



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Efecto de la restricción del volumen de suelo  
ocupado por las raíces sobre la fotosíntesis de  
*Theobroma cacao* L.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por el Bachiller Alejandro Antonio  
Angel Nuñez como requisito parcial  
para optar al título de Licenciado en  
Biología.

Tutor: Dr. Wilmer Tezara.

CARACAS, VENEZUELA.

FEBRERO 2013

## AGRADECIMIENTOS

*Primero, quiero dar gracias a la UCV, la casa que vence las sombras y por supuesto a la Facultad de Ciencias por haberme otorgado las herramientas necesarias en mi proceso de formación y aprendizaje académico.*

*Gracias, al IBE, al INIA y todo su personal por prestar sus instalaciones, equipos y plántulas para el desarrollo del TEG.*

*Gracias, en especial a mi madre por ser ejemplo de lucha, constancia, educación y demás cualidades, saliendo adelante frente cualquier adversidad, piedra o tropiezo en este corto camino; en fin es para ella y representa uno de mis mejores regalos.*

*Gracias, a mis hermanas Candy y Nathaly por ese apoyo incondicional, ser parte de mis penas y logros en la carrera; y lo mas importante, por ser ejemplos a seguir en el continuo crecimiento personal.*

*Gracias, a mis mascotas Mamy, Shana y Shera por mostrar su lealtad y ser los seres mas fieles acompañándome en la computadora en el curso de la carrera.*

*Gracias, a David, por ser mas que un pana, amigo, casi un hermano de crianza, por sus consejos y por acompañarme en todo momento.*

*Gracias, a mi pana Robert por su apoyo, actitud y amistad demostrada en cada informe, parcial, quíz o cualquier tipo de evaluación, hasta en las madrugadas con "Ron y Cheese tris".*

*Gracias, A mi novia, Carolina, por acompañarme a lo largo de la carrera con sus ocurrencias y en especial en los últimos años con su compañía, pensamientos, cariño y el mejor ejemplo de seguir adelante, haciendo las cosas con el mejor de los ánimos y entusiasmo para alcanzar un éxito que aun no había sido palpable.*

*Gracias, a Wilmer, por ser mi tutor y mi pana al enseñarme aspectos no solo académicos sino también personales de la vida diaria con frases como “Ángel ponte las pilas” que sin duda me hicieron una mejor persona.*

*Gracias, a las muchachas Eleinis y Jenny por su ayuda, regaños, compañeras y en especial por ser grandes personas al acompañarme con sus consejos y vivencias tanto en el laboratorio como fuera de él.*

*Gracias, al grupo de trabajo de Ecofisiología Vegetal, a las Profes. Rosa Urich, Alicia Cáceres e Ilsa Coronel, por todo lo enseñado en esta última etapa importante y por sus ocurrencias en las salidas de campo y en el laboratorio.*

*Gracias a todos los muchachos: Jennifer, Mimi, María, Raibel, Gato, Omar, Roberto, Kimberlyn, Yaremis, Alicia, Erick, Antonio, Cerraf, por ser parte de noches y días de estudio, caña, rumbas y más; por ser grandes personas y amigos. Por último, gracias a todos aquellas personas y amigos que no nombre pero que los tengo en mi pensamiento y formaron parte de mi carrera universitaria.*

*Gracias....a todos....*

## RESUMEN

El cultivo de plantas bajo condiciones ambientales semi-controladas en invernaderos o viveros, generalmente se hace en potes durante tiempos prolongados, lo que genera un estrés abiótico que puede afectar la capacidad fotosintética, el crecimiento y el desarrollo vegetal. Estudios realizados en especies de interés económico demuestran, que al ser cultivadas en un volumen de pote pequeño (P) ocurre una limitación en el crecimiento radicular, conduciendo a alteraciones en la relación fuente-sumidero de las plantas, así como en la respuesta fotosintética. El principal objetivo de este estudio fue evaluar la regulación de la fotosíntesis y de crecimiento en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivadas en diferentes volúmenes de suelo. Para ello, se determinaron parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia de clorofila *a*, parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa en plántulas cultivadas en diferentes volúmenes de suelo: Grande (11,2 L; G), Mediano (7,5 L; M) y Pequeño (2,2 L; P). En el primer (PE) y segundo experimento (SE) se obtuvo una reducción de A en P, sugiriendo una posible inhibición de A por “feedback” (retroalimentación negativa). La reducción en  $R_d$ , PCL en P y ningún cambio en  $A_{DFFsat}$  entre tratamientos, fue atribuido a una mayor capacidad de suministro de asimilados y una disminución de la fuerza del sumidero, posiblemente a causa de un equilibrio entre los mecanismos “feedforward” y “feedback”. La disminución en  $Cl_a$ ,  $Cl_b$  y  $Cl_{a+b}$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$ , J y mantenimiento en  $F_v/F_m$ , indica un ajuste en la actividad fotoquímica, sugiriendo una menor producción de ATP y NADPH. El mantenimiento de PST, EC y la reducción en  $A_{CO2sat}$ , sugieren una limitación de A por regeneración de RuBP y no por el contenido y/o actividad de Rubisco. El mantenimiento de  $L_s$  y aumento de  $L_m$ , sugiere que los factores mesofiliares afectan en mayor grado la A. La reducción de  $A_D$  en P y el mantenimiento de  $R_{dN}$  entre tratamientos, indican una alteración en el equilibrio de

carbono. La reducción en peso seco total, medidas alométricas y parámetros de crecimiento sugieren una interrelación entre el crecimiento y el desempeño fisiológico y bioquímico. El cultivo de plántulas de cacao en P durante 5 meses, ocasionó una limitación en el crecimiento radical, que trajo como consecuencia alteraciones en la relación fuente-sumidero, ocasionando la reducción de la respuesta fisiológica, bioquímica y de crecimiento. Por lo tanto, los volúmenes de pote mas adecuados son los G y M, en los cuales estas respuestas no se vieron afectadas. La selección de volúmenes de pote adecuado y el tiempo en el cual se encuentran cultivados, son factores importantes a tener en cuenta no sólo en la realización de experimentos sino también en la obtención de plantas que presenten un mejor desempeño fisiológico y de crecimiento para ser cultivadas en el campo.

# INDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
Introducción.....	1
Antecedentes.....	8
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Área de estudio y material vegetal.....	14
Parámetros microclimáticos.....	15
Estado hídrico.....	16
Intercambio de gases.....	16
Curva de respuesta A vs $C_i$ (A/ $C_i$ ).....	17
Curva de respuesta A vs DFF (A/DFF).....	17
Actividad fotoquímica del PSII.....	18
Determinaciones bioquímicas.....	19
Parámetros de crecimiento.....	19
Biomasa.....	19
Análisis de crecimiento.....	20
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	22
1. Microclima.....	22
2. Estado hídrico.....	22
3. Intercambio de gases.....	24

3.1. Fotosíntesis instantánea en PE.....	24
3.2. Fotosíntesis instantánea en SE.....	25
3.3. Intercambio gaseoso integrado.....	26
3.4. Curvas de respuesta A vs Ci.....	28
3.5. Curvas de respuesta A vs DFF.....	30
4. Actividad fotoquímica del PSII.....	32
5. Determinaciones bioquímicas.....	33
6. Parámetros de crecimiento.....	34
7. Biomasa seca .....	36
8. Análisis de crecimiento.....	37
Discusión.....	39
Conclusiones.....	49
Bibliografía.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Phi_{CO_2}$ : eficiencia cuántica aparente de la fotosíntesis.

A: tasa de fotosíntesis.

$A_{CO_2sat}$ : A a  $CO_2$  saturante.

$A_D$ : tasas de fotosíntesis diurna integrada.

$A_{DFFsat}$ : tasa máxima de fotosíntesis a DFF saturante.

AFE: área foliar específica.

AFT: área foliar total.

ANOVA: análisis de varianzas

ATP: adenosin trifosfato.

C: control.

$C_a$ : concentración atmosférica de  $CO_2$ .

CAF: cociente de área foliar.

$C_i$ : concentración intercelular de  $CO_2$ .

$Cl_{a/b}$ : relación de clorofilas a y b.

$Cl_a$ : concentración de clorofila *a*.

$Cl_{a+b}$ : Concentración de clorofilas totales.

$Cl_b$ : concentración de clorofila *b*.

CPF: cociente de peso foliar.

DFF: densidad de flujo fotónico.

$DFF_{amb}$ : densidad de flujo fotónico ambiental.

$DFF_{sat}$ : densidad de flujo fotónico saturante.

DH: déficit hídrico

E: tasa de transpiración.

EC: eficiencia de carboxilación.

$E_D$ : tasa de transpiración diurna integrada.

EUA: eficiencia de uso de agua.

$EUA_D$ : eficiencia de uso de agua diurna integrada.

F: fluorescencia estable de hojas adaptadas a luz.

$F'_m$ : fluorescencia máxima de hojas adaptadas a luz.

$F'_o$ : fluorescencia mínima de hojas adaptadas a luz.

$F_m$ : fluorescencia máxima de hojas adaptadas a oscuridad.

$F_o$ : fluorescencia mínima de hojas adaptadas a oscuridad.

$F_R$ : tasa de fotorrespiración.

$F_v/F_m$ : eficiencia cuántica máxima del PSII

$F_v$ : fluorescencia variable.

G: grande.

$g_s$ : conductancia estomática.

HR: humedad relativa del aire.

J: tasa de transporte de electrones.

$L_m$ : limitación mesofilar relativa.

$L_s$ : limitación estomática relativa.

M: mediano.



NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

P: pequeño.

PCL: punto de compensación de luz.

$P_i$ : fósforo inorgánico.

PSII: fotosistema II.

PST: proteínas solubles totales.

$q_N$ : coeficiente de extinción no fotoquímica.

$q_P$ : coeficiente de extinción fotoquímica.

R/V: relación raíz-vástago.

$R_d$ : tasa de respiración en oscuridad.

$R_{dN}$ : tasa de respiración nocturna integrada.

RuBP: ribulosa-1,5-bisfosfato.

$T_a$ : temperatura del aire.

$T_{amb}$ : temperatura del aire ambiental.

TAN: tasa de asimilación neta.

$T_f$ : temperatura foliar.

TRC: tasa relativa de crecimiento.

$V_{cmáx}$ : tasa máxima de carboxilación.

$\Gamma$ : punto de compensación de  $CO_2$ .

$\Delta_{hoja-aire}$ : gradiente de presión de vapor hoja-aire.

$\Phi_{PSII}$ : eficiencia cuántica relativa del PSII.

$\Psi$ : potencial hídrico foliar.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de síntesis de sacarosa y almidón.....	3
Figura 2. a) <i>Hura crepitans</i> ; b y c) Plantas de Cacao (IMC67 x Santa Cruz10) al inicio del segundo experimento, colocadas en diferentes volúmenes de suelo bajo el dosel.....	15
Figura 3. Promedio de cursos diarios del PE y SE de: a) densidad de flujo fotónico (DFF) fuera del dosel (○) y bajo el dosel (●); b) Temperatura del aire ( $T_a$ ); c) Humedad relativa; d) Temperatura foliar ( $T_f$ ) (HR) y e) Gradiente de presión de vapor hoja-aire ( $\Delta_{\text{hoja-aire}}$ ) en los diferentes tratamientos: C (□), G (■), M (▲) y P (●). Los valores son la media $\pm$ ES (n=5).....	23
Figura 4. Parámetros de intercambio gaseoso del PE a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $T=25^\circ\text{C}$ . a) Fotosíntesis (A); b) Transpiración (E); c) conductancia estomática ( $g_s$ ) y d) eficiencia de uso de agua (EUA). Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=3).....	24
Figura 5. Parámetros de intercambio gaseoso mensuales del SE a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $T=25^\circ\text{C}$ . a) Fotosíntesis (A); b) Transpiración (E); c) conductancia estomática ( $g_s$ ) y d) eficiencia de uso de agua (EUA). Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=6).....	25
Figura 6. Parámetros de intercambio gaseoso integradas diurnas a $\text{DFF}_{\text{amb}}$ ( $300\text{-}500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el $t_0$ y $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el $t_{3.5}$ ) y $T_{\text{amb}}$ promedio ( $24,5^\circ\text{C}$ ) en el SE. a) Fotosíntesis integrada diurna ( $A_D$ ); b) Transpiración integrada diurna ( $E_D$ ); c) Eficiencia de uso de agua diurna integrada ( $\text{EUA}_D$ ). Los diferentes colores de las barras indican los	

diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=6).....	27
Figura 7. Respiración integrada nocturna ( $R_{dN}$ ) a $DF_{amb}$ y $T_{amb}$ medidas en el $t_5$ del SE. Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=3).....	28
Figura 8. Curva de respuesta de fotosíntesis a la concentración intercelular de $CO_2$ ( $A/C_i$ ) de los diferentes tratamientos: C ( $\square$ ), G ( $\blacksquare$ ), M ( $\blacktriangle$ ) y P a) en el PE ( $t_4$ ) (n=3), b) al $t_0$ ( $\circ$ ), c) al $t_3$ y d) al $t_5$ en el SE. Los valores son la media $\pm$ ES(n=4).....	29
Figura 9. Curva de respuesta de la fotosíntesis a la densidad de flujo fotónico ( $A/DF$ ) de los diferentes tratamientos: C ( $\square$ ), G ( $\blacksquare$ ), M ( $\blacktriangle$ ) y P ( $\bullet$ ), a) al $t_0$ ( $\circ$ ), b) al $t_3$ y c) al $t_5$ del SE. Los valores son la media $\pm$ ES (n=4).....	31
Figura 10. Medidas alométricas no destructivas (área foliar, diámetro del tallo, altura y número de hojas) realizadas mensualmente a los diferentes tratamientos: G ( $\blacksquare$ ), M ( $\blacktriangle$ ) y P ( $\bullet$ ), en el segundo experimento. Los valores son la media $\pm$ ES (n=6).....	35
Figura 11. Posible modelo del mecanismo de regulación metabólico de A y su relación con los parámetros de crecimiento, medidas alométricas y acumulación de peso seco en plántulas de cacao.....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Potencial hídrico ( $\Psi$ ) matutino (7 am) y al mediodía (12 am) de hojas (n=6) al $t_5$ del SE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media $\pm$ ES.....	22
Tabla 2. Tasas de fotosíntesis a $\text{CO}_2$ saturante ( $A_{\text{CO}_2\text{sat}}$ ), tasa de fotorespiración ( $F_R$ ), eficiencia de carboxilación (EC) y punto de compensación de $\text{CO}_2$ ( $\Gamma$ ), determinados en los diferentes tratamientos en el PE al $t_4$ (n=3) y en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ , $t_3$ y $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=4).....	30
Tabla 3. Tasas de fotosíntesis a DFF saturante ( $A_{\text{DFFsat}}$ ), respiración en oscuridad ( $R_d$ ), eficiencia cuántica aparente ( $\phi_{\text{CO}_2}$ ) y punto de compensación de Luz (PCL), realizados en los diferentes tratamientos en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ , $t_3$ y $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=4).....	32
Tabla 4. Valores instantáneos de los parámetros de fluorescencia: tasa de transporte de electrones (J), eficiencia cuántica relativa del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), coeficiente de extinción fotoquímica ( $q_p$ ), coeficiente de extinción no fotoquímica ( $q_N$ ) y eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ), determinados en los diferentes tratamientos en el SE a los tiempos $t_0$ , $t_1$ y $t_3$ . Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=6).....	33
Tabla 5. Contenido de clorofilas a ( $Cl_a$ ), b ( $Cl_b$ ), totales ( $Cl_{a+b}$ ), relación $Cl_{a/b}$ y proteínas solubles totales (PST) determinados en los diferentes tratamientos en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ , $t_3$ y $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media $\pm$ ES (n=5).....	34

Tabla 6. Valores de medidas alométricas no destructivas (Altura, Número de hojas y diámetro del tallo) del PE al t <sub>4</sub> . Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media ± ES (n=3).....	34
Tabla 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías realizado a las medidas alométricas determinadas por tratamiento (G, M y P), tiempo (t <sub>0-5</sub> ) y tratamiento x tiempo (p≤0.05).....	36
Tabla 8. Distribución de biomasa: Peso seco de raíz, tallo, hojas y peso seco total realizados en los diferentes tratamientos en el PE al t <sub>4</sub> (n=3) y en el SE a los diferentes tiempos (t <sub>0</sub> , t <sub>3</sub> y t <sub>5</sub> ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media ± ES (n=5).....	37
Tabla 9. Análisis de crecimiento: área foliar específica (AFE), área foliar total (AFT), tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN), cociente de peso foliar (CPF), cociente de área foliar (CAF) y relación raíz-vástago (R/V) realizados en los diferentes tratamientos en el PE (t <sub>4</sub> ) (n =3) y en el SE a los diferentes tiempos (t <sub>0</sub> , t <sub>3</sub> y t <sub>5</sub> ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media ± ES (n=6).....	38

## INTRODUCCIÓN

Las plantas están sometidas a una enorme variabilidad natural de los factores ambientales que afectan la fotosíntesis (A), tales como la luz, la temperatura, la humedad del aire y la disponibilidad hídrica y de nutrientes minerales del suelo (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las interacciones entre estos factores determinan la respuesta fotosintética de acuerdo a la capacidad que tengan las plantas de compensar los efectos ambientales bajo una situación de estrés (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En diferentes ambientes, algunas plantas están sometidas a situaciones de estrés abiótico tales como el déficit hídrico (DH), la salinidad, las temperaturas extremas, la excesiva o insuficiente densidad de flujo fotónico (DFF), la anaerobiosis producto de inundación y otras de tipo mecánico como la excesiva compactación del suelo (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

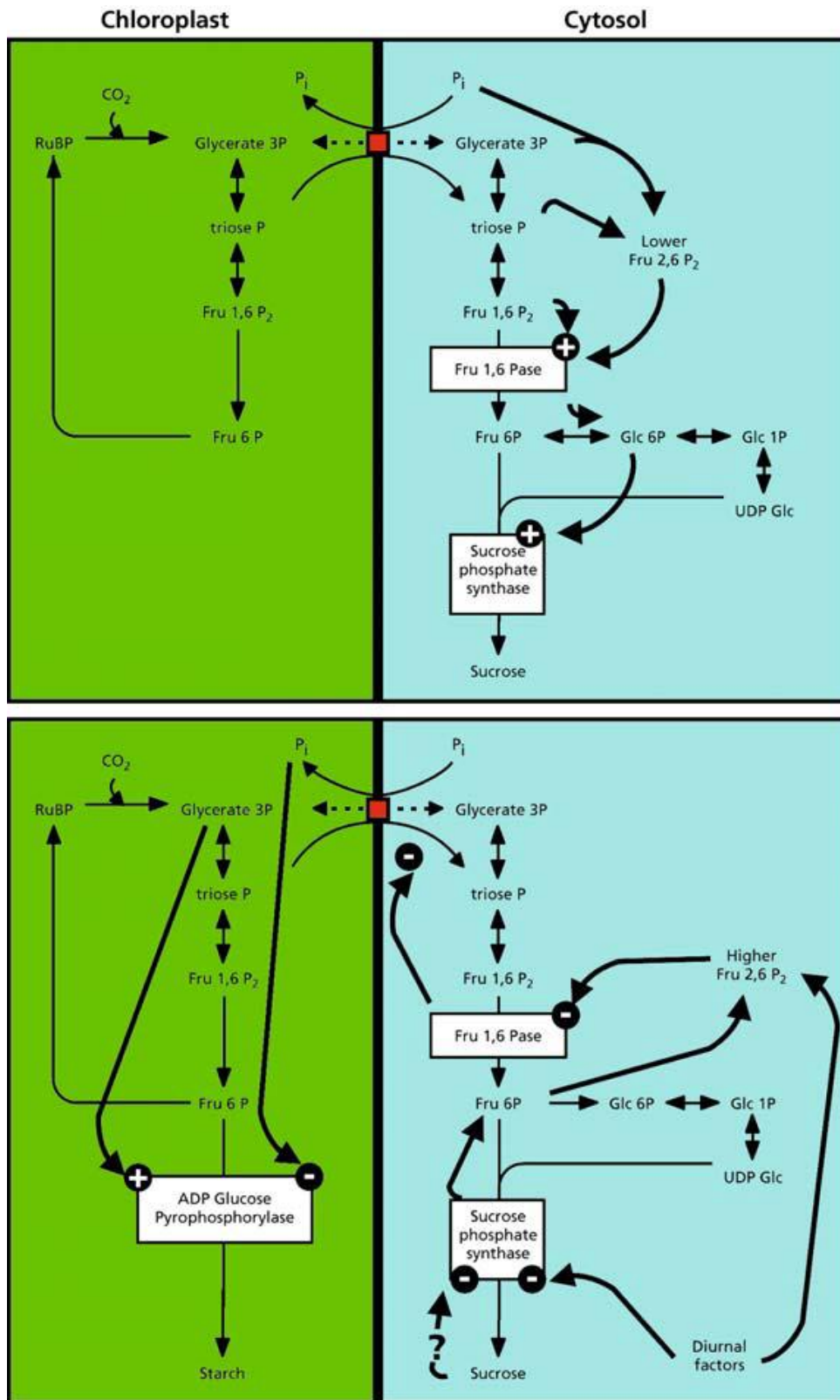
Generalmente, los experimentos de fisiología vegetal son realizados en invernadero o en cámaras de crecimiento donde las variables ambientales son controladas. Sin embargo, al cultivar las plantas en potes con un volumen de suelo determinado durante toda la experimentación, se presentan limitaciones en el crecimiento radical (DaMatta, 2003), que resultan en una reducción del crecimiento y la productividad. La limitación del volumen radical como un estrés que afecta al desarrollo de las actividades fisiológicas y bioquímicas de las plantas ha sido ampliamente investigado (Peterson y col., 1984; Robbins y Pharr, 1988; Townend y Dickinson, 1995; Whitfield y col., 1996).

