations in chlorophyll fluorescence and stomatal conductance of cocoa in relation to drought tolerance. *J Plant Crop*, 41:40–5, 2013
- [44] Alban M., Apshara S., Hebbar KB., Mathias T., Séverin A. Morpho-physiological criteria for assessment of two month old cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes for drought tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21:23–30, 2016. Doi: 10.1007/s40502-015-0195-y
- [45] Apshara SE., Rajesh MK., Balasimha D. Assessment of morphological, physiological and molecular characteristics of cocoa accessions from Central and

South America in relation to drought tolerance. *Journal of Plantation Crops*, 41(3):389–97, 2013

- [46] Jegadeeswari V., Kumar N. Effect of water deficit on physiological and biochemical responses in cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3):1820–4, 2019
- [47] Jegadeeswari V., Arunkumar K., Baby Santhini BG. Root morphology and root characters of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) types at 100 and 50 percent field capacity under water deficit condition. *Journal of Phytology*, 11:10–5, 2019. Doi: 10.25081/jp.2019.v11.3786
- [48] Alban KA., Apsara SE., Mathias TG. Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance in cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes at young age. *African Journal of Science and Research*, 4(5):18–23, 2015
- [49] Abdulai I., Vaast P., Hoffmann MP., Asare R., Jassogne L., Van Asten P., Rotter RP., Graefe S. Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global Change Biology*, 24(1):273–86, 2018. Doi: 10.1111/gcb.13885
- [50] Ofori A., Padi FK., Acheampong K., Lowor S. Genetic variation and relationship of traits related to drought tolerance in cocoa (*Theobroma cacao* L.) under shade and no-shade conditions in Ghana. *Euphytica*, 201:411–21, 2015. Doi: 10.1007/s10681-014-1228-8
- [51] Ofori A., Konlan S., Dadzie MA., Amoah FM. Genotypic Performance of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) during Establishment under Natural Drought Stress. *Journal of Crop Improvement*, 28(6):804–24, 2014. Doi: : 10.1080/15427528.2014.947529
- [52] Acheampong K., Hadley P., Daymond AJ. Photosynthetic activity and early growth of four cacao genotypes as influenced by different shade regimes under West African dry and wet season conditions. *Experimental Agriculture*, 49(01):31–42, 2013. Doi: 10.1017/S0014479712001007
- [53] Zakariyya F., Setyawan B., Wahyu Susilo A. Stomatal, Proline, and Leaf Water Status Characters of Some Cocoa Clones (*Theobroma cacao* L.) on Prolonged Dry Season. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 33(2):109, 2017. Doi: 10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v33i2.264
- [54] Susilo AW., Sobir S., Wuriandani A., Wirnas D. Seedling performance of cocoa genotypes (*Theobroma cacao* L.) in Drought Stress Condition. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 35(3):167–76, 2019. Doi: 10.22302/iccri.jur.pelitaperkebunan.v35i3.375
- [55] Schwendenmann L., Veldkamp E., Moser G., Hölscher D., Köhler M., Clough Y., Anas I., Djajakirana G., Erasmi S., Hertel D., Leitner D., Leuschner C., Michalzik B., Propastin P., Tjoa A., Tschardt T., van Straaten O. Effects of an

experimental drought on the functioning of a cacao agroforestry system, Sulawesi, Indonesia. *Global Change Biology*, 16(5):1515–30, 2010. Doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02034.x

- [56] Moser G., Leuschner C., Hertel D., Hölscher D., Köhler M., Leitner D., Michalzik B., Prihastanti E., Tjitrosemito S., Schwendenmann L. Response of cocoa trees (*Theobroma cacao*) to a 13-month desiccation period in Sulawesi, Indonesia. *Agroforestry Systems*, 79(2):171–87, 2010. Doi: doi.org/10.1007/s10457-010-9303-1
- [57] Deng X., Joly RJ., Hahn DT. The influence of plant water deficit on distribution of <sup>14</sup>C-labelled assimilates in cacao seedlings. *Annals of Botany*, 66(2):211–7, 1990
- [58] Deng X., Joly RJ., Hahn DT. Effects of plant water deficit on the daily carbon balance of leaves of cacao seedlings. *Physiologia Plantarum*, 77(3):407–12, 1989. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05661.x
- [59] Deng X., Joly RJ., Hahn DT. Effects of plant water deficit on the daily carbon balance of leaves of cacao seedlings. *Physiologia Plantarum*, 77(3):407–12, 1989. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05661.x
- [60] Bae H., Kim SH., Kim MS., Sicher RC., Lary D., Strem MD., Natarajan S., Bailey BA. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(2):174–88, 2008. Doi: 10.1016/j.plaphy.2007.10.014
- [61] Bae H., Sicher RC., Kim MS., Kim SH., Strem MD., Melnick RL., Bailey BA. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11):3279–95, 2009. Doi: 10.1093/jxb/erp165
- [62] Ayegboyin KO., Akinrinde EA. Effect of Water Deficit Imposed during the Early Developmental Phase on Photosynthesis of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Agricultural Sciences*, 7:11–9, 2016. Doi: 10.4236/as.2016.71002
- [63] Araque O., Jaimez RE., Tezara W., Coronel I., Urich R., Espinoza W. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Experimental Agriculture*, 48(4):513–22, 2012. Doi: 10.1017/S0014479712000427
- [64] Herrera A., Tezara W., Marín O., Rengifo E. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis in trees of a tropical seasonally flooded forest. *Physiologia Plantarum*, 134(1):41–8, 2008. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01099.x
- [65] Carr MK V., Lockwood G. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.): A Review. *Experimental Agriculture*, 47(4):653–76, 2011. Doi: 10.1017/s0014479711000421

- [66] Nair KPP. 5 - Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*, London: Elsevier, 131–80, 2010
- [67] Ortiz-Rodriguez OO., Naranjo CA., García-Caceres RG., Villamizar-Gallardo RA. Water footprint assessment of the Colombian cocoa production TT - Avaliação de pegada hídrica da produção de cacau colombiano. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19(9):823–8, 2015. Doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v19n9p823-828
- [68] Jaimez RE., Tezara W., Coronel I., Urich R. Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*): su manejo en el sistema agroforestal. Sugerencias para su mejoramiento en Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 52(2):253–8, 2008. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11554/6089>
- [69] Daymond AJ., Tricker PJ., Hadley P. Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. *Biologia Plantarum*, 55(1):99–104, 2011. Doi: 10.1007/s10535-011-0013-y
- [70] Argout X., Fouet O., Wincker P., Gramacho K., Legavre T., Sabau X., Risterucci AM., Da Silva C., Cascardo J., Allegre M., Kuhn D., Verica J., Courtois B., Looor G., Babin R., Sounigo O., Ducamp M., Guiltinan MJ., Ruiz M., Alemanno L., Machado R., Phillips W., Schnell R., Gilmour M., Rosenquist E., Butler D., Maximova S., Lanaud C. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*, 9:512, 2008. Doi: 10.1186/1471-2164-9-512
- [71] Argout X., Salse J., Aury J-MM., Guiltinan MJ., Droc G., Gouzy J., Allegre M., Chaparro C., Legavre T., Maximova SN. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet*, 43(2):101–8, 2011. Doi: 10.1038/ng.736 LB - Argout2011
- [72] Argout X., Martin G., Droc G., Fouet O., Labadie K., Rivals E., Aury JM., Lanaud C. The cacao Criollo genome v2.0: an improved version of the genome for genetic and functional genomic studies. *BMC Genomics*, 18:730, 2017. Doi: 10.1186/s12864-017-4120-9
- [73] Morrissey J., Stack JC., Valls R., Motamayor JC. Low-cost assembly of a cacao crop genome is able to resolve complex heterozygous bubbles. *Horticulture Research*, 6(1):44, 2019. Doi: 10.1038/s41438-019-0125-7
- [74] Motamayor JC., Mockaitis K., Schmutz J., Haiminen N., III Livingstone D., Cornejo O., Findley SD., Zheng P., Utro F., Royaert S., Saski C., Jenkins J., Podicheti R., Zhao M., Scheffler BE., Stack JC., Feltus FA., Mustiga GM., Amores F., Phillips W., Marelli JP., May GD., Shapiro H., Ma J., Bustamante CD., Schnell RJ., Main D., Gilbert D., Parida L., Kuhn DN. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biol*, 14(r53):24, 2013. Doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r53

- [75] Shinozaki K., Urano K., Maruyama K., Takahashi F. Drought Stress A2 - Thomas, Brian. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, 1:8–15, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00082-4>
- [76] Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran L-SP. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5:86, 2014. Doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- [77] Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Le DT., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T., Sakakibara H., Schmölling T., Tran L-SP. Analysis of Cytokinin Mutants and Regulation of Cytokinin Metabolic Genes Reveals Important Regulatory Roles of Cytokinins in Drought, Salt and Abscisic Acid Responses, and Abscisic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6):2169–83, 2011. Doi: 10.1105/tpc.111.087395
- [78] Ara N., Nakkanong K., Lv W., Yang J., Hu Z., Zhang M. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and their interspecific inbred line “Maxchata.” *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12):24008–28, 2013. Doi: 10.3390/ijms141224008
- [79] Kuromori T., Seo M., Shinozaki K. ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 23(6):513–22, 2018. Doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.001
- [80] Noctor G., Mhamdi A., Foyer CH. Oxidative stress and antioxidative systems: Recipes for successful data collection and interpretation. *Plant Cell and Environment*, 39(5):1140–60, 2016. Doi: 10.1111/pce.12726
- [81] Jain M., Nagar P., Goel P., Singh AK., Kumari S., Mustafiz A. Second messengers: Central regulators in plant abiotic stress response. *Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective*, Singapore: Springer Singapore, 47–94, 2018. Doi: 10.1007/978-981-10-7479-0\_2
- [82] Zenda T., Liu S., Wang X., Liu G., Jin H., Dong A., Yang Y., Duan H. Key maize drought-responsive genes and pathways revealed by comparative transcriptome and physiological analyses of contrasting inbred lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6):1–30, 2019. Doi: 10.3390/ijms20061268
- [83] Min H., Chen C., Wei S., Shang X., Sun M., Xia R., Liu X., Hao D., Chen H., Xie Q. Identification of Drought Tolerant Mechanisms in Maize Seedlings Based on Transcriptome Analysis of Recombination Inbred Lines. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2016. Doi: 10.3389/fpls.2016.01080
- [84] Zheng J., Fu J., Gou M., Huai J., Liu Y., Jian M., Huang Q., Guo X., Dong Z., Wang H., Wang G. Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology*, 2010. Doi: 10.1007/s11103-009-9579-6
- [85] Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. The transcriptional

regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Abiotic Stress: Molecular Genetics and Genomics*,:25, 2014

- [86] Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exper Botany*, 58(2):221–7, 2007. Doi: 10.1093/jxb/erl164 LB - Shinozaki2007
- [87] Larcher W. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media, 2003
- [88] Azcón - Bieto J., Talón M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 669p, 2013
- [89] Chaves MM., Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4):551–60, 2009. Doi: 10.1093/aob/mcn125
- [90] Dostert N., Roque J., Cano A., La Torre MI., Weigend M., Luebert F. Hoja botánica: Cacao. *Theobroma cacao* L., 2012
- [91] Almeida A-A., Valle RR. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4):425–48, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400011>
- [92] Sena Gomes AR., Andrade Sodr e G., Gultinan M., Lockwood R., Maximova S., Laliberte B., End M. *Supplying new cocoa planting material to farmers: a review of propagation methodologies*. Roma, Italia: Bioversity International
- [93] Benjamin T., Lundy M., Abbott P., Burniske G., Croft M., Fenton M., Kelly C., Rodriguez-Camayo F., Wilcox M. An Analysis of the supply chain of Cacao in Colombia, 2018. Doi: 10.13140/RG.2.2.19395.04645
- [94] Batista L. Guía técnica: el cultivo de cacao, CEDAF, 2009. Recuperado de: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>
- [95] García Lozano J. Caracterización de las respuestas fisiológicas y bioquímicas en tres clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) sometidos a diferentes niveles de déficit hídrico, 2014. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/52256>
- [96] Zarrillo S., Gaikwad N., Lanaud C., Powis T., Viot C., Lesur I., Fouet O., Argout X., Guichoux E., Salin F., Solorzano RL., Bouchez O., Vignes H., Severts P., Hurtado J., Yopez A., Grivetti L., Blake M., Valdez F. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*, 2(12):1879–88, 2018. Doi: 10.1038/s41559-018-0697-x
- [97] Motamayor JC., Lachenaud P., Silva E Mota JW., Loor R., Kuhn DN., Brown JS., da Silva e Mota JW., Loor R., Kuhn DN., Brown JS., Schnell RJ. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS One*, 3(10):e3311, 2008. Doi: 10.1371/journal.pone.0003311 LB -

Motamayor2008

- [98] Motamayor JC., Risterucci AM., Heath M., Lanaud C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91(3):322–30, 2003. Doi: 10.1038/sj.hdy.6800298
- [99] De la Cruz J., Vargas M., Del Angel O. Cacao: operaciones poscosecha. *AGST/FAO Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*, 2012. Recuperado de: <Http://Www.Fao.Org/3/a-Au995s.Pdf>
- [100] Bekele FL., Bekele I., Butler DR., Bidaisee GG. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5):933–48, 2006. Doi: 10.1007/10722-004-6692-x
- [101] Garcia C., Marelli J-P., Motamayor JC., Villela C. Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Culture Protocols*, Springer, 227–45, 2018. Doi: [doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_15](doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_15)
- [102] Johnson ES., Bekele FL., Brown SJ., Song Q., Zhang D., Meinhardt LW., Schnell RJ. Population structure and genetic diversity of the Trinitario cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Science*, 49(2):564–72, 2009. Doi: 10.2135/cropsci2008.03.0128
- [103] Boza EJ., Motamayor JC., Amores FM., Cedeno-Amador S., Tondo CL., Livingstone DS., Schnell RJ., Gutiérrez OA. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: its impact and significance on global cacao improvement and production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(2):219–29, 2014. Doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.219>
- [104] Amores FM., Vasco SA., Eskes AB., Suarez C., Quiroz JG., Loo RG., Jimenez JC., Zambrano J., Bolaños MJ., Reynel VH. On-farm and on-station selection of new cocoa varieties in Ecuador. Final Report of the CFC/ICCO/Biodiversity International Project on cocoa Productivity and Quality Improvement: A Participatory Approach, *CFC, Amsterdam, The Netherlands/ICCO, London, UK/Biodiversity International, Rome, Italy*, 59–72, 2011. Available at: [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Collaborative\\_and\\_participatory\\_approaches\\_to\\_cocoa\\_variety\\_improvement\\_1444.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Collaborative_and_participatory_approaches_to_cocoa_variety_improvement_1444.pdf)
- [105] Kozicka M., Tacconi F., Horna D., Gotor E. Forecasting cocoa yields for 2050, *Biodiversity International*, Rome, Italy. 49p. ISBN: 978-92-9255-114-8, 2018. Available at: <https://hdl.handle.net/10568/93236>
- [106] FAO. Base de datos FAOSTAT, estadísticas de cultivos, 2021
- [107] Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. Cadena de Cacao, *Minagricultura*, Bogotá, Colombia, 27p, 2020. Recuperado de: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31.CifrasSectoriales.pdf>

- [108] Ríos, F., Ruiz, A., Lecaro, J. RC. Estrategias país para la oferta de cacao especiales -Políticas e iniciativas privadas exitosas en el Perú, Ecuador, Colombia y República Dominicana. *Fundación Swisscontact Colombia*, 140p, 2017. Recuperado de: [https://www.colombiamascompetitiva.com/wp-content/uploads/2018/10/Nuevos\\_Caminos\\_Cacaos\\_Especiales.pdf](https://www.colombiamascompetitiva.com/wp-content/uploads/2018/10/Nuevos_Caminos_Cacaos_Especiales.pdf)
- [109] Charry A., Castro-Llanos F, Nunez-Castro A. Colombian cacao, forests and peace initiative= Estudio de línea base de la cadena del cacao en Colombia. *International Center for Tropical Agriculture (CIAT)*, Cali, Colombia, 55p, 2019. Recuperado de: [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/102209/CIAT\\_CBP\\_201905.pdf?sequence=1](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/102209/CIAT_CBP_201905.pdf?sequence=1)
- [110] Carvajal, J., Valencia, W., Enciso, L., Vega, A., Jerez, M., Perea, W., Ramirez, R. Análisis de la fase inicial de diseño e implementación del Programa Nacional de Sustitución de Cultivos de Uso Ilícito–PNIS. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 116p, 2017. Recuperado de: <https://verdadabierta.com/wp-content/uploads/2018/11/Informe-PNIS-2017-para-web-1.pdf>
- [111] Voora V., Bermúdez S., Larrea C. Global Market Report: Cocoa. *International Institute for Sustainable Development*, Canada, 13p, 2019. Available at: <https://www.jstor.org/stable/pdf/resrep22025.pdf>
- [112] Daymond AJ., Hadley P. The effects of temperature and light integral on early vegetative growth and chlorophyll fluorescence of four contrasting genotypes of cacao (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 145(3):257–62, 2004. Doi: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00381.x
- [113] Balasimha D., Daniel E V., Bhat PG. Influence of environmental factors on photosynthesis in cocoa trees. *Agricultural and Forest Meteorology*, 55(1–2):15–21, 1991. Doi: 10.1016/0168-1923(91)90019-M
- [114] Salazar JCS., Melgarejo LM., Casanoves F., Di Rienzo JA., DaMatta FM., Armas C. Photosynthesis limitations in cacao leaves under different agroforestry systems in the Colombian Amazon. *PLoS ONE*, 13(11), 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0206149
- [115] De Almeida J., Herrera A., Tezara W. Phenotypic plasticity to photon flux density of physiological, anatomical and growth traits in a modern Criollo cocoa clone. *Physiologia Plantarum*, 166(3):821–32, 2019. Doi: 10.1111/ppl.12840
- [116] Galyuon IKA., McDavid CR., Lopez FB., Spence JA. effect of irradiance level on cocoa (*Theobroma cacao* L.). I. Growth and leaf adaptations. *Tropical Agriculture*, 1996. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/264550849>
- [117] Jaimez RE., Amores Puyutaxi F., Vasco A., Gastón L., Tarqui O., Quijano G., Jimenez JC., Tezara W. Photosynthetic response to low and high light of cacao growing without shade in an area of low evaporative demand. *Acta Biológica*

*Colombiana*, 23(1):95–103, 2018. Doi:<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n1.64962>

- [118] Uribe A., Méndez H., Mantilla J. Efecto de niveles de nitrógeno, fósforo y potasio en la producción de cacao en Colombia. *Informaciones Agronómicas*, 41:1–4, 2000. Recuperado de: [http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/19\\_Fertilizacion\\_del\\_cacao.pdf](http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/19_Fertilizacion_del_cacao.pdf)
- [119] Alvim P de T. El problema del sombreado del cacao bajo el punto de vista fisiológico. *Agronomía*, 25(92):34–42, 1958
- [120] Leite JBV. *Cacaueiro: Propagação por estacas caulinares e plantio no semi-árido do estado da Bahia*. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/105174>
- [121] Radersma S., De Ridder N. Computed evapotranspiration of annual and perennial crops at different temporal and spatial scales using published parameter values. *Agricultural Water Management*, 31(1–2):17–34, 1996. Doi: 10.1016/0378-3774(95)01235-4
- [122] Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology and Development*:761, 2014
- [123] Afzal Z., Howton TC., Sun Y., Mukhtar MS. The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, 4(1), 2016. Doi: 10.3390/jdb4010009
- [124] Lopez D., Venisse J-S., Fumanal B., Chaumont F., Guillot E., Daniels MJ., Cochard H., Julien J-L., Gousset-Dupont A. Aquaporins and Leaf Hydraulics: Poplar Sheds New Light. *Plant and Cell Physiology*, 54(12):1963–75, 2013. Doi: 10.1093/pcp/pct135
- [125] Lambers H., Oliveira RS. *Plant Water Relations*. *Plant Physiological Ecology*, Springer International Publishing, 187–263, 2019
- [126] Kaldenhoff R., Ribas-Carbo M., Sans J., Lovisolo C., Heckwolf M., Uehlein N. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell & Environment*, 31(5):658–66, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01792.x>
- [127] Maurel C., Verdoucq L., Rodrigues O. Aquaporins and plant transpiration. *Plant, Cell & Environment*, 39(11):2580–7, 2016. Doi: 10.1111/pce.12814
- [128] Małgorzata Kurowska M. TIP Aquaporins in Plants: Role in Abiotic Stress Tolerance. *Abiotic Stress in Plants*, IntechOpen, 2020. Doi: 10.5772/intechopen.94165
- [129] Verdoucq L., Maurel C. Plant Aquaporins. *Advances in Botanical Research*, vol. 87, Academic Press Inc., 25–56, 2018. Doi: 10.1016/bs.abr.2018.09.011
- [130] Liu Y., Sun M., Zhao S., Qi G., Zhang X., Guo S. Visualization of water transport pathways in various organs on the fruit-bearing shoot of walnut trees. *Bosque*, 41(2):193–201, 2020. Doi: 10.4067/S0717-92002020000200193

- [131] Cosgrove DJ. *Plant Cell Growth and Elongation*. eLS, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Doi: 10.1002/9780470015902.a0001688.pub2
- [132] Levitt J. *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press.
- [133] Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman JF., Dommes J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37(3 LB-Gaspar2002):263–85, 2002. Doi: 10.1023/a:1020835304842
- [134] Salehi-Lisar SY., Bakhshayeshan-Agdam H. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1*, Springer, 1–16, 2016. Doi: 10.1007/978-3-319-28899-4\_1
- [135] Cramer GR., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11:163, 2011. Doi: 10.1186/1471-2229-11-163
- [136] FAO. *Climate Change, Water and Food Security*, 2011
- [137] Lincoln T., Eduardo Z. *Stress Physiology*. In: Sinauer Associates Publishers I, editor. *Plant Physiology*, Sunderland, USA, 764, 2006
- [138] Blum A. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, 112(2–3):119–23, 2009. Doi: 10.1016/j.fcr.2009.03.009
- [139] Centritto M., Loreto F., Chartzoulakis K. The use of low [CO<sub>2</sub>] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant, Cell & Environment*, 26(4):585–94, 2003. Doi: doi:10.1046/j.1365-3040.2003.00993.x
- [140] Soltys-Kalina D., Plich J., Strzelczyk-Żyta D., Śliwka J., Marczewski W. The effect of drought stress on the leaf relative water content and tuber yield of a half-sib family of ‘Katahdin’-derived potato cultivars. *Breeding Science*, 66(2):328–31, 2016. Doi: 10.1270/jsbbs.66.328
- [141] Tyerman SD., Niemietz CM., Bramley H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*, 25(2):173–94, 2002. Doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00791.x
- [142] Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL. *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons
- [143] Lambers H., Oliveira RS. Plant physiological ecology. *Plant Physiological Ecology*,:1–699, 2019. Doi: 10.1007/978-3-030-29639-1
- [144] Flexas J., Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C-3 plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot*, 89, 2002. Doi:

10.1093/aob/mcf027 LB - Flexas2002

- [145] Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey TD. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*,:269–79, 2004. Doi: 10.1055/s-2004-820867
- [146] Tambussi EA. Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio, 2006. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2445/36093>
- [147] Casierra-Posada F. Fotoinhibición: Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(1):114–23, 2007. Doi: 10.17584/rcch.2007v1i1.1150
- [148] Moreno SG., Vela HP., Alvarez MOS. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4):119–29, 2008. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/490/49011464003.pdf>
- [149] Baker NR. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol*, 59:89–113, 2008. Doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- [150] Maxwell K., Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659–68, 2000. Doi:092759/annurev.arplant.59.032607.092759
- [151] Melgarejo LM., Hernández S., Barrera J., Solarte ME., Suárez D., Pérez LV., Rojas YA., Cruz Aguilar M., Moreno Álvarez LG., Crespo S. Experimentos en fisiología vegetal:277, 2010. Recuperado de: [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Experimentos\\_en\\_fisiologia\\_Vegetal/ExperimentosEnFisiologiaVegetal.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Experimentos_en_fisiologia_Vegetal/ExperimentosEnFisiologiaVegetal.pdf)
- [152] Lambers H., Oliveira RS. Photosynthesis, Respiration, and Long-Distance Transport: Photosynthesis. *Plant Physiological Ecology*, Springer International Publishing, 11–114, 2019. Doi: 10.1007/978-3-030-29639-1\_2
- [153] Noctor G. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, 29(3):409–25, 2006. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01476.x
- [154] Demidchik V. Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Plant Ion Channels. *Signaling and communication in Plants*, 207–32, 2010. Doi: 10.1007/978-3-642-10494-7\_11
- [155] Noctor G., Mhamdi A., Foyer CH. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology*,:113.233478, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.113.233478>
- [156] Reigosa Roger M., Pedrol N., Sánchez-Moreiras A. La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis. España, 2003

- [157] Nakashima K., Takasaki H., Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim et Biophys Acta (BBA)-Gene Regulat Mechanisms*, 1819, 2012. Doi: 10.1016/j.bbagr.2011.10.005 LB - Nakashima2012
- [158] Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3):296–302, 2007. Doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.014 LB - Seki2007
- [159] Cabuslay GS., Ito O., Alejar AA. Physiological evaluation of responses of rice (*Oryza sativa* L.) to water deficit. *Plant Science*, 163(4):815–27, 2002. Doi: 10.1016/S0168-9452(02)00217-0
- [160] Lisar SYS., Motafakkerzad R., Hossain MM., Rahman IMM. Water stress in plants: causes, effects and responses. *Water stress*, InTech, 2012. Doi: 10.5772/39363
- [161] Azcón-Bieto J., Talón M. Fisiología de las plantas y el estrés. In: McGRAW-HILL, editor. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Madrid: I Edicions de la Universitat de Barcelona, 651, 2008
- [162] Basu S., Ramegowda V., Kumar A., Pereira A. Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5, 2016. Doi: 10.12688/f1000research.7678.1
- [163] Moradi P. Key plant products and common mechanisms utilized by plants in water deficit stress responses. *Botanical Sciences*, 94(4):671, 2016. Doi: 10.17129/botsci.709
- [164] Valladares F., Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Camarero JJ., Corcuera L., Sisó S., Gil-Pelegrín E. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. *Ecología Del Bosque Mediterráneo En Un Mundo Cambiante*. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF S.A. Madrid, 2004
- [165] Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1):185–212, 2009. Doi: 10.1051/agro:2008021
- [166] Bhattacharjee S., Saha AK. Plant Water-Stress Response Mechanisms. *Approaches to Plant Stress and their Management*, New Delhi: Springer India, 149–72, 2014. Doi: 10.1007/978-81-322-1620-9\_8
- [167] Hauser F., Li Z., Waadt R., Schroeder JI. SnapShot: Abscisic Acid Signaling. *Cell*, 171(7):1708-1708.e0, 2017. Doi: 10.1016/j.cell.2017.11.045
- [168] Geiger D., Maierhofer T., AL-Rasheid KAS., Scherzer S., Mumm P., Liese A., Ache P., Wellmann C., Marten I., Grill E., Romeis T., Hedrich R. Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1. *Science Signaling*, 4(173):ra32 LP-ra32, 2011. Doi: 10.1126/scisignal.2001346

- [169] Hedrich R., Geiger D. Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytologist*, 216(1):46–61, 2017. Doi: 10.1111/nph.14685
- [170] Jarzyniak KM., Jasiński M. Membrane transporters and drought resistance - A complex issue. *Frontiers in Plant Science*,:687, 2014. Doi: 10.3389/fpls.2014.00687
- [171] Ehler C., Maurel C., Tardieu F., Simonneau T. Aquaporin-Mediated Reduction in Maize Root Hydraulic Conductivity Impacts Cell Turgor and Leaf Elongation Even without Changing Transpiration. *Plant Physiology*, 150(2):1093–104, 2009. Doi: 10.1104/pp.108.131458
- [172] Wu Q., Zhang X., Peirats-Llobet M., Belda-Palazon B., Wang X., Cui S., Yu X., Rodriguez PL., An C. Ubiquitin Ligases RGLG1 and RGLG5 Regulate Abscisic Acid Signaling by Controlling the Turnover of Phosphatase PP2CA. *The Plant Cell*, 28(9):2178–96, 2016. Doi: 10.1105/tpc.16.00364
- [173] Parmar R., Seth R., Singh P., Singh G., Kumar S., Sharma RK. Transcriptional profiling of contrasting genotypes revealed key candidates and nucleotide variations for drought dissection in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Scientific Reports*, 9(1):7487, 2019. Doi: 10.1038/s41598-019-43925-w
- [174] Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol*, 115:327–34, 1997. Doi: 10.1104/pp.115.2.327
- [175] Zhu L., Guo J., Zhu J., Zhou C. Enhanced expression of EsWAX1 improves drought tolerance with increased accumulation of cuticular wax and ascorbic acid in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 75:24–35, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.028>
- [176] Seo PJ., Lee SB., Suh MC., Park M-J., Go YS., Park C-M. The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3):1138–52, 2011. Doi: 10.1105/tpc.111.083485
- [177] Yeats TH., Rose JKC. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*, 163(1):5–20, 2013. Doi: 10.1104/pp.113.222737
- [178] McFarlane HE., Watanabe Y., Yang W., Huang Y., Ohlrogge J., Samuels L. Golgi and TGN-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. *Plant Physiology*,:pp.113.234583, 2014. Doi: 10.1104/pp.113.234583
- [179] DeBono A., Yeats TH., Rose JKC., Bird D., Jetter R., Kunst L., Samuels L. LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *The Plant Cell*, 21(4):1230–8, 2009. Doi: 10.1105/tpc.108.064451

- [180] Zazimalová E., Murphy AS., Yang H., Hoyerová K., Hosek P. Auxin transporters-- why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(a001552):14, 2010. Doi: 10.1101/cshperspect.a001552
- [181] Wang L-L., Chen A-P., Zhong N-Q., Liu N., Wu X-M., Wang F., Yang C-L., Romero MF., Xia G-X. The *Thellungiella salsa* Tonoplast Aquaporin TsTIP1;2 Functions in Protection Against Multiple Abiotic Stresses. *Plant and Cell Physiology*, 55(1):148–61, 2014. Doi: 10.1093/pcp/pct166
- [182] Moshelion M., Halperin O., Wallach R., Oren R., Way D. Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant, Cell & Environment*, 38(9):1785–93, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12410>
- [183] Lehmann S., Gummy C., Blatter E., Boeffel S., Fricke W., Rentsch D. In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *Journal of Experimental Botany*, 62(2):787–96, 2011. Doi: 10.1093/jxb/erq320
- [184] Wang X., Xu M., Gao C., Zeng Y., Cui Y., Shen W., Jiang L. The roles of endomembrane trafficking in plant abiotic stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1):55–69, 2020. Doi: 10.1111/jipb.12895
- [185] Aridor M., Traub LM. Cargo Selection in Vesicular Transport: The Making and Breaking of a Coat. *Traffic*, 3(8):537–46, 2002. Doi: 10.1034/J.1600-0854.2002.30804.X
- [186] Ebine K., Inoue T., Ito J., Ito E., Uemura T., Goh T., Abe H., Sato K., Nakano A., Ueda T. Plant Vacuolar Trafficking Occurs through Distinctly Regulated Pathways. *Current Biology*, 24(12):1375–82, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.004>
- [187] Yang Y., Sornaraj P., Borisjuk N., Kovalchuk N., Haefele SM. Transcriptional Network Involved in Drought Response and Adaptation in Cereals. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, InTech, 2016
- [188] Kohli A., Sreenivasulu N., Lakshmanan P., Kumar PP. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*,:945–57, 2013. Doi: 10.1007/s00299-013-1461-y
- [189] Verma V., Ravindran P., Kumar PP. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16(1):86, 2016. Doi: 10.1186/s12870-016-0771-y
- [190] Li S., Yu X., Cheng Z., Yu X., Ruan M., Li W., Peng M. Global gene expression analysis reveals crosstalk between response mechanisms to cold and drought stresses in cassava seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01259
- [191] Zhu Y-N., Shi D-Q., Ruan M-B., Zhang L-L., Meng Z-H., Liu J., Yang W-C.