Las plantas requieren de un sistema radical que les permita un suministro adecuado de agua y nutrientes, así como también el crecimiento de brotes necesarios para su anclaje al suelo (Fitter, 2002). Entre los factores del suelo que tienen un mayor

efecto sobre el crecimiento de las raíces se encuentran la resistencia a la penetración, el tamaño de los poros y la disponibilidad hídrica y de nutrientes (Hoad y col., 2001).

La disminución del volumen de suelo disponible para el crecimiento y desarrollo de las raíces genera una competencia por los recursos minerales, baja disponibilidad de oxígeno y capacidad de absorción de agua (Peterson y col., 1991) reduciendo el crecimiento de brotes, hojas y tallos (Robbins y Pharr, 1988). La base de la coordinación en el alargamiento radical en respuesta a algún estrés que limite su crecimiento no se conoce, aunque probablemente reflejan cambios en la asignación de carbono hacia las raíces y por tanto en la relación fuente-sumidero (Thaler y Pages, 1998).

Los principales órganos donde ocurre A son las hojas maduras (fuente), mientras que las raíces, semillas y frutos no contribuyen significativamente a la ganancia de carbono, y son dependientes del CO<sub>2</sub> fijado en la carboxilación, representando los sumideros de carbono de la planta (Taiz y Zeiger, 2010). La regulación de la distribución de asimilados depende de las concentraciones de triosas fosfatos provenientes del ciclo de Calvin y las concentraciones relativas de fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>) entre el cloroplasto y el citosol. Un translocador de fósforo, regula la exportación de gliceraldehido-3P del cloroplasto al citosol en intercambio con P<sub>i</sub> proveniente de los procesos de biosíntesis del citosol. Las triosas fosfato, son los sustratos en la síntesis de sacarosa por la sacarosa-6-fosfato sintetasa en el citosol y de almidón por la ADP-glucosa pirofosforilasa en los cloroplastos con la liberación de P<sub>i</sub> (Figura 1). Este intercambiador equilibra la relación de triosas fosfatos y el P<sub>i</sub> tanto en el estroma como en el citosol, reflejando el estatus metabólico de estos dos compartimientos fuertemente regulados por la concentración de P<sub>i</sub> y otros metabolitos intermediarios (Lambers y col., 2008).



**Figura 1.** Regulación de síntesis de sacarosa en el citosol y de almidón en el cloroplasto. Tomado de Lambers y col. (2008).

Bajo condiciones de iluminación puede ocurrir una distribución de asimilados, que favorece la formación de sacarosa y de almidón (Taiz y Zeiger, 2010). La sacarosa



es continuamente exportada desde el citoplasma de las células fotosintéticas como un fotoasimilado hacia los sumideros, mientras que polisacáridos como el almidón, un producto primario de la fijación de carbono es almacenado en los cloroplastos para luego ser degradado durante la noche y distribuido en forma de sacarosa (Sonnewald y col., 1991). En general, bajas concentraciones de azúcares en el citosol aumentan la A, la movilización de reservas y la exportación de asimilados, mientras que contenidos abundantes de azúcares promueven el crecimiento y el almacenamiento de carbohidratos en el cloroplasto. Sin embargo, la A también puede reducirse cuando la demanda de carbohidrato por las plantas disminuye (reducción de fuerza del sumidero) (Taiz y Zeiger, 2010).

Las alteraciones en la relación fuente-sumidero a causa de una restricción en el volumen del suelo en el tiempo generan cambios en la distribución de asimilados, que pueden causar un aumento o una disminución de A y alteraciones en el crecimiento de las plantas, motivo por el cual esta relación ha sido ampliamente investigada (Robbins y Phar, 1988; Thomas y Strain, 1991; Whiley y col., 1999).

La A es un proceso altamente integrado y regulado metabólicamente para maximizar la absorción lumínica, minimizar el daño por exceso de luz y optimizar el uso limitado de recursos como CO<sub>2</sub> y nitrógeno (Paul y Foyer, 2001). Algunas hipótesis demuestran que la acumulación de fotoasimilados en las hojas juega un papel importante en la regulación de A. Existe un equilibrio entre la acumulación de los productos finales de A y su uso en los procesos de crecimiento de toda la planta, por ello se habla de una interrelación entre ambos procesos, más que de un proceso unidireccional (Boussingault, 1868; tomado de Evans, 1991).

Cambios fisiológicos y morfológicos ocurren como respuesta a una reducción del crecimiento radical con el tamaño del pote, que afectan tanto el rendimiento como la eficiencia general de las plantas, entre éstos se encuentran: el crecimiento de brotes radicales, alteraciones en la acumulación y asignación de la biomasa, la fotosíntesis, el contenido de clorofila foliar, las relaciones hídricas de la planta, la absorción de nutrientes y la floración (NeSmith y Duval, 1998).

La respuesta fisiológica de las plantas sometidas a reducción del volumen de suelo son realizados bajo diferentes tamaños de pote, lo cual genera conflictos a la hora de realizar comparaciones y diferencias de respuesta entre las especies y entre cultivares de una misma especie (NeSmith y Duval, 1998).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie tropical, alógama, de la familia Malvaceae (Motamayor y col., 2002), caracterizada por ser un árbol con un crecimiento de 4 a 7 m pudiendo alcanzar hasta los 20 m (Almeida y Valle, 2008). Actualmente, se cultivan dos grandes grupos denominados “Criollo” y “Forastero” diferenciados morfológicamente en cuanto a características de su fruto y almendra, así como también en la calidad y el sabor. Sin embargo, se considera un tercer grupo originado posiblemente de la isla de Trinidad, resultado de la hibridación de un cruce (*Criollo x Forastero*) entre individuos criollos introducidos del este de Venezuela con forasteros del Amazonas (González, 2007).

El cacao es considerado como uno de los cultivos más importantes, su producción mundial fue de 3,6 millones de toneladas en 2010 (ICCO, 2010), siendo explotado comercialmente para el procesamiento de sus semillas en la elaboración del chocolate, además de sus derivados como bebidas, jaleas, entre otros (Almeida y Valle, 2008). Debido a la importancia económica del cacao se han realizado estudios para

evaluar su respuesta fotosintética, mediante la aplicación de diversas herramientas ecofisiológicas (Almeida y Valle, 2008; Jaimez y col., 2008; Araque y col., 2012).

A través del uso de técnicas de intercambio de gases, es posible el estudio de la regulación de la respuesta fotosintética de las plantas frente a un estrés o una condición de crecimiento (Farquhar y Von Caemmerer, 1982). Los parámetros de intercambio de gases como: tasa de transpiración (E), conductancia estomática ( $g_s$ ) y eficiencia de uso de agua (EUA), representan una herramienta importante para la comprensión de la regulación de los cambios de A y permite predecir la influencia ambiental sobre la productividad vegetal (Sharkey y col., 2007).

Las medidas realizadas a través del intercambio de gases permiten estimar los cambios en la capacidad fotosintética inducidos por algún estrés ambiental (Farquhar y Von Caemmerer, 1982; Wang y col., 1996; Wang y Kellomäki, 1997), mas no definen completamente los efectos causados por el estrés sobre los procesos fotoquímicos de A (Wang y Kellomäki, 1997). Las técnicas de fluorescencia de la clorofila *a* proporcionan información acerca de la eficiencia cuántica relativa del fotosistema PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) y el transporte de electrones (J) en la membrana de los tilacoides (Krause y Weis, 1991; Krall y Edwards, 1992).

Cuando los fotones son absorbidos por las moléculas de clorofila en los fotosistemas da lugar a un estado excitado de las mismas y a la canalización de la energía hacia los centros de reacción que inician la cadena transportadora de electrones, pero cuando la cantidad de fotones excede a lo que el fotosistema puede canalizar, la energía de excitación puede ser disipada en forma de calor o por fluorescencia (Krause y Weis, 1991). Es por ello que la magnitud del rendimiento cuántico va a depender de las tasas fotoquímicas y de disipación de calor (Krause y Weis, 1991).

La capacidad de asimilación de CO<sub>2</sub> depende de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, ya que el producto resultante del proceso de óxido-reducción de las proteínas de la cadena transportadora de electrones son ATP y NADPH, poder reductor necesario para la regeneración de ribulosa 1-5 bisfosfato (RuBP), que permitirá la carboxilación y la reducción de carbono a azúcares y almidón, que posteriormente serán almacenados o exportados. Los parámetros de fluorescencia de la clorofila brindan información acerca de la capacidad potencial que tienen las plantas de fotosintetizar (Lawlor y Cornic, 2002; Taiz y Zeiger, 2010; Azcón-Bieto y Talón, 2008).

## ANTECEDENTES

El estudio de la respuesta fisiológica de las plantas a la restricción del crecimiento radical ha sido ampliamente estudiado (DaMatta, 2003). La mayoría de los árboles tropicales como el café (*Coffea arabica*) cultivado bajo condiciones de sombra, muestra bajas A, lo cual se ha asociado a una inhibición de A debido al tamaño de pote (DaMatta, 2003). Esta inhibición también fue encontrada en plantas de *Coffea canephora* cultivadas bajo condiciones de sombra durante 10 meses en potes de volumen de 6 L, las cuales presentaron valores máximos de A de  $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Lima y col., 2002); mientras que en potes de 120 L, presentaron valores de  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Pinheiro y col., 2004). La respuesta fotosintética varía dependiendo del tamaño de pote utilizado y del tiempo en que las plantas permanecen sembradas, estos son factores importantes, ya que la mayor parte de los experimentos son realizados en condiciones de invernadero, donde las plantas son cultivadas en potes pequeños durante tiempos prolongados (Ronchi y col., 2006).

Por el contrario, las plantas tropicales cultivadas sin limitación de suelo en el campo y en potes grandes mantienen altas capacidades fotosintéticas (Arp y Drake, 1991), indicando que la aclimatación de A puede ser una consecuencia del crecimiento radical restringido debido a un volumen de pote inadecuado (Ziska y col, 1991).

Un volumen de suelo limitado restringe el crecimiento radical, siendo la raíz el principal sumidero metabólico de carbono. Una mayor limitación en el volumen de suelo con potes más pequeños disminuye la demanda del sumidero, conduciendo a la acumulación de carbohidratos en las hojas y por tanto a cambios en la relación fuente-sumidero (Barrett y Gifford, 1995). Esta alteración puede afectar negativamente la A,

sin embargo, el mecanismo de regulación metabólico aún no se conoce totalmente (Paul y Foyer 2001; Paul y Pellny, 2003).

Las investigaciones realizadas en diferentes especies cultivadas en potes pequeños (que presentan una restricción en el crecimiento radical) muestran una inhibición de A y acumulación de carbohidratos, encontrándose bajas A acompañado de disminuciones en la tasa de exportación de asimilados, así como en la acumulación de almidón y azúcares en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*; Herold y McNeil, 1979), pepino (*Cucumis sativus*; Robbins y Pharr, 1988), algodón (*Gossypium hirsutum*; Thomas y Strain, 1991) y otras especies C<sub>3</sub> crecidas en altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Arp y Drake, 1991). Árboles de aguacate (*Persea americana*) y mango (*Mangifera indica*) también muestran disminuciones de A, acompañado de una disminución en g<sub>s</sub> y en el potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) (Whiley y col., 1999; Zaharah y Razi, 2009). Por el contrario, estudios realizados en soya (*Glycine max*, Krizek y col., 1985) y en algodón (Barrett y Gifford, 1995) no mostraron cambios en A; incluso se observaron incrementos en A en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*; Carmi y col., 1983). A pesar de encontrar diferentes respuestas fotosintéticas, se han reportado disminuciones en el contenido de clorofila foliar en todos los casos (Carmi y col., 1983; Robbins y Pharr, 1988; NeSmith y col., 1992).