Transcriptome Analysis Reveals Crosstalk of Responsive Genes to Multiple Abiotic Stresses in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PLOS ONE*, 8(11):e80218, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0080218

- [192] Singh D., Laxmi A. Transcriptional regulation of drought response: A tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in Plant Science*,:895, 2015. Doi: 10.3389/fpls.2015.00895
- [193] Ahmed RF., Irfan M., Shakir HA., Khan M., Chen L. Engineering drought tolerance in plants by modification of transcription and signalling factors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1):781–9, 2020. Doi: 10.1080/13102818.2020.1805359
- [194] Fujita Y., Fujita M., Satoh R., Maruyama K., Parvez MM., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(12):3470 LP – 3488, 2005. Doi: 10.1105/tpc.105.035659
- [195] Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4):509–25, 2011. Doi: 10.1007/s10265-011-0412-3
- [196] Yue X., Zhang G., Zhao Z., Yue J., Pu X., Sui M., Zhan Y., Shi Y., Wang Z., Meng G., Zhao Z., An L. A Cryophyte Transcription Factor, CbABF1, Confers Freezing, and Drought Tolerance in Tobacco. *Frontiers in Plant Science*,:699, 2019. Doi: 10.3389/fpls.2019.00699
- [197] Huang L., Wang Y., Wang W., Zhao X., Qin Q., Sun F., Hu F., Zhao Y., Li Z., Fu B., Li Z. Characterization of Transcription Factor Gene OsDRAP1 Conferring Drought Tolerance in Rice. *Frontiers in Plant Science*,:94, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2019.00699
- [198] Eftekhari A., Baghizadeh A., Yaghoobi MM., Abdolshahi R. Differences in the drought stress response of DREB2 and CAT1 genes and evaluation of related physiological parameters in some bread wheat cultivars. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(4):709–16, 2017. Doi: 10.1080/13102818.2017.1316214
- [199] Shim JS., Oh N., Chung PJ., Kim YS., Choi Y Do., Kim J-K. Overexpression of OsNAC14 Improves Drought Tolerance in Rice. *Frontiers in Plant Science*, 9:310, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.00310
- [200] Ebrahimian-Motlagh S., Ribone PA., Thirumalaikumar VP., Allu AD., Chan RL., Mueller-Roeber B., Balazadeh S. JUNGBRUNNEN1 Confers Drought Tolerance Downstream of the HD-Zip I Transcription Factor AtHB13. *Frontiers in Plant Science*,:2118, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.02118
- [201] Xu X., Yao X., Lu L., Zhao D. Overexpression of the Transcription Factor NtNAC2

- Confers Drought Tolerance in Tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*, 36(4):543–52, 2018. Doi: 10.1007/s11105-018-1096-9
- [202] Fang Y., Liao K., Du H., Xu Y., Song H., Li X., Xiong L. A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice. *Journal of Experimental Botany*, 66(21):6803–17, 2015. Doi: 10.1093/jxb/erv386
- [203] Baldoni E., Genga A., Cominelli E. Plant MYB transcription factors: Their role in drought response mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015. Doi: 10.3390/ijms160715811
- [204] Xu W., Tang W., Wang C., Ge L., Sun J., Qi X., He Z., Zhou Y., Chen J., Xu Z., Ma Y-Z., Chen M. SiMYB56 Confers Drought Stress Tolerance in Transgenic Rice by Regulating Lignin Biosynthesis and ABA Signaling Pathway. *Frontiers in Plant Science*,:785, 2020. Doi: 10.3389/fpls.2020.00785
- [205] Tang Y., Bao X., Zhi Y., Wu Q., Guo Y., Yin X., Zeng L., Li J., Zhang J., He W., Liu W., Wang Q., Jia C., Li Z., Liu K. Overexpression of a MYB Family Gene, OsMYB6, Increases Drought and Salinity Stress Tolerance in Transgenic Rice. *Frontiers in Plant Science*,:168, 2019. Doi: 10.3389/fpls.2019.00168
- [206] Wang N., Zhang W., Qin M., Li S., Qiao M., Liu Z., Xiang F. Drought Tolerance Conferred in Soybean (*Glycine max. L*) by GmMYB84, a Novel R2R3-MYB Transcription Factor. *Plant and Cell Physiology*, 58(10):1764–76, 2017. Doi: 10.1093/pcp/pcx111
- [207] Yoon Y., Seo DH., Shin H., Kim HJ., Kim CM., Jang G. The role of stress-responsive transcription factors in modulating abiotic stress tolerance in plants. *Agronomy*, 10(6):788, 2020. Doi: 10.3390/agronomy10060788
- [208] Finatto T., Viana VE., Woyann LG., Busanello C., Maia LC da., Oliveira AC de. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? *Genetics and Molecular Biology*, 41(3):533–44, 2018. Doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0232
- [209] Guo Y., Ping W., Chen J., Zhu L., Zhao Y., Guo J., Huang Y. Meta-analysis of the effects of overexpression of WRKY transcription factors on plant responses to drought stress. *BMC Genetics*, 20(1), 2019. Doi: 10.1186/s12863-019-0766-4
- [210] Banerjee A., Roychoudhury A. WRKY proteins: Signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *Scientific World Journal*, 2015. Doi: 10.1155/2015/807560
- [211] Silva Monteiro De Almeida D., Oliveira Jordão Do Amaral D., Del-Bem LE., Bronze Dos Santos E., Santana Silva RJ., Peres Gramacho K., Vincentz M., Micheli F. Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease. *PLoS ONE*, 12(10), 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0187346

- [212] Borrone JW., Kuhn DN., Schnell RJ. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(3):495–507, 2004. Doi: 10.1007/s00122-004-1662-4
- [213] Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science*,:1387, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.01387
- [214] Sinha AK., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior*,:196–203, 2011. Doi: 10.4161/psb.6.2.14701
- [215] Dinesh A., Muralidhara B., Gangurde S., Yogeshwar M. Molecular response of plants to drought, cold and heat stress - A review. *Annual Research and Review in Biology*, 10(5), 2016. Doi: 10.9734/ARRB/2016/26700
- [216] Gill SS., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12):909–30, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- [217] Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad DT., Lee O., Kwak S-S., Kim DH., Nam J., Bahk J., Hong JC., Lee SY., Cho MJ., Lim CO., Yun D-J. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1):358–63, 2003. Doi: 10.1073/pnas.252641899
- [218] Zhu Y., Zuo M., Liang Y., Jiang M., Zhang J., Scheller HV., Tan M., Zhang A. MAP65-1a positively regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amplification and enhances brassinosteroid-induced antioxidant defence in maize. *Journal of Experimental Botany*, 64(12):3787–802, 2013. Doi: 10.1093/jxb/ert215
- [219] Laxa M., Liebthal M., Telman W., Chibani K., Dietz KJ. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 2019. Doi: 10.3390/antiox8040094
- [220] Ashraf M., Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*, 59, 2007. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.12.006 LB - Ashraf2007
- [221] Chen THH., Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 13(9):499–505, 2008. Doi: 10.1016/j.tplants.2008.06.007
- [222] Olvera-Carrillo Y., Campos F., Reyes JL., Garcarrubio A., Covarrubias AA. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(1):373–90, 2010. Doi: 10.1104/pp.110.158964

- [223] Lan T., Gao J., Zeng Q-Y. Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genetics & Genomes*, 9(1):253–64, 2013. Doi: 10.1007/s11295-012-0551-2
- [224] Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4):405–14, 2017. Doi: 10.1111/pbi.12659
- [225] Ul Haq S., Khan A., Ali M., Khattak AM., Gai WX., Zhang HX., Wei AM., Gong ZH. Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. Doi: 10.3390/ijms20215321
- [226] Knopf RR., Adam Z. Lumenal exposed regions of the D1 protein of PSII are long enough to be degraded by the chloroplast Deg1 protease. *Scientific Reports*, 8(1):5230, 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-23578-x
- [227] Adams III WW., Zarter CR., Mueh KE., Demmig-Adams B. Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment*, Springer, 49–64, 2008. Doi: 10.1007/1-4020-3579-9
- [228] Pérez-Rontomé C. *El ciclo de las xantofilas en plantas sometidas a estrés nutricional o climático*. Consejo superior de Investigaciones Científicas, 2000. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10261/3536>
- [229] Rangel Fajardo MA., Córdova Téllez L., López Andrade AP., Delgado Alvarado A., Zavaleta Mancera HA., Villegas Monter Á. Tolerancia a la desecación en semillas de tres orígenes genéticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3):175–82, 2011. Doi: 10.35196/rfm.2011.3.175
- [230] Kumar N., Jegadeeswari V. Dynamics of gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters of cocoa genotypes in response to water deficit. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6):415–9, 2019
- [231] Bertolde FZ., Almeida A-AF., Pirovani CP., Gomes FP., Ahnert D., Baligar VC., Valle RR. Physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to flooding. *Photosynthetica*, 50(3):447–57, 2012. Doi: 10.1007/s11099-012-0052-4
- [232] Ismail MR., Hassan AH., Dola K., Jalil MN. Growth, plant water relation and photosynthesis rate of young *Theobroma cacao* as influenced by water stress. *Pertanika*, 15(2):93–8, 1992
- [233] Baligar VC., Bunce JA., Machado RCR., Elson MK. Photosynthetic photon flux density, carbon dioxide concentration, and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica*, 46(2):216–21, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0035-7>

- [234] Varshney RK., Nayak SN., May GD., Jackson SA. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends Biotechnol*, 27, 2009. Doi: 10.1016/j.tibtech.2009.05.006 LB - Varshney2009
- [235] Mofatto LS., Carneiro F de A., Vieira NG., Duarte KE., Vidal RO., Alekcevetch JC., Cotta MG., Verdeil J-L., Lapeyre-Montes F., Lartaud M., Leroy T., De Bellis F., Pot D., Rodrigues GC., Carazzolle MF., Pereira GAG., Andrade AC., Marraccini P., de Araújo Carneiro F., Vieira NG., Duarte KE., Vidal RO., Alekcevetch JC., Cotta MG., Verdeil J-L., Lapeyre-Montes F., Lartaud M. Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology*, 16(1):94, 2016. Doi: 10.1186/s12870-016-0777-5
- [236] Brasileiro ACM., Morgante C V., Araujo ACG., Leal-Bertioli SCM., Silva AK., Martins ACQ., Vinson CC., Santos CMR., Bonfim O., Togawa RC., Saraiva MAP., Bertioli DJ., Guimaraes PM. Transcriptome Profiling of Wild *Arachis* from Water-Limited Environments Uncovers Drought Tolerance Candidate Genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6):1876–92, 2015. Doi: 10.1007/s11105-015-0882-x
- [237] Yates SA., Swain MT., Hegarty MJ., Chernukin I., Lowe M., Allison GG., Ruttink T., Abberton MT., Jenkins G., Skøt L. De novo assembly of red clover transcriptome based on RNA-Seq data provides insight into drought response, gene discovery and marker identification. *BMC Genomics*, 15(1):453, 2014. Doi: 10.1186/1471-2164-15-453
- [238] Xu J., Yuan Y., Xu Y., Zhang G., Guo X., Wu F., Wang Q., Rong T., Pan G., Cao M., Tang Q., Gao S., Liu Y., Wang J., Lan H., Lu Y. Identification of candidate genes for drought tolerance by whole-genome resequencing in maize. *BMC Plant Biology*, 14(1):83, 2014. Doi: 10.1186/1471-2229-14-83
- [239] Yang SS., Tu Z., Cheung F., Xu W., Lamb J., Jung H-. J., Vance C., Gronwald J. Using RNA-Seq for gene identification, polymorphism detection and transcript profiling in two alfalfa genotypes with divergent cell wall composition in stems. *BMC Genomics*, 12, 2011. Doi: 10.1186/1471-2164-12-199 LB - Yang2011
- [240] Trapnell C., Hendrickson DG., Sauvageau M., Goff L., Rinn JL., Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31(1):46–53, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.2450>
- [241] Riascos-Arcos JJ., Espitia Navarro HF., López Gerena J. Evaluación de las herramientas de secuenciación masiva (NGS) para identificar genes asociados con tolerancia al estrés hídrico en caña de azúcar. *Acta Agronómica*, 64:355–62, 2015. Doi: 10.15446/acag.v64n4.47772
- [242] Fan X-D., Wang J-Q., Yang N., Dong Y-Y., Liu L., Wang F-W., Wang N., Chen H., Liu W-C., Sun Y-P., Wu J-Y., Li H-Y. Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt, saline–alkali and drought stress by high-throughput Illumina

sequencing. *Gene*, 512(2):392–402, 2013. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.100>

- [243] Wang Z., Fang B., Chen J., Zhang X., Luo Z., Huang L., Chen X., Li Y. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Genomics*, 11, 2010. Doi: 10.1186/1471-2164-11-726 LB - Wang2010
- [244] Dossa K., Li D., Wang L., Zheng X., Liu A., Yu J., Wei X., Zhou R., Fonceka D., Diouf D., Liao B., Cissé N., Zhang X. Transcriptomic, biochemical and physiological investigations shed more light on responses to drought stress in two contrasting sesame genotypes. *Scientific Reports*, 7(1):8755, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-09397-6
- [245] Dudhate A., Shinde H., Tsugama D., Liu S., Takano T. Transcriptomic analysis reveals the differentially expressed genes and pathways involved in drought tolerance in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br]. *PLOS ONE*, 13(4):e0195908, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0195908
- [246] Bailey BA., Melnick RL., Strem MD., Crozier J., Shao J., Sicher R., Phillips-Mora W., Ali SS., Zhang D., Meinhardt L. Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. *Molecular Plant Pathology*, 15(7):711–29, 2014. Doi: 10.1111/mpp.12134
- [247] Pokou DN., Fister AS., Winters N., Tahi M., Klotioma C., Sebastian A., Marden JH., Maximova SN., Guiltinan MJ. Resistant and susceptible cacao genotypes exhibit defense gene polymorphism and unique early responses to *Phytophthora megakarya* inoculation. *Plant Molecular Biology*, 99(4–5):499–516, 2019. Doi: 10.1007/s11103-019-00832-y
- [248] Martin MLB-M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal*, 17, 2011. Doi: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- [249] Kopylova E., Noé L., Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24):3211–7, 2012. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts611
- [250] Sheng Q., Vickers K., Zhao S., Wang J., Samuels DC., Koues O., Shyr Y., Guo Y. Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. *Briefings in Functional Genomics*, 16(4):194–204, 2017. Doi: 10.1093/bfpg/elw035
- [251] Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley DR., Pimentel H., Salzberg SL., Rinn JL., Pachter L. RNA-SEQ With CuffLinks and TopHat. *Nature Protocols*, 7(3):562–78, 2013. Doi: 10.1038/nprot.2012.016.
- [252] Dobin A., Davis CA., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras TR. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1):15–21, 2013. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts635

- [253] Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, 10, 2009. Doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25 LB - Langmead2009
- [254] Kim D., Langmead B., Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12:357, 2015. Doi: 10.1038/nmeth.3317
- [255] Li W., Richter RA., Jung Y., Zhu Q., Li RW. Web-based bioinformatics workflows for end-to-end RNA-seq data computation and analysis in agricultural animal species. *BMC Genomics*, 17(1):761, 2016. Doi: 10.1186/s12864-016-3118-z
- [256] Germain PL., Vitriolo A., Adamo A., Laise P., Das V., Testa G. RNAontheBENCH: Computational and empirical resources for benchmarking RNAseq quantification and differential expression methods. *Nucleic Acids Research*, 44(11):5054–67, 2016. Doi: 10.1093/nar/gkw448
- [257] Sahraeian SME., Mohiyuddin M., Sebra R., Tilgner H., Afshar PT., Au KF., Bani Asadi N., Gerstein MB., Wong WH., Snyder MP., Schadt E., Lam HYK. Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis. *Nature Communications*, 8(1):59, 2017. Doi: 10.1038/s41467-017-00050-4
- [258] Bray NL., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5):525–7, 2016. Doi: 10.1038/nbt.3519
- [259] Patro R., Duggal G., Love MI., Irizarry RA., Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4):417–9, 2017. Doi: 10.1038/nmeth.4197
- [260] Patro R., Mount SM., Kingsford C. Sailfish enables alignment-free isoform quantification from RNA-seq reads using lightweight algorithms. *Nature Biotechnology*, 32(5):462–4, 2014. Doi: 10.1038/nbt.2862
- [261] Jin H., Wan YW., Liu Z. Comprehensive evaluation of RNA-seq quantification methods for linearity. *BMC Bioinformatics*, 18, 2017. Doi: 10.1186/s12859-017-1526-y
- [262] Anders S., Pyl PT., Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2):166–9, 2015. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu638
- [263] Liao Y., Smyth GK., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7):923–30, 2014. Doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
- [264] Schurch NJ., Schofield P., Gierliński M., Cole C., Sherstnev A., Singh V., Wrobel N., Gharbi K., Simpson GG., Owen-Hughes T., Blaxter M., Barton GJ. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA (New York, NY)*, 22(6):839–51, 2016. Doi:

10.1261/rna.053959.115

- [265] Costa-Silva J., Domingues D., Lopes FM. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLOS ONE*, 12(12):e0190152, 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0190152
- [266] Wu DC., Yao J., Ho KS., Lambowitz AM., Wilke CO. Limitations of alignment-free tools in total RNA-seq quantification. *BMC Genomics*, 19(1):510, 2018. Doi: 10.1186/s12864-018-4869-5
- [267] Love MI., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12):550, 2014. Doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- [268] Chen L., Wong G. Transcriptome Informatics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*,:324–40, 2019. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20204-5
- [269] Raudvere U., Kolberg L., Kuzmin I., Arak T., Adler P., Peterson H., Vilo J. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, 47(Web Server issue):W191–8, 2019. Doi: 10.1093/nar/gkz369
- [270] Du Z., Zhou X., Ling Y., Zhang Z., Su Z. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res*, 38, 2010. Doi: 10.1093/nar/gkq310 LB - Du2010
- [271] Mi H., Muruganujan A., Huang X., Ebert D., Mills C., Guo X., Thomas PD. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols*, 14(3):703–21, 2019. Doi: 10.1038/s41596-019-0128-8
- [272] Ge SX., Jung D., Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 2019. Doi: 10.1093/bioinformatics/btz931
- [273] Conesa A., Gotz S., Garcia-Gomez JM., Terol J., Talon M., Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 2005. Doi: 10.1093/bioinformatics/bti610 LB - Conesa2005
- [274] Våremo L., Nielsen J., Nookaew I. Enriching the gene set analysis of genome-wide data by incorporating directionality of gene expression and combining statistical hypotheses and methods. *Nucleic Acids Research*, 41(8):4378–91, 2013. Doi: 10.1093/nar/gkt111
- [275] Powers RK., Goodspeed A., Pielke-Lombardo H., Tan A-C., Costello JC. GSEA-InContext: identifying novel and common patterns in expression experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(13):i555–64, 2018. Doi: 10.1093/bioinformatics/bty271
- [276] Yi X., Du Z., Su Z. PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant

community. *Nucleic Acids Research*, 41(Web server issue):W98–103, 2013. Doi: 10.1093/nar/gkt281