En árboles de mandarina (*Citrus reticulata*) sembrados en bolsas y sometidos a restricción radical durante tres años, no se encontraron cambios en A, E,  $\Psi$  e incluso en el contenido de carbohidratos foliares (Mataa y Tominaga, 1998); mientras que plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sometidas a tal estrés durante un corto periodo de tiempo mostraron una disminución de la capacidad fotosintética con disminuciones de g<sub>s</sub>,  $\Psi$  y C<sub>i</sub>, resultando en un aumento en la limitación estomática (L<sub>s</sub>); los parámetros fotoquímicos como el transporte de electrones (J) y la eficiencia cuántica relativa del

fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) se vieron también reducidos; estos cambios fueron acompañados por aumentos en la cantidad de carbohidratos en varios tejidos de las plantas (Shi y col., 2008).

Stitt (1991), describió dos mecanismos de inhibición directa de A: 1) por feedback debido a la acumulación de carbohidratos, ya que el  $P_i$  no es reciclado en el cloroplasto con la suficiente rapidez y 2) por daño mecánico debido a acumulaciones de gránulos de almidón en el cloroplasto. Por otra parte, plantea una inhibición indirecta de A, como una respuesta debido a disminución en la concentración de proteína y otros componentes del aparato fotosintético, lo cual contribuye a un reajuste en la relación fuente-sumidero permitiendo que el nitrógeno y otros componentes sean movilizados de las hojas e invertidos en el crecimiento de sumideros.

La relación fuente-sumidero es fuertemente dependiente del contenido de carbono y nitrógeno de las plantas, indicado por el contenido de azúcares y aminoácidos (Koch, 1997). En los tallos de las plantas cultivadas en un bajo volumen de suelo, se han encontrado disminuciones en el contenido de azúcares y almidón con respecto a plantas cultivadas en un volumen de suelo mayor (Nishizawa y Saito, 1998).

Además de estos cambios bioquímicos, también se ha encontrado que las especies muestran una reducción tanto en la longitud, como en la expansión foliar (Van Iersel, 1997; Nishizawa y Saito, 1998; Zaharah y Razi, 2009); un menor número de ramas (Robbins y Pharr, 1988), menor área foliar y cantidad de hojas por planta (Weston, 1988; Latimer, 1991; Dubik y col., 1990; NeSmith y col., 1992; Liu y Latimer, 1995; Van Iersel, 1997; Mataa y Tominaga, 1998), un menor tamaño del tallo, resultando en plantas enanas (Carmi y col., 1983; Peterson y col., 1984; Thomas y

Strain, 1991; Mataa y Tominaga, 1998) y un menor crecimiento en general (Zaharah y Razi, 2009).

Los cambios en los parámetros de crecimiento incluyen una disminución de la biomasa seca en hojas, tallos y raíces (Thomas y Strain, 1991). Barrett y Gifford (1995) encontraron una reducción de la biomasa radical con disminución en el volumen de pote. En plantas de tomate, la biomasa seca de tallos y hojas disminuyó en menor grado que la biomasa seca de raíces (Nishizawa y Saito, 1998); mientras que en potes de mayor tamaño, las plantas mostraron un aumento en la biomasa seca del tallo (Kemble y col., 1994) y en soya (Krizek y col., 1985).

Existen diferencias interespecíficas e intraespecíficas de la respuesta fotosintética y de crecimiento a la restricción radical (Will y Teskey, 1997). Se conoce que  $A$  puede verse afectada debido a una disminución en la fijación de carbono fotosintético, la tasa de transporte de electrones ( $J$ ) en el tilacoide, aumentos en la  $L_s$  y alteraciones en la relación fuente-sumidero debido a cambios en el metabolismo de carbohidratos foliares (Sharkey, 1985b; Lawlor y Cornic, 2002).

Las investigaciones acerca de la respuesta fisiológica de cacao muestran que las medidas de  $A$  de individuos cultivados tanto en campo como en diferentes volúmenes de pote varían entre 0,7 y 6,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Baker y Hardwick, 1973, 1976; Hutcheon, 1977; Miyaji y col., 1985; Joly y Hahn, 1989; Rada y col., 2005; Barrera, 2006; Pereyra y col., 2007; Jaimez y col., 2008; De Almeida, 2012; Araque y col., 2012). En Venezuela, los estudios en esta especie han evaluado aspectos relacionados con el DH (Rada y col., 2005), la actividad fotoquímica del PSII (Barrera, 2006) y la eficiencia de uso de agua (EUA) de diferentes genotipos de cacao en bancos de germoplasma (Pereyra y col., 2007; Jaimez y col., 2008; Tezara y col., 2009). También se han



realizado medidas instantáneas de intercambio gaseoso y actividad fotoquímica en árboles adultos en condiciones naturales en diferentes regiones del país (Tezara y col., 2009)

La respuesta ecofisiológica de plantas de cacao sometidas a restricción radical no ha sido estudiada hasta el momento, por lo que los mecanismos de regulación de la respuesta fisiológica y de crecimiento de las plantas a este estrés no han sido reportados. Estudiar la respuesta fisiológica en plantas de cacao a través del intercambio de gases, fluorescencia de la clorofila *a*, parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa nos permitirá evaluar la respuesta integral de las plantas de cacao y conocer la contribución de los factores estomáticos y no estomáticos de la fotosíntesis bajo condiciones de restricción del desarrollo o crecimiento radical.

Se planteó la siguiente hipótesis: La regulación de la fotosíntesis en plantas de cacao sometidas a restricción del crecimiento radical, causará una menor producción de biomasa y alteraciones en la relación fuente-sumidero que podrían estar asociadas a una co-limitación de *A* por factores estomáticos y no estomáticos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar la regulación de la fotosíntesis, acumulación de biomasa y cambios en los parámetros de crecimiento en plantas de *Theobroma cacao* L., cultivados en diferentes volúmenes de suelo.

### Objetivos específicos

1. Determinar el potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) matutino y al mediodía.
2. Determinar medidas instantáneas de intercambio gaseoso ( $A$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $EUA$ ) a DFF saturante y cursos diurnos ( $A_D$ ,  $E_D$  y  $EUA_D$ ) y nocturnos ( $R_{dN}$ ).
3. Realizar curvas  $A$  vs  $C_i$  y estimar las diferentes limitaciones de la  $A$  ( $L_s$  y  $L_{ns}$ ).
4. Realizar curvas de  $A$  vs DFF y determinar la actividad fotoquímica del PSII ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$  y  $q_N$ ).
5. Determinar el contenido de proteínas solubles totales (PST) y clorofila ( $Cl_a$  y  $Cl_b$ ).
6. Evaluar parámetros de crecimiento (altura, número de hojas, diámetro de tallo, área foliar específica (AFE), área foliar total (AFT), tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN), relación raíz vástago (R/V) y determinar la distribución de biomasa seca a cada componente de la planta (raíz, tallo y hoja).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio y material vegetal

El estudio se realizó en el Arboretum del Instituto de Biología Experimental (IBE), Caracas-Venezuela (10°28'43'' N 66°53'80'' O). Se realizaron 2 experimentos: primer experimento (PE; Marzo-Julio 2011) y segundo experimento (SE; Marzo-Agosto 2012).

El estudio se realizó con individuos de *T. cacao* L. provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) – Miranda, Campo Experimental Padrón, Municipio Acevedo, estado Miranda. Las plantas utilizadas son resultado de cruces entre los cultivares IMC67 x Ocumare (PE) y IMC67 x Santa Cruz10 (SE). Ambos experimentos se realizaron con plantas de aproximadamente 1 año de edad, las cuales presentaron una altura promedio de 0,6 m. Estos híbridos se caracterizaron por ser resistentes a enfermedades y se encontraban cultivadas en un volumen de suelo de aproximadamente 1L en condiciones de sombra (50% con respecto a la DFF) previo a cada experimento. En el PE y en el SE se utilizaron 15 y 25 plantas por cada tratamiento respectivamente, las cuales fueron sometidas a diferentes volúmenes de suelo: Pequeño (2,2 L; P); Mediano (7,5 L; M) y Grande (11,2 L; G); además, en el SE se colocaron 5 plantas en el suelo sin restricción radical, las cuales fueron utilizadas como plantas control (C). Se les aplicó fertilización foliar y en el suelo con NITROFOSKA (10:4:7) fertilizante N:P:K cada 21 días para controlar el efecto de la restricción radical sobre la nutrición de las plantas. Durante los experimentos las plantas estuvieron sometidas a la sombra de un Jabillo (*Hura crepitans*), fueron regadas en horas de la mañana cada tres días y re-distribuidas aleatoriamente cada mes.



**Figura 2.** a) *Hura crepitans*; b y c) Plantas de Cacao (IMC67 x Santa Cruz10) al inicio del segundo experimento, colocadas en diferentes volúmenes de suelo bajo el dosel.

### Parámetros Microclimáticos

Se realizaron cursos diarios mensuales del PE (al  $t_4$ ) y durante el desarrollo del SE ( $t_{0-5}$ ) a intervalos de medición de una hora de los siguientes parámetros:

- Densidad de Flujo Fotónico (DFF), mediante un sensor de flujo cuántico LI-COR, Modelo 250-S (Lincoln, NE).
- Temperatura del Aire ( $T_a$ ) y Temperatura Foliar ( $T_f$ ), con un teletermómetro modelo 8402-10 (Cole-Parmer Instrument Company, China) conectado a termistores.
- Humedad Relativa (%HR), con un higrómetro Abbeom, Modelo AB167B (Abbeon, CA).
- Gradiente de presión de vapor hoja-aire ( $\Delta_{\text{whoja-aire}}$ ): con los datos de temperatura y % HR se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta_{\text{whoja-aire}} = \rho_x - \rho_a \times \left(\frac{HR}{100}\right) \text{ (Rundel y Jarrel, 1989)}$$

donde  $\rho_x$  es la presión de saturación de vapor de agua a la  $T_f$  para la hoja y  $\rho_a$  es la presión de saturación de agua a la  $T_a$ .

### **Estado hídrico**

El  $\Psi$  de las plantas ( $n=6$ ) fue determinado a las 7:00 am y 12:00 am con el uso de una cámara de presión (PMS Instruments Corvallis, Oregon USA) según Scholander y col. (1965), a los 5 ( $t_5$ ) meses en el SE.

### **Intercambio de gases**

Las mediciones de intercambio de gases se realizaron en hojas completamente expandidas y desarrolladas durante cada tratamiento. Se realizaron después de un periodo de aclimatación de 4 meses ( $t_4$ ) en el PE ( $n=3$ ) y al inicio ( $t_0$ ), a los 3 ( $t_3$ ), 4 ( $t_4$ ) y 5 ( $t_5$ ) meses ( $n=6$ ) en el SE.

Las medidas instantáneas de fotosíntesis (A), conductancia estomática ( $g_s$ ), transpiración (E) y concentración intracelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) se realizaron en hojas nuevas completamente expandidas ( $n=6$ ), utilizando un sistema abierto de intercambio de gases (CIRAS 2 PP Systems, Hitchin, UK). Las medidas fueron realizadas a  $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $CO_2$ , 21% de  $O_2$ , a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFF y a una T de  $25^\circ\text{C}$ . Con los valores obtenidos de las medidas de intercambio gaseoso se calculó la eficiencia de uso de agua instantánea ( $EUA = A/E$ ). Se determinaron A, E y EUA integradas, mediante el cálculo del área bajo de la curva de los cursos diarios ( $n=6$ ) y de respiración nocturna ( $R_{dN}$ ) ( $n=3$ ) realizados a intervalos de 2 h durante 8 horas y 30min durante 12 horas respectivamente (SE), bajo la DFF ambiental ( $DFF_{amb}$ ) y T ambiental ( $T_{amb}$ ).