- [277] Khatri P., Sirota M., Butte AJ. Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. *PLoS Computational Biology*, 8(2):e1002375, 2012. Doi: doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002375
- [278] Huang DW., Sherman BT., Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1):1–13, 2009. Doi: 10.1093/nar/gkn923
- [279] Kanehisa M., Goto S., Furumichi M., Tanabe M., Hirakawa M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue):D355–60, 2010. Doi: 10.1093/nar/gkp896
- [280] The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Research*, 49(Database issue):D325–34, 2021. Doi: 10.1093/nar/gkaa1113
- [281] Ashburner M., Ball CA., Blake JA., Botstein D., Butler H., Cherry JM., Davis AP., Dolinski K., Dwight SS., Eppig JT., Harris MA., Hill DP., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese JC., Richardson JE., Ringwald M., Rubin GM., Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1):25–9, 2000. Doi: 10.1038/75556
- [282] Supek F., Bošnjak M., Škunca N., Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE*, 6(7):e21800, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- [283] Tieri P., Farina L., Petti M., Astolfi L., Paci P., Castiglione F. Network Inference and Reconstruction in Bioinformatics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*,:805–13, 2019. Doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20290-2
- [284] Russo PST., Ferreira GR., Cardozo LE., Bürger MC., Arias-Carrasco R., Maruyama SR., Hirata TDC., Lima DS., Passos FM., Fukutani KF., Lever M., Silva JS., Maracaja-Coutinho V., Nakaya HI. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *BMC Bioinformatics*, 19(1):56, 2018. Doi: 10.1186/s12859-018-2053-1
- [285] Langfelder P., Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 2008. Doi: 10.1186/1471-2105-9-559
- [286] Tanaka Y., Tamada Y., Ikeguchi M., Yamashita F., Okuno Y. System-based differential gene network analysis for characterizing a sample-specific subnetwork. *Biomolecules*, 10(2), 2020. Doi: 10.3390/biom10020306
- [287] Liesecke F., De Craene JO., Besseau S., Courdavault V., Clastre M., Vergès V., Papon N., Giglioli-Guivarc’h N., Glévarec G., Pichon O., Dugé de Bernonville T. Improved gene co-expression network quality through expression dataset down-

- sampling and network aggregation. *Scientific Reports*, 9(1):1–16, 2019. Doi: 10.1038/s41598-019-50885-8
- [288] Niemenak N., Cilas C., Rohsius C., Bleiholder H., Meier U., Lieberei R. Phenological growth stages of cacao plants (*Theobroma* sp.): codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 156(1):13–24, 2010. Doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00356.x
- [289] Chang S., Puryear J., Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2):113–6, 1993. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- [290] Cornejo OE., Yee M-C., Dominguez V., Andrews M., Sockell A., Strandberg E., Livingstone D., Stack C., Romero A., Umaharan P., Royaert S., Tawari NR., Ng P., Gutierrez O., Phillips W., Mockaitis K., Bustamante CD., Motamayor JC. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology*, 1(1), 2018. Doi: 10.1038/s42003-018-0168-6
- [291] Phillips-Mora W., Aime MC., Wilkinson MJ. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6):911–22, 2007. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x
- [292] Romero JA., Phillips-Mora W., Arciniegas-Leal A., Mata-Quirós A., Haiminen N., Mustiga G., Livingstone D., Van Bakel H., Kuhn DN., Parida L., Kasarskis A., Motamayor JC. Application of genome wide association and genomic prediction for improvement of cacao productivity and resistance to black and frosty pod diseases. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01905
- [293] WCF (World Cocoa Foundation). Market update. April 1,2014. Available at: <http://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Cocoa-Market-Update-as-of-4-1-2014>
- [294] Gilbert ME., Medina V. Drought Adaptation Mechanisms Should Guide Experimental Design. *Trends in Plant Science*, 21(8):639–47, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.03.003>
- [295] Tardieu F. Plant response to environmental conditions: Assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in Physiology*, 4 :1–11, 2013. Doi: 10.3389/fphys.2013.00017
- [296] Qaderi M., Martel A., Dixon S. Environmental Factors Influence Plant Vascular System and Water Regulation. *Plants*, 8(3):65, 2019. Doi: 10.3390/plants8030065
- [297] Ahuja I., de Vos RCH., Bones AM., Hall RD. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12):664–74, 2010. Doi: 10.1016/j.tplants.2010.08.002
- [298] Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry

to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109:212–28, 2015. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021

- [299] Griffiths H., Parry MAJ. Plant responses to water stress. *Annals of Botany*, 89(7):801–2, 2002. Doi: 10.1093/aob/mcf159
- [300] Farnese FS., Menezes-Silva PE., Gusman GS., Oliveira JA. When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7:471, 2016. Doi: 10.3389/fpls.2016.00471
- [301] Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer CH. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, 89(7):841–50, 2002. Doi: 10.1093/aob/mcf096
- [302] Shao H bo., Chu L ye., Shao M an., Jaleel CA., Hong-mei M. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(6):433–41, 2008. Doi: 10.1016/j.crv.2008.03.011
- [303] Foyer CH., Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1):93–100, 2011. Doi: 10.1104/pp.110.166181
- [304] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9):405–10, 2002. Doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- [305] Saleh L., Plieth C. Fingerprinting antioxidative activities in plants. *Plant Methods*, 5(1):2, 2009. Doi: 10.1186/1746-4811-5-2
- [306] Jackson MB., Ishizawa K., Ito O. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany*, 103(2):137–42, 2009. Doi: 10.1093/aob/mcn242
- [307] Akhtar I., Nazir N. Effect of waterlogging and drought stress in plants. *International Journal of Water Resources and Environmental Sciences*, 2(2):34–40, 2013. Doi: 10.5829/idosi.ijwres.2013.2.2.11125
- [308] Köhler M., Schwendenmann L., Hölscher D. Throughfall reduction in a cacao agroforest: tree water use and soil water budgeting. *Agricultural and Forest Meteorology*, 150:1079–89, 2010. Doi: 10.1016/j.agrformet.2010.04.005
- [309] Zuidema PA., Leffelaar PA., Gerritsma W., Mommer L., Anten NPR. A physiological production model for cocoa (*Theobroma cacao*): model presentation, validation and application. *Agricultural Systems*, 84(2):195–225, 2005. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.agsy.2004.06.015>
- [310] Mosa KA., Ismail A., Helmy M. Plant Stress Tolerance (3):273–80, 2017. Doi: 10.1007/978-3-319-59379-1
- [311] Joly R., Hahn D. Net CO<sub>2</sub> assimilation of cacao seedlings during periods of plant

- water deficit. *Photosynthesis Research*, 21(3):151–9, 1989. Doi: 10.1007/BF00037179
- [312] Lozano JG., Fonseca LPM., García L. J., Moreno F. LP. Respuestas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. en etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agronómica*, 65(1):44–50, 2016. Doi: 10.15446/acag.v65n1.48161
- [313] Allen RG. Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos, 2006
- [314] dos Santos CM., Verissimo V., de Lins Wanderley Filho HC., Ferreira VM., da Silva Cavalcante PG., Rolim EV., Endres L. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. *Industrial Crops and Products*, 41:203–13, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>
- [315] Slatyer RO., Shmueli E. Measurements of Internal Water Status and Transpiration, John Wiley & Sons, Ltd, 337–53, 1967
- [316] Souza VL., Almeida A-A., Souza J de S., Mangabeira PAO., de Jesus RM., Pirovani CP., Ahnert D., Baligar VC., Loguercio LL. Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2):1217–30, 2014. Doi: 10.1007/s11356-013-1983-4
- [317] Stuart N. Comparative cold hardiness of scion roots from fifty apple varieties. *Proc Soc Hort Sci*:37:330, 1939
- [318] Ward N., Moreno-Hagelsieb G. Quickly finding orthologs as reciprocal best hits with BLAT, LAST, and UBLAST: How much do we miss? *PLoS ONE*, 9(7):1–6, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0101850
- [319] Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–10, 1990. Doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- [320] Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers In: Krawetz S, Misener S (eds) *Methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ Humana Press, 132:365–86, 2000. Doi: 10.1385/1-59259-192-2:365
- [321] Pinheiro TT., Litholdo Jr. CG., Sereno ML., Leal Jr. GA., Albuquerque PS., Figueira A. Establishing references for gene expression analyses by RT-qPCR in *Theobroma cacao* tissues. *Genet Mol Res*, 10(4):3291–305, 2011. Doi: 10.4238/2011.November.17.4
- [322] Stothard P. The Sequence Manipulation Suite 28(6), 2000. Doi: 10.2144/00286ir01

- [323] Sheoran S., Thakur V., Narwal S., Turan R., Mamrutha HM., Singh V., Tiwari V., Sharma I. Differential Activity and Expression Profile of Antioxidant Enzymes and Physiological Changes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Drought. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(6):1282–98, 2015. Doi: 10.1007/s12010-015-1813-x
- [324] Chaouch S., Queval G., Noctor G. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in Arabidopsis. *Plant Journal*, 69(4):613–27, 2012. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04816.x
- [325] Morales J., Kadota Y., Zipfel C., Molina A., Torres MA. The Arabidopsis NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67(6):1663–76, 2016. Doi: 10.1093/jxb/erv558
- [326] Kim MR., Khaleda L., Jung IJ., Kim JY., Lee SY., Cha J-Y., Kim W-Y. Overexpression of chloroplast-localized NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC) enhances tolerance to photo-oxidative and drought stresses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Biology*, 60(2):175–80, 2017. Doi: 10.1007/s12374-016-0464-y
- [327] Bertolde FZ., Almeida A-AF., Pirovani CP. Analysis of gene expression and proteomic profiles of clonal genotypes from *Theobroma cacao* subjected to soil flooding. *PLoS ONE*, 9(10), 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0108705
- [328] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res*, 29, 2001. Doi: 10.1093/nar/29.9.e45 LB - Pfaffl2001
- [329] Pfaffl M. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. *Quantification Strategies in Real-Time PCR*;:87–112, 2004. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1>
- [330] R CT. R: A language and environment for statistical computing., 2019
- [331] Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2):48–54, 1997. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9)
- [332] Rodríguez P. L., Núñez L., Eduardo C., Moreno F., Patricia L. Drought stress affects physiological parameters but not tuber yield in three Andean potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Agronomía Colombiana*, 35(2):158–70, 2017. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n2.65901
- [332] FAO. Evapotranspiración del cultivo-Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. *Drainage Paper and FAO Irrigation*, 2006. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/x0490s/x0490s00.htm>
- [334] Merilo E., Yarmolinsky D., Jalakas P., Parik H., Tulva I., Rasulov B., Kilk K., Kollist H. Stomatal VPD response: There is more to the story than ABA. *Plant*

*Physiology*, 176(1):851–64, 2018. Doi: 10.1104/pp.17.00912

- [335] Gupta A., Rico-Medina A., Caño-Delgado AI. The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368:266–9, 2020. Doi: 10.1126/science.aaz7614
- [336] Antwi A., Lopez F., McDavid C., Spence J. Leaf morphology and drought tolerance in cocoa. *Proceedings of the 11th International Cocoa Research Conference 1993*, 1994
- [337] Parkash V., Singh S. A Review on Potential Plant-Based Water Stress Indicators for Vegetable Crops. *Sustainability*, 2020. Doi: 10.3390/su12103945
- [338] Villar-Salvador P., Planelles R., Oliet J., Peñuelas-Rubira JL., Jacobs DF., González M. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiology*, 24(10):1147–55, 2004. Doi: 10.1093/treephys/24.10.1147
- [339] Valentovic P., Luxova M., Kolarovic L., Gasparikova O. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment*, 52(4):184, 2006. Doi: 10.17221/3364-PSE
- [340] Almeida A-AF., Gomes FP., Araujo RP., Santos RC., Valle RR. Leaf gas exchange in species of the *Theobroma* genus. *Photosynthetica*, 52(1):16–21, 2014. Doi: 10.1007/s11099-013-0048-8
- [341] Brodribb T. Dynamics of Changing Intercellular CO<sub>2</sub> Concentration (ci) during Drought and Determination of Minimum Functional ci. *Plant Physiology*, 111(1):179–85, 1996. Doi: 10.1104/pp.111.1.179
- [342] Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Ramakrishnan M., Singh Sidhu GP., Bali AS., Handa N., Kapoor D., Yadav P., Khanna K., Bakshi P., Rehman A., Kohli SK., Khan EA., Parihar RD., Yuan H., Thukral AK., Bhardwaj R., Zheng B. Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*,:509–31, 2020. Doi: 10.1007/s00344-019-10018-x
- [343] Bajji M., Kinet JM., Lutts S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36(1):61–70, 2001. Doi: 10.1023/A:1014732714549
- [344] Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli SK., Sidhu GPS., Bali AS., Handa N., Kapoor D., Bhardwaj R., Zheng B. Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules*, 9(7):285, 2019. Doi: 10.3390/biom9070285
- [345] Chen Z., Xu J., Wang F., Wang L., Xu Z. Morpho-physiological and proteomic responses to water stress in two contrasting tobacco varieties. *Scientific Reports*, 9(1):1–15, 2019. Doi: 10.1038/s41598-019-54995-1
- [346] Gullner G., Komives T., Király L., Schröder P. Glutathione S-Transferase Enzymes

in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9:1–19, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.01836

- [347] Ding N., Wang A., Zhang X., Wu Y., Wang R., Cui H., Huang R., Luo Y. Identification and analysis of glutathione S-transferase gene family in sweet potato reveal divergent GST-mediated networks in aboveground and underground tissues in response to abiotic stresses. *BMC Plant Biology*, 17(1):1–15, 2017. Doi: 10.1186/s12870-017-1179-z
- [348] Dixon DP., Edwards R. Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 3(3):1–10, 2005. Doi: 10.1016/S0076-6879(05)01011-6
- [349] Ezaki B., Suzuki M., Motoda H., Kawamura M., Nakashima S., Matsumoto H. Mechanism of Gene Expression of Arabidopsis Glutathione S-Transferase, AtGST1, and AtGST11 in Response to Aluminum Stress. *Plant Physiology*, 134(4):1672–82, 2004. Doi: 10.1104/pp.103.037135.plants
- [350] Kotak S., Vierling E., Baumlein H., Koskull-Doring P v. A Novel Transcriptional Cascade Regulating Expression of Heat Stress Proteins during Seed Development of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 19(1):182–95, 2007. Doi: 10.1105/tpc.106.048165
- [351] Park CJ., Seo YS. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathology Journal*, 31(4):323–33, 2015. Doi: 10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150
- [352] Mishra D., Shekhar S., Singh D., Chakraborty S. Regulation of Heat Shock Protein Responses 13, 2018. Doi: 10.1007/978-3-319-74715-6
- [353] Al-Wahaibi MH. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*, 23(2):139–50, 2011. Doi: 10.1016/j.jksus.2010.06.022
- [354] Kwak JM., C.Mori I., Pei Z-M., Leonhardt N., Torres MA., L.Dangl J., E.Bloom R., Bodde S., I.Schroeder., D.G.Jones J., Julian I.Schroeder. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 22(11):2623–33, 2006. Doi: 10.1093/emboj/cdg277
- [355] Mittler R., Blumwald E. The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1):64–70, 2015. Doi: 10.1105/tpc.114.133090
- [356] Vieira Dos Santos C., Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science*, 11(7):329–34, 2006. Doi: 10.1016/j.tplants.2006.05.005
- [357] Perez-Ruiz JM. Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. *The Plant Cell Online*, 18(9):2356–68, 2006. Doi: 10.1105/tpc.106.041541

- [358] Serrato AJ., Pérez-Ruiz JM., Spínola MC., Cejudo FJ. A novel NADPH thioredoxin reductase, localised in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42):43821–7, 2004. Doi: 10.1074/jbc.M404696200
- [359] Toivola J., Nikkanen L., Dahlström KM., Salminen TA., Lepistö A., Vignols hb F., Rintamäki E. Overexpression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Arabidopsis* enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Frontiers in Plant Science*, 4:1–18, 2013. Doi: 10.3389/fpls.2013.00389

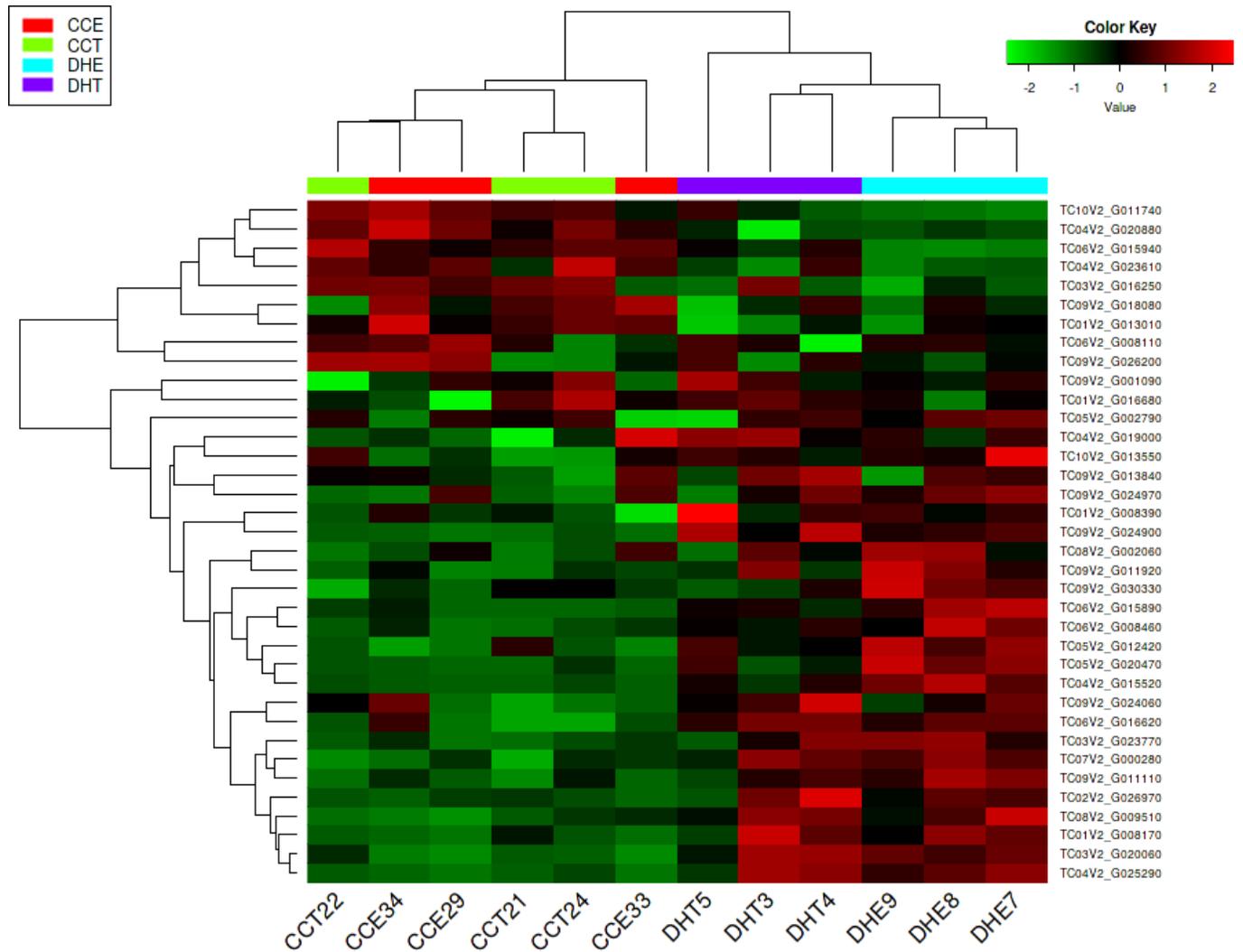
## Capítulo 10. Anexos

## Anexo 10-1. Análisis de suelo

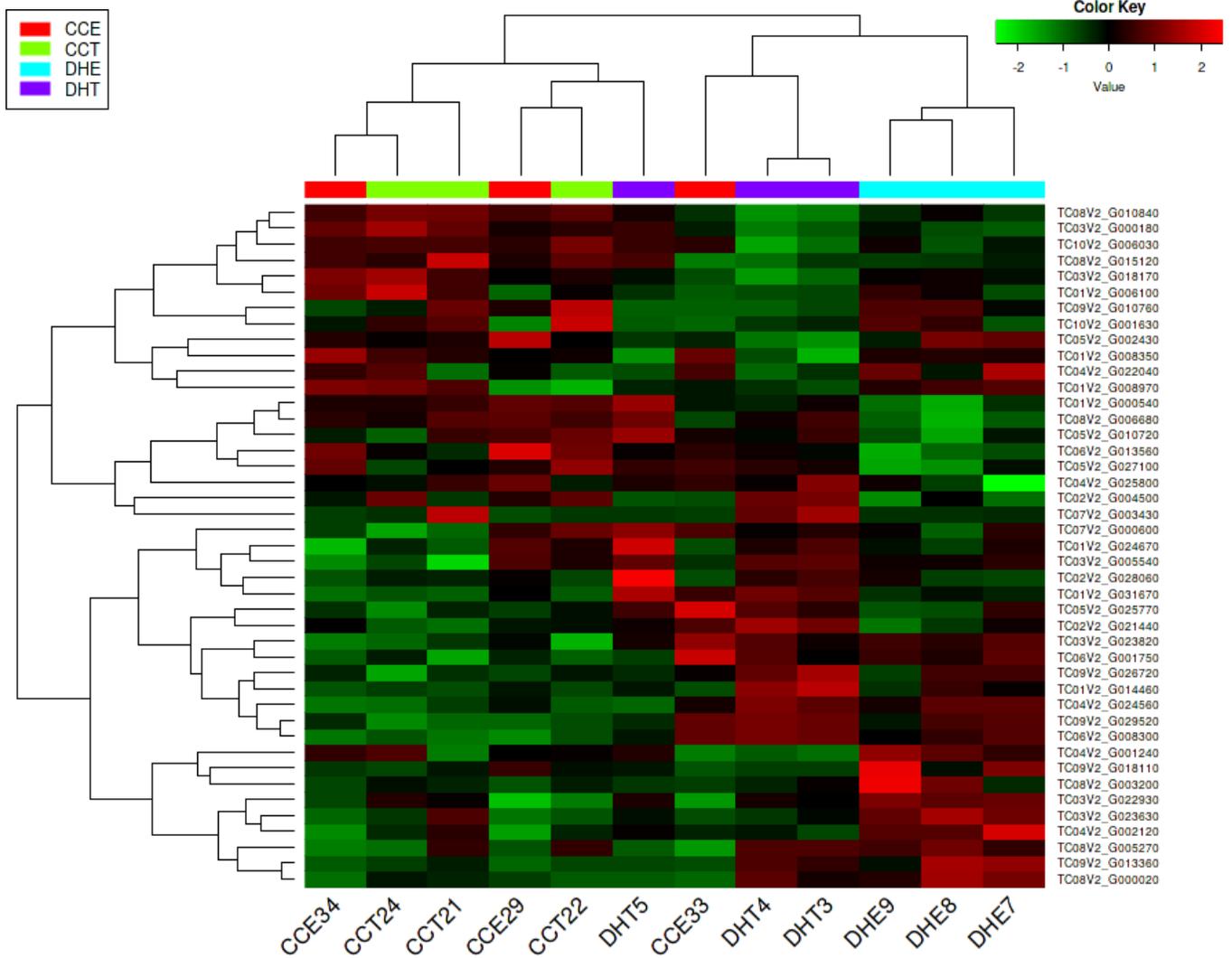
Identificación	Finca: Bambusa	
pH	6.5	
Conductividad Eléctrica (dS/m)	0.24	
% de Saturación	47	
<b>ELEMENTOS</b>	<b>p.p.m</b>	<b>me/l</b>
Potasio (K <sup>+</sup> )	7.6	0.19
Calcio (Ca <sup>2+</sup> )	22	1.1
Magnesio (Mg <sup>2+</sup> )	4.8	0.4
Sodio (Na <sup>+</sup> )	14	0.61
Amonios (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )*	0.65	0.05
Aluminio (Al <sup>3+</sup> )	N.A	N.A
<b>SUMA CATIONES</b>		<b>2.35</b>
Bicarbonatos (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	41	0.66
Cloruros (Cl <sup>-</sup> )	15	0.42
Fosfatos (P-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )*	7	0.23
Sulfatos (S-SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> )*	23	1.44
Nitratos (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )*	1.7	0.12
<b>SUMA ANIONES</b>		<b>2.87</b>
Boro (B)	0.3	
Hierro (pH Real)	0.02	
Hierro (pH 2.0)	0.03	
Manganeso (Mn)	0.02	
Cobre (Cu)	0.03	
Zinc (Zn)	0.03	
<b>RAS</b>		<b>0.7</b>

**OBSERVACIONES:** \*La expresión de resultados en partes por millón se refiere al elemento y en miliequivalentes por litro a la especie iónica. N.A. No AplicAR

## Anexo 10-2. Perfiles de expresión genes Candidatos de Tolerancia



**Cambio en los perfiles de expresión de los genes candidatos de tolerancia comunes entre clones**



**Cambio en los perfiles de expresión de los genes candidatos de tolerancia específicos de cada clones**

### Anexo 10-3. Productos de la Tesis

1. **Artículo de investigación 1:** Cacao (*Theobroma cacao* L.) response to water-deficit: physiological characterization and antioxidant gene expression profiling in commercial clones. Este artículo constituye el Capítulo 4 de este documento. Se sometió a la revista *Frontiers in Plant Science*. Los autores son:

*Mayra Andreina Osorio Zambrano, Darwin Alexander Castillo, Loyla Rodríguez Pérez, Wilson Terán\**

2. **Artículo de Investigación 2:** Características fotosintéticas de tres clones de *Theobroma cacao* L. en estado vegetativo. Este artículo corresponde al Anexo 10-4 de este documento. Se sometió a la revista *Botanical Sciences*. Los autores son:

*Mayra Andreina Osorio Zambrano, Loyla Rodríguez Pérez, Wilson Terán\**

3. **Artículo de investigación 3.** Transcriptomic and physio-anatomical research on responses to water deficit in two contrasting cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. Se encuentra en revisión y será sometido a la revista *BMC genomics*. Los autores son:

*Mayra Andreina Osorio Zambrano<sup>1\*</sup>, Loyla Rodríguez Pérez<sup>1</sup>, Irene Papatheodorou<sup>2</sup>, and Wilson Terán<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup> Plant and Crop Biology, Department of Biology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup>Gene expression team, EMBL- EBI, Hinxton, UK

4. **Presentación oral en simposio virtual en ciencias omicas de plantas**



This is to certify that

**Mayra Osorio**

Has presented a paper titled

*Integrated phenotypic analysis of cocoa (*Theobroma cacao* L.) response to water deficit at the Virtual Symposium in Plant Omics Science*

Held between November 23rd - 27th, 2020 at Santiago de Cali, Colombia

Andrés Jaramillo Botero  
Scientific Director

Jaime Aguilar  
Institutional Strengthening Sub-director

Support:



## Anexo 10-4.

### Características fotosintéticas de tres clones de *Theobroma cacao* L. en estado vegetativo

Mayra Andreina Osorio Zambrano <sup>1, \*</sup>, Loyla Rodríguez Pérez <sup>1, \*</sup> & Wilson Terán <sup>1</sup>

1. Biología de Plantas y Sistemas Productivos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia; osorio.mayra@javeriana.edu.com, wteran@javeriana.edu.co; loyla.rodriguez@javeriana.edu.co

\* Correspondencia

**ABSTRACT. Introduction:** Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tree of worldwide economic importance known to be the source of cocoa beans, the main ingredient for producing chocolate. Despite being classified as a shade-tolerant species, some cocoa genotypes can grow in full sunlight. **Objective:** To characterize the photosynthetic response to photosynthetic photon flux density (PPFD) in cocoa clones EET 8, ICS 60 and TSH 565. **Methods:** The study was carried out under greenhouse conditions. Photosynthetic response curves were obtained for 5-month-old plants (n=3) exposed to values of PPFD between 0 – 1 000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Functioning of the photochemical apparatus was evaluated using parameters that provide information on the light reactions of photosynthesis i. e. photosynthesis at saturation by PPFD ( $A_{\text{max}}$ ), light compensation point (LCP), light saturation point (LSP), mitochondrial respiration rate ( $R_D$ ), quantum yield of photosynthesis ( $\Phi$ ), electron transport rate (ETR), yield (Y[II]) and quantum efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ). **Results:** Overall, differences were found in the photosynthetic capacity of the cocoa clones evaluated, being EET 8 and ICS 60 the clones with the highest photosynthetic activity and use of available light, whereas TSH 565 showed more affectation in its photosynthetic performance when increasing PPFD. Consequently,  $F_v/F_m$  was higher in EET 8 and ICS 60. Although TSH 565 had a lower  $F_v/F_m$ , photosynthesis was not affected and there was no evidence of photoinhibition. **Conclusion:** The differences found in the photosynthetic response of cocoa clones to irradiance can be exploited to better guide the use of a particular clone under specific irradiance conditions. Also, this knowledge may be useful to implement the adequate management practices in cocoa production systems, according to the requirements and exigencies of non-restrictive PPFD for photosynthesis, under which the evaluated clones may express their optimal photosynthetic capacity and potential leading to higher yields.

**Key words:** light response curves, light saturation point, light compensation point, quantum efficiency, photosynthetic response, PSII efficiency.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie vegetal originaria de los bosques húmedos tropicales de Suramérica [1], que produce semillas de calidad con potencial de mercado para las industrias de alimentos, farmacéutica y medicinal. El contenido de manteca de cacao, proteínas, polifenoles, potasio, zinc, ácidos orgánicos, teobromina y otros [2], confieren calidad nutricional y comercial a la semilla de cacao como materia prima para la elaboración de chocolate, confitería y otros productos derivados [3]. El cacao alcanzó una producción mundial de 5.5 millones de toneladas para el año 2019, de las cuales Sur y Centroamérica produjeron 811.454 toneladas [4–6]. Debido a la importancia económica y amplio potencial de mercado del cacao a nivel nacional e internacional y considerando que este cultivo ha sido priorizado como fundamental en los programas de sustitución de cultivos ilícitos y desarrollo rural [7,8], se proyecta un aumento importante en las próximas décadas para el sector cacaotero de Colombia. Sin embargo, muchos de los clones recomendados para la siembra no han sido del todo caracterizados en cuanto a su actividad fotosintética, por consiguiente, es necesario estudiar y conocer el comportamiento y respuesta fotosintética de los clones de cacao de mayor interés comercial, que se siembran en el país y bajo condiciones ambientales que, con alta frecuencia, limitan la producción agrícola [9–11].

Las plantas poseen la capacidad de capturar y utilizar la energía lumínica como fuente de energía para producir carbohidratos necesarios para el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, a partir del proceso de fotosíntesis [12]. Se conoce que los requerimientos de irradiancia para fotosíntesis son diferentes dependiendo de la especie vegetal. Así, mientras ciertas especies vegetales requieren niveles altos de irradiancia para alcanzar desempeños fisiológicos óptimos, para otras, los niveles bajos de irradiancia son indispensables. Se propone que *Theobroma cacao* es una especie vegetal adaptada a crecer en condiciones de sombra (sotobosque), y que no tolera los niveles altos de radiación debido a que, en su ecosistema natural de origen, crece en medio de especies arbóreas de mayor altura que conforman el bosque amazónico. Así, es frecuente cultivar el cacao en sistemas agroforestales, en donde las plantas de cacao tradicionalmente se siembran en asocio con otras plantas como frijol, plátano, yuca, especies frutales y maderables que pueden proveer condiciones de sombrero [13–15]. De forma complementaria, es suficientemente documentado que la fotosíntesis es limitada por el inadecuado suministro de luz [16,17].

Durante las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, las plantas utilizan la radiación fotosintéticamente activa (RFA) para producir ATP y NADPH, indispensables para la producción de carbohidratos a partir de la reducción del CO<sub>2</sub> durante el Ciclo de Calvin-Benson [16,18]. En este contexto, la RFA se compone de fotones de diferente longitud de onda (entre 400 – 700 nm) o energía, reflejando la cantidad de luz que incide sobre una hoja por unidad de área y de tiempo, y pudiendo ser cuantificada como irradiancia o

energía (expresada en Watts  $m^{-2}$ ) o como el número de quanta incidente o densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) (expresada en  $\mu\text{moles de fotones } m^{-2} s^{-1}$ ) [16]. De forma concreta, la energía lumínica aportada por la RFA es utilizada por la planta durante las reacciones lumínicas que ocurren en la membrana tilacoidal del cloroplasto e involucra la transferencia de electrones y protones en la que intervienen cuatro complejos multi-proteicos fotosintéticos [16,18]. Entre estos complejos se destacan los fotosistemas I y II (FSI - FSII) que contienen pigmentos fotosintéticos conformando las antenas colectoras de luz, así como centros de reacción que convierten la energía lumínica captada y transferida desde el complejo antena, en energía química. Estos fotosistemas II y I están conectados por el complejo Citocromo  $b_6/f$  y trabajan en serie y de forma acoplada durante el proceso de transporte de electrones y protones para generar poder reductor (NADPH) así como el gradiente electroquímico utilizado por el factor de acoplamiento (ATP sintasa) para la síntesis de ATP en el estroma produciéndose liberación de  $O_2$  [16,18]. En adición, durante la segunda etapa de reacciones de la fotosíntesis, ocurrida en el estroma del cloroplasto, se lleva a cabo el ciclo de reducción del Carbono (Ciclo de Calvin-Benson) en el que el  $CO_2$  es reducido a carbohidratos con la utilización del ATP y el NADPH producidos en la etapa de reacciones lumínicas [16,18]. Las triosas fosfato producidas durante las fases de carboxilación y reducción del Ciclo de Calvin-Benson, son utilizadas para la síntesis de aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, metabolitos secundarios y otros compuestos orgánicos indispensables para el crecimiento y desarrollo de las plantas [17].

Bajo este contexto y considerando la relevancia de la DFFF para el proceso fotosintético, los ambientes que aportan niveles de baja irradiancia, inferior a la que las plantas requieren, así como aquellos donde las hojas están expuestas a alta irradiancia que superan los niveles que las plantas pueden utilizar inducen diferentes efectos y respuestas fotosintéticas dependiendo de la especie vegetal. De esta manera, el exceso de luz genera fotoinhibición por inactivación o daño del FSII, debido a que se supera la irradiancia óptima para la fotosíntesis. Así, cuando la planta es expuesta a un moderado exceso de RFA, se presenta fotoinhibición dinámica, sin generar reducción en la tasa de fotosíntesis máxima, por reducción temporal de la eficiencia cuántica, hasta que la DFFF regrese a niveles inferiores a los de saturación. En contraste, la exposición de las plantas a altos niveles de DFFF en excesiva RFA, conlleva a fotoinhibición crónica, por daño e inactivación del FSII y con reducción de la tasa fotosintética máxima [19]. No obstante, el efecto de la fotoinhibición depende del equilibrio entre el mecanismo de daño al centro de reacción del FSII y el mecanismo de reparación de la proteína D1 [20].

En la práctica, la fotoinhibición del FSII puede ser detectada a través de la medición de la fluorescencia de la clorofila en tejidos foliares, aportando información estrechamente relacionada con la transferencia de electrones y protones durante las reacciones lumínicas

de la fotosíntesis [18]. Debido a que la mayor parte de la fluorescencia emitida proviene de las moléculas de la clorofila a asociadas al FSII, los cambios en este pigmento son indicadores del estado de este fotosistema. Por consiguiente, la evaluación cuantitativa de ésta permite obtener información sobre la tasa de transporte de electrones (TTE), del rendimiento ( $Y[II]$ ) y la eficiencia fotoquímica del FSII ( $F_v/F_m$ ), pudiendo así detectar la ocurrencia de fotoinhibición, la cual puede presentarse cuando la cantidad de luz interceptada excede la capacidad de utilización de esta por parte del aparato fotosintético ocasionando la reducción de la  $F_v/F_m$  y de la tasa fotosintética ( $A$ ) [21,22].

Consecuentemente, las especies vegetales han desarrollado mecanismos para proteger y reparar el aparato fotosintético del daño inducido por la excesiva RFA y sobrevivir en una amplia escala de valores de DFFF. La protección del aparato fotosintético del daño ocasionado por el exceso de energía absorbida por las antenas colectoras de luz es disipada en forma de calor por intervención del ciclo de las xantofilas [17]. Entre tanto, el mecanismo de reparación de la proteína D1 dañada (centro de reacción del FSII) consiste en la degradación de esta por proteólisis, mientras nueva proteína D1 es sintetizada en los ribosomas del cloroplasto y re-ensamblada en el FSII. Durante el proceso de degradación de esta proteína se afirma que el complejo del FSII sufre un desensamble parcial, hasta que la proteína dañada es reemplazada [18,23].

Esta capacidad de las plantas de sobrevivir en una amplia gama de DFFF es un rasgo fisiológico interesante que les permite crecer y adaptarse a hábitats con diferentes niveles de irradiancia; por ello, es posible encontrar plantas de una misma especie distribuidas en regiones con diferentes regímenes de irradiancia. Así, plantas pertenecientes a la misma especie pueden requerir para crecer condiciones de alta luz referenciándose como plantas de sol; mientras que otras de la misma especie requieren condiciones de sombra referenciándose como plantas que toleran la sombra. A su vez, existen plantas que son facultativas y toleran el sol y la sombra, adaptando su crecimiento y desarrollo según las condiciones de irradiancia [17]. Por esta razón, la revisión de aspectos fundamentales directamente relacionados con la fotosíntesis es soporte esencial para comprender la respuesta fotosintética de las plantas al incremento en la intensidad de luz o DFFF [17,18].

Las estrategias de respuesta de las plantas a la DFFF en hábitats naturales pueden evaluarse mediante la curva  $A/DFFF$ , la cual describe la respuesta fotosintética al incremento en la intensidad de luz por parte de una hoja de una especie vegetal. Esta curva permite obtener diversos parámetros fisiológicos que reflejan el comportamiento fotosintético dependiente de rasgos fisiológicas propios de plantas de sol o de sombra. Estos son: el punto de compensación lumínico que es la DFFF a la que la asimilación de  $CO_2$  se equilibra con la liberación de  $CO_2$  (fotorrespiración), el cual es menor para plantas

de sombra expuestas a baja DFFF [24]; el rendimiento cuántico de la fotosíntesis ( $\Phi$ ) que es la pendiente inicial de la curva de respuesta  $A/DFFF$  donde la fotosíntesis es limitada por DFFF [24–26]; la fotosíntesis máxima ( $A_{max}$ ) que es la tasa fotosintética máxima a saturación por DFFF, es decir en el punto de saturación lumínica [15] y la tasa de respiración ( $R_D$ ) registrada en oscuridad.

Al respecto, se propone que las plantas de *T. cacao* comparten características de especies de sombra, con sensibilidad a altas DFFF cuya fotosíntesis puede saturarse a niveles bajos de DFFF (200 - 300  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) [15,27–30]. Sin embargo, aunque se afirma que las plantas jóvenes de cacao requieren condiciones de sombra (50 a 60% de DFFF), no existe un consenso con respecto a los requerimientos de DFFF óptima para el crecimiento, desarrollo y productividad de este cultivo [27,29,31–33]. Además, se han encontrado genotipos que pueden crecer a plena exposición solar [15,30–32,34]. Consecuentemente, se propone que la plasticidad fenotípica del cacao se relaciona con el desarrollo de rasgos agronómicos que confieren a las plantas la capacidad para interceptar y utilizar la radiación solar [29,35], no obstante, son aún insuficientes los estudios dirigidos a caracterizar la respuesta fotosintética de materiales de cacao pertenecientes a los grupos genéticos Criollo, Forastero y Trinitarios de interés comercial [31,36].

Así, la generación de conocimiento relacionado con las características fotosintéticas de *T. cacao* es fundamental para documentar la variabilidad de los clones comercialmente aprovechados, estrechamente vinculada con el comportamiento y respuesta de rasgos morfológicos y fisiológicos [10,11,15,37] con miras a mejorar la capacidad y rendimiento de estos clones. Este conocimiento puede en efecto ser aprovechado mediante la aplicación de prácticas de manejo del cultivo acordes con los requerimientos y exigencias edafo-climáticas de los grupos genéticos de interés, así como aquellas impuestas por el cambio climático global, que, con alta frecuencia, se constituyen como factores de estrés vegetal que reducen la productividad de este cultivo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la respuesta y comportamiento fotosintético de plantas jóvenes de los clones híbridos de cacao de interés comercial, EET 8, ICS 60 y TSH 565 a la DFFF.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización:** Las plantas de cacao se sembraron en condiciones de invernadero en la Estación productiva Bambusa, de la empresa Geoambiente SAS, localizada en Pacho (Cundinamarca-Colombia). La localidad se ubica a coordenadas geográficas

5°07'50"N y 74°09'30"W en un bosque seco - premontano a altitud de 1 350 msnm, con una temperatura media anual de 24 °C.

**Material vegetal:** Se evaluaron plantas de *T. cacao* de cinco meses de edad, propagadas vegetativamente por esquejes e injertadas utilizando como patrón el clon Caucasia, empleado por Geoambiente Ltda para la producción en masa, y pertenecientes a los tres siguientes clones: EET 8 (Estación experimental tropical), un híbrido procedente de Ecuador con buen índice de grano y susceptible a Monilia [38,39], el ICS 60 (Imperial College Selection) un híbrido de Trinitario y criollo procedente de Trinidad, Nicaragua y Venezuela con buen índice de grano, mazorca y tolerancia media a Monilia [38,40–42], y TSH 565 (Trinidad Selection Hybrid) un Híbrido de ICS1 x SCA6 de Trinidad con alta productividad y resistencia a Monilia [38,41]. El cacao producido por estos clones es considerado como de sabor fino y por las cualidades en cuanto rendimiento (kg/ha/año), frutos por árbol, afectación por Monilia y caracterización físico-química y organoléptica de sus semillas; estos clones han sido recomendados para la siembra y comercialización en Colombia por el Consejo Nacional Cacaotero [43].

**Condiciones experimentales:** Para el establecimiento del experimento en condiciones de invernadero; plantas de cinco meses de edad, se sembraron en bolsas de plástico negro que contenían 5 kg de suelo franco limoso (pH 6.5). Acorde con los resultados del análisis del suelo se aplicó fertilización con 5 ml de Agroplus® y fertilizante 15-15-15 (N-P-K) en relación 5:5 v/p por litro de agua dos veces después del injerto, para garantizar el aporte de elementos minerales requeridos por las plantas de cacao para su crecimiento y desarrollo óptimos. Durante el período de crecimiento de las plantas, se aplicó riego a capacidad de materia. Durante el día a intervalos de dos horas, se registraron las temperaturas máxima y mínima y la humedad relativa, utilizando una estación climática HOB0 8 (HBOware®) instalada a 0.50 m sobre el suelo. La temperatura del aire varió entre 17 y 38 °C con un valor promedio de 28 °C; mientras que la humedad relativa promedio fue de 63%. Así mismo, se calculó el déficit de presión de vapor (DPV) promedio según el método propuesto por [44] y [45], el cual fue de 1.68 kPa.

**Curvas de respuesta fotosintética a la densidad de flujo fotónico (A/DFFF):** Los registros de la fotosíntesis neta (*A*) se realizaron en la tercera hoja completamente expandida correspondiente al tercio superior del follaje en cuatro plantas por clon usando un sistema portátil de fotosíntesis (LI - 6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, United States) con concentración de CO<sub>2</sub> de referencia de 400 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Las hojas fueron expuestas a catorce niveles de DFFF (0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) [15,46] y la fotosíntesis neta se registró con coeficiente de variación permitido de 0.1%, para cada nivel de DFFF. Para obtener el mejor ajuste de la

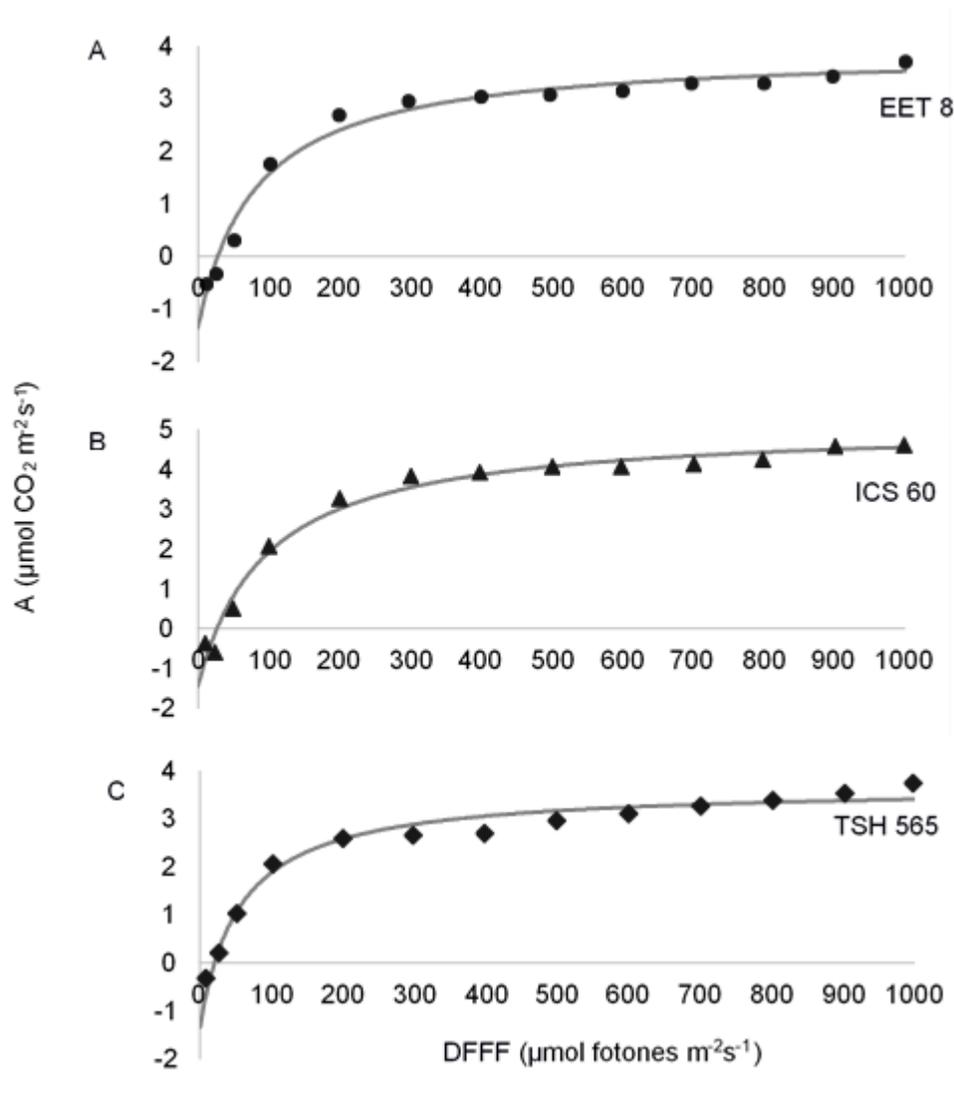
curva de respuesta fotosintética a densidad de flujo fotónico (A/DFFF) para cada uno de los clones de *T. cacao*, se aplicaron varios modelos matemáticos propuestos por [47] usando la función Solver de Microsoft Excel. Así, el modelo elegido fue el de regresión no lineal de Michaelis-Menten debido a que permitió obtener una mejor calidad del ajuste para las curvas acorde con el criterio del valor mínimo en la suma de los cuadrados de los errores (SCE) y con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) (Tabla 1), y por las ventajas de este en cuanto a parsimonia, interpretabilidad y predicción [48]. Este modelo elegido corresponde a la ecuación:  $PN = [(\Phi \times I \times P_{gmax} / \Phi \times I \times P_{gmax})] - R$  a partir del cual se calcularon los parámetros que describen la eficiencia y capacidad fotosintética de las plantas de cacao: la tasa de fotosíntesis neta (PN) expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la DFFF (I) expresada en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , el rendimiento cuántico de la fotosíntesis ( $\Phi$ ) expresado en  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}$ , la tasa de respiración mitocondrial ( $R_D$ ) obtenida a una DFFF de cero (oscuridad) y expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la tasa de Fotosíntesis máxima a saturación por luz ó  $A_{\text{max}}$  ( $P_{gmax}$ ) expresada en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , el punto de compensación lumínico (PCL) expresado en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , y el punto de saturación lumínico (PSL) expresado en  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

**Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II:** Para obtener información acerca del funcionamiento del aparato fotoquímico, en las mismas hojas en las que se registró la A, se determinaron parámetros como: la eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), el rendimiento cuántico efectivo del FSII ( $Y[II]$ ) y la tasa de transferencia de electrones (TTE). Para las mediciones, las hojas fueron aclimatadas a oscuridad durante 45 minutos. La medición se realizó entre 4:00 y 7:00 pm, utilizando un fluorómetro modulado MINI-PAM (Walz®, Effeltrich, Alemania). Para ello, las hojas fueron iluminadas durante 0.80 s con  $1\ 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de luz actínica.

**Análisis:** Las diferencias entre las medias de los clones para los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II:  $F_v/F_m$ ,  $Y[II]$  y TTE, se analizaron con la prueba de la diferencia menos significativa de Fisher (LSD) a un nivel de significancia  $P \leq 0.05$ , luego de realizar el análisis de varianza (ANOVA) con el software Statistix 9® (Analytical software, USA).

## RESULTADOS

**Curvas de luz:** Las curvas de respuesta A/DFFF obtenidas para las plantas de cacao de los tres clones del presente estudio, se ajustaron al modelo de hipérbola rectangular de Michaelis-Menten, cuyo valor mínimo de SCE indica que dicha regresión representa en alto grado la varianza y comportamiento de los valores de A registrados en las hojas de los clones de cacao para cada uno de los niveles de DFFF (Fig. 1).



**Figura. 1.** Curvas de respuesta fotosintética frente a los niveles de irradiancia (A/DFFF). **(A)** Clon EET 8 **(B)** Clon ICS 60 **(C)** Clon TSH 565. En las gráficas las líneas se ajustaron usando el modelo de Michaelis-Menten. Los puntos representan la media de tres individuos ( $n = 3$ ).

En estas curvas, el valor de A en oscuridad (DFFF igual a cero) fue negativo en los tres clones de cacao evaluados, mostrando una emisión de  $\text{CO}_2$  correspondiente a la respiración mitocondrial ( $R_D$ ), cuyo valor fue similar entre los clones de cacao, siendo la  $R_D$  de EET8 e ICS60 la más alta ( $-1.4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ); mientras que la  $R_D$  más baja fue la de TSH 565 ( $-1.3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) con una tasa de respiración mitocondrial promedio para los tres clones de  $-1.36 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Tabla 1).

Seguidamente, en la parte inicial de la curva, A aumentó rápido y el incremento de DFFF ( $10 - 50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) conllevó a un incremento asintótico de la tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  hasta que se alcanzó el PCL, el cual corresponde al valor de DFFF con el

que se alcanza un valor de A nulo, es decir se compensa la emisión de CO<sub>2</sub> debida a la respiración (Fig. 1) [16,17,49]. Los PCL oscilaron entre 20.2 y 28 μmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> para los tres clones; siendo TSH 565 el clon que presentó el PCL más bajo, mientras que EET8 el que presentó el PCL más alto (Tabla 1).

Para las plantas de los tres clones de cacao evaluados aquí, una vez la DFFF superó el PCL y se dio inicio a la fijación neta de carbono, se presentó un aumento proporcional de la tasa de fotosíntesis en la escala de niveles de irradiancia en el que la fotosíntesis es limitada por la luz; así el incremento en el flujo de fotones conllevó a que la A alcanzara una relación lineal, que permitió calcular el rendimiento cuántico de la fotosíntesis de la hoja ( $\Phi$ ), el cual es indicador de la eficiencia con la que los clones utilizaron la luz disponible. Así, la  $\Phi$  fue de 0.0653 μmol CO<sub>2</sub> μmol foton<sup>-1</sup> para el clon EET 8, 0.0898 μmol CO<sub>2</sub> μmol foton<sup>-1</sup> para TSH 565 y 0.0689 μmol CO<sub>2</sub> μmol foton<sup>-1</sup> para ICS 60 (Tabla 1).

Posteriormente en la curva de respuesta fotosintética, a medida que la DFFF continuó aumentando, la asimilación neta de CO<sub>2</sub> se incrementó hasta alcanzar la saturación, a partir de la cual la A no aumenta cuando se alcanzó el PSL en el que la A es limitada por los procesos enzimáticos y la disponibilidad de CO<sub>2</sub>. Los clones EET 8 e ICS 60 mostraron los PSL más altos (461 y 567 μmol foton m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> respectivamente); mientras que el clon TSH 565 presentó el PSL más baja (377 μmol foton<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). En el PSL los clones EET 8, ICS 60 y TSH 565 alcanzaron valores de A<sub>max</sub> de 5.3, 6.6 y 5.0 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. En la curva A/DFFF, después del PSL, no se presentaron aumentos de A por el incremento en la DFFF; debido a la limitación de la fotosíntesis por otros factores diferentes a la luz (tasa de transporte de electrones, actividad de la RUBISCO o metabolismo de las triosas fosfato) [16,17,25].

**TABLA 1**

Parámetros derivados de las curvas de respuesta fotosintética a la luz de los tres clones de *T. cacao* evaluados.

Clon	A <sub>max</sub> [μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	$\Phi$ [μmol CO <sub>2</sub> μmol foton <sup>-1</sup> ]	R <sub>D</sub> [μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	PCL [μmol fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	PSL [μmol fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	SCE	R <sup>2</sup>
EET 8	5.3	0.0653	-1.4	28.0	461	0.47	0.98
ICS 60	6.6	0.0689	-1.4	26.9	567	0.84	0.98
TSH 565	5.0	0.0898	-1.3	20.2	377	0.48	0.97

Tasa fotosintética a saturación por luz (A<sub>max</sub>), eficiencia cuántica ( $\Phi$ ), tasa de respiración (R<sub>D</sub>), punto de compensación lumínico (PCL), punto de saturación por luz (PSL), suma de los cuadrados de los errores (SCE) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>). Cada valor representa la media de 3 plantas (n=3).

**Actividad Fotoquímica:** Considerando que en la primera parte de la curva de respuesta A/DFFF la asimilación neta de CO<sub>2</sub> es limitada por la luz; el análisis del comportamiento y respuesta fotosintética de las plantas de cacao de los tres clones de este estudio también integra parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila a, como indicadores útiles que aportan información acerca de la actividad fotoquímica del FSII y por lo tanto de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis. Se encontró que el parámetro  $F_v/F_m$  que indica si los centros de reacción del FSII son funcionales, fue similar para los clones EET 8 e ICS 60 (0.703 y 0.700 respectivamente) y más alto (LSD,  $P \leq 0.05$ ) que en el clon TSH 565 (0.635) (Tabla 2). Los parámetros Y(II) y TTE fueron similares para los clones TSH 565 e ICS 60, siendo el clon TSH 565 el que mostró los valores más bajos para Y(II) y TTE (0.420 y 22  $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente) mientras que el clon EET 8 presentó los valores más altos de Y(II) y TTE (0.425 y 24  $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente) (Tabla 2).

**TABLA 2**

Parámetros de fluorescencia de la clorofila a.

Clon	$F_v/F_m$	Y[II]	TTE ( $\mu\text{moles e}^- \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
<b>EET 8</b>	0.703 $\pm$ 0.016 a	0.475 $\pm$ 0.009 a	24 $\pm$ 0.5 a
<b>ICS 60</b>	0.700 $\pm$ 0.016 a	0.447 $\pm$ 0.014 ab	23 $\pm$ 0.7 ab
<b>TSH 565</b>	0.635 $\pm$ 0.025 b	0.420 $\pm$ 0.006 b	22 $\pm$ 0.3 b

Eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), rendimiento cuántico efectivo del FSII (Y(II)) y tasa de transferencia de electrones (TTE) de tres clones de *T.cacao* comercializados en Colombia. Cada valor representa la media ( $\pm$ E.E) de 9 plantas. Letras distintas junto a los valores indican diferencias significativas según la prueba LSD ( $P \leq 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados aportados por las curvas de respuesta fotosintética a la irradiancia permiten proponer que los clones de cacao evaluados en este estudio, han desarrollado capacidad de aclimatación a DFFF cambiante, presentando respuesta fotosintética propuesta para plantas C3 de sol, con tolerancia para realizar fotosíntesis a mayores niveles de irradiancia que los propuestos para las plantas de cacao de sombra; sin que se presente fotoinhibición, como lo confirman los resultados aportados por las curvas A/DFFF correspondientes a los parámetros como el PCL, la  $R_D$ , el PSL, la  $A_{\text{max}}$ ; así como

los resultados correspondientes a los parámetros de la actividad fotoquímica del FSII, todos ellos con significado e importancia a nivel fisiológico.

Así, el PCL obtenido para cada uno de los clones de cacao de este estudio, es acorde con el observado en otros clones de *T. cacao* que oscila entre 5 - 57  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  [29,36,37,50]. Este parámetro indica la DFFF a la cual la asimilación de  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis equilibra la tasa de  $\text{CO}_2$  emitida por la respiración mitocondrial, punto en el que el flujo neto del intercambio gaseoso total de  $\text{CO}_2$  es cero [28]. Al respecto, es importante resaltar que las plantas de cacao han sido catalogadas como tolerantes a la sombra con bajos PCL [15,51]; no obstante, de acuerdo con algunos autores [16,49] las plantas C3 de sombra tienen PCL que oscilan entre 1-5  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; mientras que los PCL de las plantas de sol estarían entre 10-30  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , como los obtenidos para los tres clones de cacao evaluados aquí. Estos resultados permiten sugerir que las plantas de cacao pueden ser cultivadas en sistemas productivos a libre exposición solar y son coincidentes con lo encontrado en otras investigaciones [30,33,34,52]. Se propone que para garantizar la condición de libre exposición solar en los sistemas productivos de cacao e incrementar el rendimiento, es indispensable que las plantas se siembren en monocultivo y no en asocio como tradicionalmente se hace, o sembrarse en asocio con otras especies de plantas, garantizando arreglos y distancias de siembra suficientes en los que no se presente competencia entre plantas por radiación solar y otros recursos del suelo y de la atmósfera. Aunque, se precisa que la implementación de estas prácticas de manejo del cultivo de cacao en sistemas productivos a libre exposición puede conllevar a mayores rendimientos, su implementación requiere de mayores áreas de cultivo, fertilización y aplicación de riego acorde con las necesidades de las plantas, mayor tecnificación y manejo agronómico del cultivo, lo que representa una mayor inversión económica que con frecuencia se constituye en una limitante para los pequeños productores de bajos recursos y en general para el sector cacaotero [34,42,51,53]. Se resalta que en las regiones de cultivo de cacao en Colombia, la utilización de plantas que proporcionen sombrío al cultivo de cacao se relaciona con los beneficios ecológicos y económicos que este arreglo de siembra aporta a los pequeños agricultores [54]; sin embargo, es interesante conocer si las plantas de cacao son más productivas cuando se siembran a libre exposición solar, aprovechando la plasticidad fenotípica de estas, al igual que la capacidad de aclimatación a las condiciones ambientales predominantes de las zonas de cultivo, que esta especie ha demostrado [15,29].

De forma complementaria, la tasa de respiración mitocondrial registrada para cada uno de los clones de cacao evaluados aquí, concuerdan con las  $R_D$  registradas en esta especie y para plantas C3 [29,51,55,56]. Se menciona que valores bajos de  $R_D$  contribuyen en la reducción del PCL puesto que ésta ( $R_D$ ) es compensada por una

fotosíntesis poco elevada [16], permitiendo a las plantas obtener un balance de carbono positivo cuando están expuestas a bajas DFFF.

Igualmente, el rendimiento cuántico de la fotosíntesis para los tres clones estuvo dentro de la escala encontrada para plantas de *T. cacao* (0.010-0.09  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol foton}^{-1}$ ) [35,36,50,55,57]. Igualmente, los valores del rendimiento cuántico de los clones de cacao estudiados aquí son acordes a los observados en plantas C3 en condiciones no estresantes (0.05  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol foton}^{-1}$ ) [49,50,56,58], sugiriendo que la  $A_{\text{max}}$  fue soportada por la luz disponible, y que los clones tuvieron la capacidad de emplear eficientemente la luz absorbida manteniendo un balance en la ganancia de carbono [31,35,59].

Adicionalmente, en relación con la  $A_{\text{max}}$ , se propone que una vez las plantas alcanzan el punto de saturación lumínico, la  $A$  no aumenta en respuesta al incremento de la DFFF debido a que la  $A$  es limitada por la disponibilidad de  $\text{CO}_2$ , y otras reacciones no lumínicas, puesto que tanto la tasa de transferencia de electrones como las enzimas del ciclo de Calvin no pueden funcionar a la misma velocidad en la que los fotones son absorbidos [16]. Se ha mencionado que una de las características por las que *T. cacao* ha sido considerada una especie tolerante a la sombra es la baja tasa de saturación en la asimilación neta de carbono que oscilan entre 1 y 8  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  [35,36,50], reportándose los valores más altos de  $A_{\text{max}}$  en plantas expuestas a mayores niveles de DFFF [15,28,29,32,52]. En el caso de los clones evaluados aquí, se observó que los valores de  $A_{\text{max}}$  fueron cercanos al límite superior al máximo encontrado en esta especie (8  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) sugiriendo una alta capacidad en la asimilación de  $\text{CO}_2$  y eficiencia en la utilización de la luz disponible [28,32]. Interesantemente, uno de los clones evaluados (EET 8) es ecuatoriano, de los cuales se ha sugerido que tienen mayores tasas fotosintéticas comparados con los cacaos criollos y forasteros, pudiendo cultivarse a DFFF de 1000  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con una  $A$  promedio de 8.5  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  [32,60].

Por su parte, los valores de PSL señalados para *T. cacao* tienen una amplia escala de variación como los observados en los clones aquí evaluados, encontrándose informes de valores desde 90 hasta 750  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en diferentes genotipos que crecieron en condiciones de campo e invernadero [10,29,31,50,51,57,61]. Dentro de esta escala de valores de saturación lumínica se encuentran aquellos característicos tanto de plantas C3 de sol (400-600  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) como de sombra (60 - 200  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) [49,56] lo que confirma la alta variación genética y plasticidad fisiológica propuesta para esta especie, la cual confiere a los genotipos la capacidad para responder a irradiancia de saturación [29,37]. Por consiguiente, se afirma que los genotipos de cacao que crecen a altas irradiancias presentan mayores tasas fotosintéticas que los

cultivados en condiciones de sombra [30,52]. Por ejemplo, se han encontrado plantas de cuatro años de edad, de clones trinitarios de cacao que crecen a plena exposición solar en las condiciones climáticas del municipio Landázuri, en Santander (Colombia), cuyo rendimiento se incrementó en un 51% debido a una adecuada fertilización [34]. Así mismo, se propone que plantas de cacao en las condiciones de la Amazonía colombiana pueden crecer en monocultivo en altas irradiancias con una mejor asimilación de carbono [15]. Se sugiere que lo anterior se debe a que *T. cacao* posee plasticidad fenotípica relacionada con algunas características fisiológicas y bioquímicas que le permiten crecer en DFFF contrastantes [29], estrategia de interés si se tiene en cuenta que el arreglo espacial del sistema de cultivo a plena exposición solar es una práctica de manejo implementada en cacao que es cada vez más frecuente en las principales regiones productoras de África Occidental [13], sistema que también suscita interés en regiones de producción de cacao de Latinoamérica. Así, la búsqueda y selección de clones con capacidad de tolerancia y respuesta al incremento de la irradiancia solar, como fenómeno asociado al cambio climático global, se enmarca dentro de las estrategias para conseguir rendimientos óptimos en cuanto a cantidad y características de calidad de interés para la comercialización del cacao [15,29,32,62].

Es interesante resaltar que el café, al igual que el cacao, fue considerado como una especie de sombra debido a su procedencia; sin embargo, esta especie vegetal también tiene la capacidad para crecer sin sombra, por lo que se ha propuesto que tiene plasticidad fenotípica suficiente para adaptarse a condiciones de luz contrastantes [59,63]. Acorde con esta idea, se hace interesante conocer si el cacao ha desarrollado mecanismos adaptativos similares a los reconocidos para plantas de café para aclimatarse a diversos niveles de intensidad lumínica, puesto que estos rasgos fisiológicos le conferirían mayor capacidad de respuesta a las plantas de cacao para crecer en hábitats con niveles altos de irradiancia, desplegando estrategias para incrementar la eficiencia en la asimilación de CO<sub>2</sub>, y por ende el rendimiento, mediante un mejor aprovechamiento y utilización de la RFA [35].

En concordancia con el comportamiento observado en la parte inicial de la curva de respuesta A/DFFF de los clones de cacao, las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis son determinantes de la utilización y aprovechamiento de la luz incidente por parte de las plantas ; mientras que en la parte final de la curva, en la cual ocurre la saturación de la fotosíntesis, son determinantes las reacciones de reducción del CO<sub>2</sub> a carbohidratos [49]. Los resultados obtenidos aquí con respecto a la fluorescencia de la clorofila a, permiten sugerir que los clones EET 8 e ICS 60 tienen una mayor capacidad para aclimatarse a mayores irradiancias manteniendo su actividad fotosintética mediante un mejor aprovechamiento de la luz disponible que el clon TSH 565 [16,35]. Un parámetro fisiológico que se asocia con el funcionamiento de los centros de reacción del FSII es el

rendimiento cuántico máximo ó eficiencia fotoquímica del FSII ( $F_v/F_m$ ), el cual para plantas que tienen un adecuado funcionamiento del aparato fotosintético tiene un valor típico de 0.80 [64] y para plantas sin fotoinhibición crónica tiene una escala de valores entre 0.71 a 0.83 [22]. Aquí, los clones de cacao EET 8 e ICS 60 presentaron valores de  $F_v/F_m$  de 0.70, que han sido encontrados en cultivares de cacao criollo en Venezuela, y fueron asociados a una baja disponibilidad de fósforo [65]. No obstante, la tasa de transporte de electrones a través del FSII (TTE) y la proporción de luz absorbida por el complejo antena que impulsa el proceso fotoquímico en el FSII (Y (II)) observadas en estos dos clones concuerdan con la mayor  $F_v/F_m$  presentada y sugieren una mayor actividad fotoquímica y mejor uso de la luz [28,60]. Mientras que, para el clon TSH 565, la  $F_v/F_m$  fue menor (0.63), al igual que el Y(II) y la TTE; por ello, se sugiere que este clon presentó una menor capacidad de transferencia de la energía captada debido a un menor porcentaje de centros de reacción del FSII funcionales. Lo anterior, probablemente producto de la regulación a la baja del aparato fotosintético en condiciones de alta DFFF [33] o debido a procesos de fotoprotección relacionados con una respuesta reguladora en la planta para acomodar la fotosíntesis a las condiciones ambientales, más que a un proceso asociado a la ocurrencia de daños en el aparato fotosintético [66,67].

En conclusión, los clones de cacao trinitario de importancia comercial evaluados aquí mostraron diferencias en la capacidad y respuesta fotosintética en relación con el incremento de la DFFF, por lo que, interesantemente, tienen la capacidad fisiológica para aclimatarse y crecer en condiciones de diferente irradiancia. Los clones EET 8 e ICS 60 presentaron el mejor desempeño fotosintético, mostrando mayor capacidad de aclimatación cuando los niveles de irradiancia de fotones son altos; por ello, se sugieren como adecuados candidatos para ser implementados en sistemas de producción de monocultivo. Así mismo como el clon TSH 565 mostró el menor desempeño fotosintético en función con el incremento de la DFFF, se debe considerar que este clon requiere condiciones de sombra, por lo tanto, se hace necesario aplicar estrategias de manejo que permitan regular los niveles de radiación solar incidente sobre las hojas y, por lo tanto, se propone que este clon sea empleado en condiciones de sistemas agroforestales, en asocio con otras plantas, como tradicionalmente se siembra. Aunque se ha indicado que *T. cacao* requiere baja irradiancia asociada con las condiciones ambientales de su hábitat natural (sotobosque) y debido a su tradicional cultivo en sistemas agroforestales en asocio con otras especies vegetales que proporcionan sombra, las evidencias de su exitosa siembra en sistemas de sol soportan que esta especie ha desarrollado mecanismos que le permiten aclimatarse a ambientes con mayores intensidades lumínicas, no obstante, requerirán mayor manejo agronómico en cuanto a disponibilidad de agua, fertilización, densidades de siembra, etc. Así, el empleo de un sistema u otro dependerá en gran medida del interés, extensión disponible para el cultivo y capacidad

de inversión del agricultor, siendo imperante evaluar los materiales genéticos a utilizar acorde con la condición de irradiancia para verificar su capacidad de aclimatación al ambiente proporcionado.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal de la empresa Geoambiente SAS, muy especialmente al señor Rafael Sierra por su compromiso constante y apoyo en el desarrollo de las investigaciones. Igualmente, al señor Rodrigo Centeno por su apoyo técnico durante el desarrollo del experimento.

Mayra Osorio fue beneficiaria del programa de becas "Formación de Capital Humano de Alto Nivel para el Departamento de Norte de Santander" ID 753 otorgado por la Gobernación de Norte de Santander y Minciencias (Ministerio de Ciencia, Tecnología e innovación) que financió sus estudios de doctorado en el marco del cual se realizó esta investigación.

Esta investigación fue financiada con recursos de investigación de la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana otorgados al proyecto con ID 7939.

### RESUMEN

**Introducción:** El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de importancia económica mundial conocido por sus semillas de las cuales se obtiene el chocolate. A pesar de ser catalogado como una especie tolerante a sombra, algunos genotipos de cacao pueden crecer a plena exposición a luz solar. **Objetivo:** Caracterizar la respuesta fotosintética a la densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) en los clones híbridos de cacao EET 8, ICS 60 y TSH 565. **Métodos:** El estudio se llevó a cabo en condiciones de invernadero: se obtuvieron las curvas de respuesta fotosintética en plantas de 5 meses de edad para cada clon (n=3) expuestas a valores de DFFF entre 0 – 1 000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e igualmente se evaluó el funcionamiento del aparato fotoquímico mediante parámetros asociados con las reacciones lumínicas de la fotosíntesis. Así, el comportamiento fotosintético se analizó a partir de parámetros como la fotosíntesis a saturación por DFFF ( $A_{\text{max}}$ ), el punto de compensación lumínico (PCL), el punto de saturación lumínico (PSL), la tasa respiratoria mitocondrial ( $R_D$ ), el rendimiento cuántico de la fotosíntesis ( $\Phi$ ), la tasa de transporte de electrones (TTE), el rendimiento ( $Y[\text{II}]$ ) y eficiencia cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ). **Resultados:** En general, se encontraron diferencias en la capacidad fotosintética de los clones de cacao evaluados, siendo EET 8 e ICS 60 los clones con mayor actividad fotosintética y aprovechamiento de la luz disponible y TSH 565 el que mostró más afectación en su desempeño fotosintético con el incremento de la DFFF. Igualmente, la eficiencia máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ) fue mayor en EET 8 e ICS 60. No obstante, a pesar de que TSH 565 presentó una  $F_v/F_m$  menor, la fotosíntesis no mostró afectación por lo que

no hubo evidencia de fotoinhibición. **Conclusión:** Las diferencias encontradas en la respuesta fotosintética de los clones a la irradiancia podrían ser aprovechadas para orientar el uso de un clon en particular en condiciones específicas de irradiancia. Asimismo, este conocimiento puede ser utilizado para implementar las prácticas de manejo adecuadas en los sistemas de producción de cacao, conforme a los requerimientos y exigencias de la DFFF no restrictiva para la fotosíntesis, bajo la cual los clones evaluados puedan expresar su óptima capacidad y potencial fotosintético, conduciendo a mayores rendimientos.

**Palabras clave:** curvas de respuesta a la luz, punto de saturación de luz, punto de compensación de luz, eficiencia cuántica, respuesta fotosintética, eficiencia del FSII

### REFERENCIAS

- [1] Motamayor JC., Risterucci AM., Lopez PA., Ortiz CF., Moreno A., Lanaud C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5):380–6, 2002. Doi: 10.1038/sj.hdy.6800156
- [2] Mejía Florez LA., Argüello Castellanos O. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao:144, 2000. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Bucaramanga, Colombia. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/3832>
- [3] Carr MK V., Lockwood G. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.): A Review. *Experimental Agriculture*, 47(4):653–76, 2011. Doi: 10.1017/s0014479711000421
- [4] Voora V., Bermúdez S., Larrea C. Global Market Report: Cocoa. *International Institute for Sustainable Development*, Canada, 13p, 2019. Recuperado de: <https://www.jstor.org/stable/pdf/resrep22025.pdf>
- [5] ICCO. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLVI, No.1, Cocoa year 2019/20*
- [6] FAO. Base de datos FAOSTAT, Crops, 2021. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- [7] Osorio-Guarín JA., Berdugo-Cely J., Coronado RA., Zapata YP., Quintero C., Gallego-Sánchez G., Yockteng R. Colombia a source of cacao genetic diversity as revealed by the population structure analysis of germplasm bank of *Theobroma cacao* L. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.01994
- [8] Rodriguez-Medina C., Arana AC., Sounigo O., Argout X., Alvarado GA., Yockteng R. Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*,:373–82, 2019. Doi: 10.1270/jsbbs.19011
- [9] Schroth G., Läderach P., Martinez-Valle AI., Bunn C., Jassogne L. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: Patterns, opportunities and limits to adaptation. *Science of the Total Environment*, 556:231–41, 2016. Doi:

10.1016/j.scitotenv.2016.03.024

- [10] Medina V., Laliberte B. A review of research on the effects of drought and temperature stress and increased CO<sub>2</sub> on *Theobroma cacao* L., and the role of genetic diversity to address climate change. *Costa Rica: Bioversity International*, 2017
- [11] Lahive F., Hadley P., Daymond A. The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(1):5, 2019. Doi: 10.1007/s13593-018-0552-0
- [12] Singh J., Thakur JK. Photosynthesis and abiotic stress in plants. *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer Singapore, 27–46, 2018. Doi: 10.1007/978-981-10-9029-5\_2
- [13] Abdulai I., Vaast P., Hoffmann MP., Asare R., Jassogne L., Van Asten P., Rotter RP., Graefe S. Cocoa agroforestry is less resilient to sub-optimal and extreme climate than cocoa in full sun. *Global Change Biology*, 24(1):273–86, 2018. Doi: 10.1111/gcb.13885
- [14] Schwendenmann L., Veldkamp E., Moser G., Hölscher D., Köhler M., Clough Y., Anas I., Djajakirana G., Erasmi S., Hertel D., Leitner D., Leuschner C., Michalzik B., Propastin P., Tjoa A., Tschardt T., van Straaten O. Effects of an experimental drought on the functioning of a cacao agroforestry system, Sulawesi, Indonesia. *Global Change Biology*, 16(5):1515–30, 2010. Doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02034.x
- [15] Salazar JCS., Melgarejo LM., Casanoves F., Di Rienzo JA., DaMatta FM., Armas C. Photosynthesis limitations in cacao leaves under different agroforestry systems in the Colombian Amazon. *PLoS ONE*, 13(11), 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0206149
- [16] Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology and Development*:761, 2014
- [17] Lambers H., Oliveira RS. Plant physiological ecology. *Plant Physiological Ecology*,:1–699, 2019. Doi: 10.1007/978-3-030-29639-1
- [18] Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 2015
- [19] Vitale L. Photoinhibition and Photoprotection under Environmental Stresses. *Abiotic and Biotic Stress Journal*, 1(1):1–2, 2015. Doi: 10.17582/journal.absjournal/2015/1.1.1.2
- [20] Tian Y., Sacharz J., Ware MA., Zhang H., Ruban A V. Effects of periodic photoinhibitory light exposure on physiology and productivity of Arabidopsis plants grown under low light. *Journal of Experimental Botany*, 68(15):4249–62, 2017. Doi: 10.1093/jxb/erx213

- [21] Moreno SG., Vela HP., Alvarez MOS. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4):119–29, 2008. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/490/49011464003.pdf>
- [22] Baker NR. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol*, 59:89–113, 2008. Doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- [23] Knopf RR., Adam Z. Lumenal exposed regions of the D1 protein of PSII are long enough to be degraded by the chloroplast Deg1 protease. *Scientific Reports*, 8(1):5230, 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-23578-x
- [24] Herrmann HA., Schwartz J-M., Johnson GN. From empirical to theoretical models of light response curves - linking photosynthetic and metabolic acclimation. *Photosynthesis Research*, 145(1):5–14, 2020. Doi: 10.1007/s11120-019-00681-2
- [25] Melgarejo LM., Hernández S., Barrera J., Solarte ME., Suárez D., Pérez LV., Rojas YA., Cruz Aguilar M., Moreno Álvarez LG., Crespo S. Experimentos en fisiología vegetal:277, 2010. Recuperado de: [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Experimentos\\_en\\_fisiologia\\_Vegetal/ExperimentosEnFisiologiaVegetal.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Experimentos_en_fisiologia_Vegetal/ExperimentosEnFisiologiaVegetal.pdf)
- [26] Von Caemmerer S. Biochemical models of leaf photosynthesis. Csiro publishing, 2000
- [27] Acheampong K., Hadley P., Daymond AJ. Photosynthetic activity and early growth of four cacao genotypes as influenced by different shade regimes under West African dry and wet season conditions. *Experimental Agriculture*, 49(01):31–42, 2013. Doi: 10.1017/S0014479712001007
- [28] De Almeida J., Ávila-Lovera E., Jaimez RE., Araque O., González R., Tezara W. Características fotosintéticas de cuatro clones de cacao en un sistema agroforestal en Barlovento, Edo. Miranda. *Investigación y Saberes*, 6(3):3–21, 2017
- [29] De Almeida J., Herrera A., Tezara W. Phenotypic plasticity to photon flux density of physiological, anatomical and growth traits in a modern Criollo cocoa clone. *Physiologia Plantarum*, 166(3):821–32, 2019. Doi: 10.1111/ppl.12840
- [30] Galyuon IKA., McDavid CR., Lopez FB., Spence JA. effect of irradiance level on cocoa (*Theobroma cacao* L.). Growth and leaf adaptations. *Tropical Agriculture*, 1996. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/264550849>
- [31] Baligar VC., Bunce JA., Machado RCR., Elson MK. Photosynthetic photon flux density, carbon dioxide concentration, and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica*, 46(2):216–21, 2008. Doi: [doi.org/10.1007/s11099-008-0035-7](https://doi.org/10.1007/s11099-008-0035-7)

- [32] Jaimez RE., Amores Puyutaxi F., Vasco A., Gastón L., Tarqui O., Quijano G., Jimenez JC., Tezara W. Photosynthetic response to low and high light of cacao growing without shade in an area of low evaporative demand. *Acta Biológica Colombiana*, 23(1):95–103, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n1.64962>
- [33] Tezara W., De Almeida J., Valencia E., Cortes JL., Bolaños MJ. Actividad fotoquímica de clones élites de cacao (*Theobroma cacao* L.) Ecuatoriano en el norte de la provincia Esmeraldas. *Investigación y Saberes*, IV(3):37–52, 2015
- [34] Uribe A., Méndez H., Mantilla J. Efecto de niveles de nitrógeno, fósforo y potasio en la producción de cacao en Colombia. *Informaciones Agronómicas*, 41:1–4, 2000. Recuperado de: [http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/19\\_Fertilizacion\\_del\\_cacao.pdf](http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/19_Fertilizacion_del_cacao.pdf)
- [35] Almeida A-AF., Gomes FP., Araujo RP., Santos RC., Valle RR. Leaf gas exchange in species of the *Theobroma* genus. *Photosynthetica*, 52(1):16–21, 2014. Doi: 10.1007/s11099-013-0048-8
- [36] Tezara W., Urich R., Jaimez R., Coronel I., Araque O., Azocar C., Chacón I. Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as Forastero? *Botanical Sciences*, 94(3):563–74, 2016. Doi: 10.17129/botsci.552
- [37] Daymond AJ., Tricker PJ., Hadley P. Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. *Biologia Plantarum*, 55(1):99–104, 2011. Doi: 10.1007/s10535-011-0013-y
- [38] Perea Villamil A., Martínez Guerrero N., Aranzazu Hernández F., Cadena Cala T. Características de calidad del cacao de Colombia: catálogo de 26 cultivares, 2017
- [39] Joly RJ., Hahn DT. An empirical model for leaf expansion in cacao in relation to plant water deficit. *Annals of Botany*, 64(1):1–8, 1989. Doi: [doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087800](http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087800)
- [40] Bekele FL., Bekele I., Butler DR., Bidaisee GG. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao* L.) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5):933–48, 2006. Doi: 10.1007/10722-004-6692-x
- [41] Johnson ES., Bekele FL., Brown SJ., Song Q., Zhang D., Meinhardt LW., Schnell RJ. Population structure and genetic diversity of the Trinitario cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. *Crop Science*, 49(2):564–72, 2009. Doi: 10.2135/cropsci2008.03.0128
- [42] García Lozano J. Caracterización de las respuestas fisiológicas y bioquímicas en tres clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) sometidos a diferentes niveles de déficit hídrico, 2014, Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/52256>

- [43] Cardona BS. Acuerdo 003. Clones para Cacao en Colombia. *Chocoandino*, Bogotá, 2010. Recuperado de: [http://huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS PRODUCTIVAS/CLONES DE CACAO PARA COLOMBIA.pdf](http://huila.gov.co/documentos/agricultura/CADENAS_PRODUCTIVAS/CLONES_DE_CACAO_PARA_COLOMBIA.pdf)
- [44] Allen RG. Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos, 2006
- [45] dos Santos CM., Verissimo V., de Lins Wanderley Filho HC., Ferreira VM., da Silva Cavalcante PG., Rolim EV., Endres L. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. *Industrial Crops and Products*, 41:203–13, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>
- [46] Coe RA., Lin HC. Light-response curves in land plants. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1770, Humana Press Inc., 83–94, 2018. Doi: 10.1007/978-1-4939-7786-4\_5
- [47] Lobo F de A., de Barros MP., Dalmagro HJ., Dalmolin ÂC., Pereira WE., de Souza ÉC., Vourlitis GL., Rodríguez Ortíz CE. Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica*, 51(3):445–56, 2013. Doi: 10.1007/s11099-013-0045-y
- [48] Bates DM., Watts DG. *Nonlinear regression analysis and its applications*. Wiley seri. New York: John Wiley & Sons, 2007.
- [49] Azcón - Bieto J., Talón M. Fundamentos de Fisiología Vegetal:669, 2013
- [50] Avila-Lovera E., Coronel I., Jaimez R., Urich R., Pereyra G., Araque O., Chacon I., Tezara W. Ecophysiological traits of adult trees of Criollo cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) from a germplasm bank in Venezuela. *Experimental Agriculture*, 52(01):137–53, 2016. Doi: 10.1017/S0014479714000593
- [51] Almeida A-A., Valle RR. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4):425–48, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400011>
- [52] Miyaji K-I., da Silva WS., Alvim P de T. Productivity of leaves of a tropical tree, *Theobroma cacao*, grown under shading, in relation to leaf age and light conditions within the canopy. *New Phytologist*, 137(3):463–72, 1997. Doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00841.x
- [53] Alvim P de T. El problema del sombreamiento del cacao bajo el punto de vista fisiológico. *Agronomía*, 25(92):34–42, 1958
- [54] Wickramasuriya AM., Dunwell JM. Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1):4–17, 2018. Doi: 10.1111/pbi.12848
- [55] Bertolde FZ., Almeida A-AF., Pirovani CP., Gomes FP., Ahnert D., Baligar VC.,

- Valle RR. Physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to flooding. *Photosynthetica*, 50(3):447–57, 2012. Doi: 10.1007/s11099-012-0052-4
- [56] Rivera-Méndez YD., Romero HM. Fitting of photosynthetic response curves to photosynthetically active radiation in oil palm. *Agronomia Colombiana*, 35(3):323–9, 2017. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n3.63119
- [57] Lahive F., Hadley P., Daymond AJ. The impact of elevated CO<sub>2</sub> and water deficit stress on growth and photosynthesis of juvenile cacao (*Theobroma cacao* L.). *Photosynthetica*, 56(3):911–20, 2018. Doi: 10.1007/s11099-017-0743-y LB - Lahive2017
- [58] Apsara SE., Rajesh MK., Balasimha D. Assessment of morphological, physiological and molecular characteristics of cocoa accessions from Central and South America in relation to drought tolerance. *Journal of Plantation Crops*, 41(3):389–97, 2013
- [59] Matos FS., Wolfgramm R., Gonçalves F V., Cavatte PC., Ventrella MC., DaMatta FM. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2):421–7, 2009. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.06.018
- [60] Tezara W., Valencia E., Reynel V., Bolaños M., Blanco H. Actividad fotosintética y su relación con el rendimiento de diez clones de cacao nacional. *Revista ESPAMCIENCIA*, 11(1):19–27, 2020
- [61] De Almeida J., Tezara W., Herrera A. Physiological responses to drought and experimental water deficit and waterlogging of four clones of cacao (*Theobroma cacao* L.) selected for cultivation in Venezuela. *Agricultural Water Management*, 171:80–8, 2016. Doi: 10.1016/j.agwat.2016.03.012
- [62] Fraga Junior LS., Vellame LM., de Oliveira AS., da Silva Paz VP. Transpiration of young cocoa trees under soil water restriction. *Scientia Agricola*, 78(2):8, 2020. Doi: 10.1590/1678-992x-2019-0093
- [63] Martins SC V., Araújo WL., Tohge T., Fernie AR., DaMatta FM. In High-Light-Acclimated Coffee Plants the Metabolic Machinery Is Adjusted to Avoid Oxidative Stress Rather than to Benefit from Extra Light Enhancement in Photosynthetic Yield. *PLoS ONE*, 9(4):e94862, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0094862
- [64] Maxwell K., Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659–68, 2000. Doi:092759/annurev.arplant.59.032607.092759
- [65] Araque O., Jaimez RE., Tezara W., Coronel I., Urich R., Espinoza W. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Experimental Agriculture*, 48(4):513–22, 2012. Doi: 10.1017/S0014479712000427

- [66] Osmond B., Förster B. Photoinhibition: Then and Now. Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment, Springer, Dordrecht, 11–22, 2008. Doi: 10.1007/1-4020-3579-9\_2
- [67] Bhattacharjee S., Saha AK. Plant Water-Stress Response Mechanisms. *Approaches to Plant Stress and their Management*, New Delhi: Springer India, 149–72, 2014. Doi: 10.1007/978-81-322-1620-9\_8