### **Curvas respuesta A vs C<sub>i</sub> (A/C<sub>i</sub>)**

Se realizaron curvas A/C<sub>i</sub> en hojas intactas de plantas, incrementando progresivamente la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> (C<sub>a</sub>) de 0 a 1500 μmol mol<sup>-1</sup> y en cada etapa de incremento de C<sub>a</sub> se esperó que la A se estabilizara antes de registrarla. Las curvas fueron ajustadas utilizando el programa SigmaPlot 11.0 según la ecuación empírica:  $A = (b+d) \times e^{k \cdot C_i}$ , donde b es la A a CO<sub>2</sub> saturante (A<sub>CO<sub>2</sub>sat</sub>); b+d = es un estimado de la fotorespiración (F<sub>R</sub>). La eficiencia de carboxilación (EC) fue calculada como el producto de k \* d, la cual corresponde a la pendiente de la porción lineal de la curva. Se calculó la limitación estomática relativa (L<sub>s</sub>) según Farquhar y Sharkey (1982) como:  $L_s = [(A_0 - A/A_0) \times 100]$ , donde A<sub>0</sub> es la tasa fotosintética cuando C<sub>i</sub>=C<sub>a</sub>, considerando una g<sub>s</sub> infinita y A es la tasa fotosintética a C<sub>a</sub> (380 μmol mol<sup>-1</sup>) y limitación mesofilar relativa (L<sub>m</sub>) según Jacob y Lawlor (1991) como: el porcentaje de limitación relativa impuesto por el estrés (volumen de suelo) sobre A evaluado a 800 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, el cual fue definido como:  $L_m = [(A_c - A_s / A_c) \times 100]$ , donde A<sub>c</sub> es la A<sub>CO<sub>2</sub>sat</sub> del tratamiento correspondiente a la curva mayor y la A<sub>s</sub> es la A<sub>CO<sub>2</sub>sat</sub> para los otros tratamientos bajo estrés ligero y estrés severo.

### **Curvas respuesta A vs DFF (A/DFF)**

Se realizaron curvas de A/DFF a los 3 (t<sub>3</sub>) y 5 (t<sub>5</sub>) meses después del inicio del SE. Se incrementó progresivamente la DFF de 0 a 1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y se esperó a que la A se estabilizara antes de registrar cada valor. Las medidas se realizaron a 380 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, 21% de O<sub>2</sub> y T a 25°C en hojas completamente expandidas. Las curvas A/DFF fueron ajustadas utilizando el programa SigmaPlot 11.0 según la ecuación empírica:  $A = b + d * e^{k \cdot DFF}$ , donde b es la A a luz saturante (A<sub>DFFsat</sub>); b + d es la tasa de respiración

mitocondrial. La eficiencia cuántica aparente ( $\Phi_{CO_2}$ ) se calculó como el producto de  $k^*$  DFF, la cual corresponde a la pendiente de la porción lineal de la curva.

### **Actividad fotoquímica del PSII.**

Las medidas de fluorescencia de la clorofila *a* se realizaron en hojas intactas ( $n=6$ ) en cada tratamiento al inicio ( $t_0$ ), al primer ( $t_1$ ) y tercer ( $t_3$ ) mes de aclimatación del SE, utilizando un fluorímetro portátil (PAM 2100, WALZ Alemania), según el protocolo descrito por Genty y col. (1989). Se determinó la fluorescencia mínima ( $F_o$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) de hojas adaptadas a oscuridad (previo al amanecer) y la fluorescencia mínima ( $F'_o$ ), la fluorescencia máxima ( $F'_m$ ) y la fluorescencia estable ( $F$ ) de hojas adaptadas a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de DFF. Con estas medidas se calcularon los siguientes parámetros:

La eficiencia cuántica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) en hojas adaptadas a la oscuridad:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

La eficiencia cuántica relativa del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ):

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$$

El coeficiente de extinción fotoquímica ( $q_p$ ):

$$q_p = (F'_m - F)/(F'_m - F_o)$$

El coeficiente de extinción no fotoquímica ( $q_N$ ):

$$q_N = 1 - (F'_m - F'_o)/(F_m - F_o)$$

El transporte de electrones ( $J$ ) se estimó según Krall y Edwards (1992) de la siguiente manera:

$$J = \Phi_{PSII} \times DFF \times a \times f$$

Donde:  $a$  = la fracción de DFF absorbida por la hoja (considerada como 0,84).

$f$  = la proporción de  $e^-$  que es absorbida por el PSII (0,5 ya que ambos fotosistemas están involucrados de igual manera en el transporte lineal de  $e^-$ ).

### **Determinaciones bioquímicas**

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en muestras de hojas completamente expandidas ( $n=5$ ) en las cuales se realizaron las mediciones de intercambio gaseoso al  $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$  del SE. Para la extracción de clorofila se siguió el protocolo de Bruinsma (1963). La extracción de PST se determinó según el protocolo de Bradford (1976).

### **Parámetros de crecimiento**

Se realizaron medidas alométricas no destructivas de parámetros de crecimiento en las plantas al cuarto ( $t_4$ ) mes del PE ( $n=3$ ) y al  $t_{0.5}$  del SE ( $n=6$ ). Los parámetros medidos fueron: la altura de la planta, el número de hojas, diámetro del tallo y el área foliar, la cual fue calculada como ancho x largo de la hoja.

### **Biomasa**

Se determinó la biomasa seca acumulada en las plantas ( $n=5$ ): tallo, raíz y hoja, utilizando el método de cosecha, determinando el peso seco de los individuos al  $t_4$  en el PE y al  $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$  en el SE. Cada individuo previamente marcado fue colocado en sobres de papel y secado por 3 días en la estufa a temperatura constante ( $70^\circ\text{C}$ ).



## Análisis de crecimiento

El análisis de crecimiento se realizó según Chiariello y col. (1989) en el PE al  $t_4$  (n=3) y al  $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$  en el SE (n=6). Entre los parámetros medidos se encuentran:

Tasa relativa de crecimiento de biomasa seca total (TRC):

$$TRC = \frac{(\ln P_{sf} - \ln P_{si})}{\Delta T} (d^{-1})$$

Tasa de asimilación neta (TAN):

$$TAN = \frac{2(P_f - P_i)}{(A_{ff} + A_{fi}) \times (\Delta t)} (g \text{ cm}^{-2} d^{-1})$$

Suponiendo una relación lineal entre la biomasa seca y el área foliar total.

Cociente de peso foliar (CPF):

$$CPF = \frac{P_{total}}{P_{vástago}} (g \text{ g}^{-1})$$

Cociente de área foliar (CAF):

$$CAF = \frac{A_{total}^f}{P_{vástago}} (cm^2 \text{ g}^{-1})$$

Área foliar específica (AFE):

$$AFE = \frac{A_{discos}^f}{P_f} (cm^2 \text{ g}^{-1})$$

El  $A_{discos}^f = (\pi * r^2) n$ ; donde r es el radio de discos de área conocida y n el número de discos utilizados.

Área foliar total (AFT):

$$AFT = \frac{P_h \times Afdiscos}{P_d} (cm^2)$$

donde  $P_d$  corresponde al peso de los discos (g) y  $P_h$  al peso de las hojas (g).

Relación raíz:vástago (R/V):

$$\frac{R}{V} = \frac{P_{raíz}}{P_{vástago}} (g g^{-1})$$

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el paquete estadístico Statistica 8.0 para realizar análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías en los parámetros de crecimiento, utilizando como factores los tratamientos y el tiempo y de una vía en parámetros fisiológicos, fotoquímicos, bioquímicos, crecimiento y de biomasa entre tratamientos, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## 1. Microclima

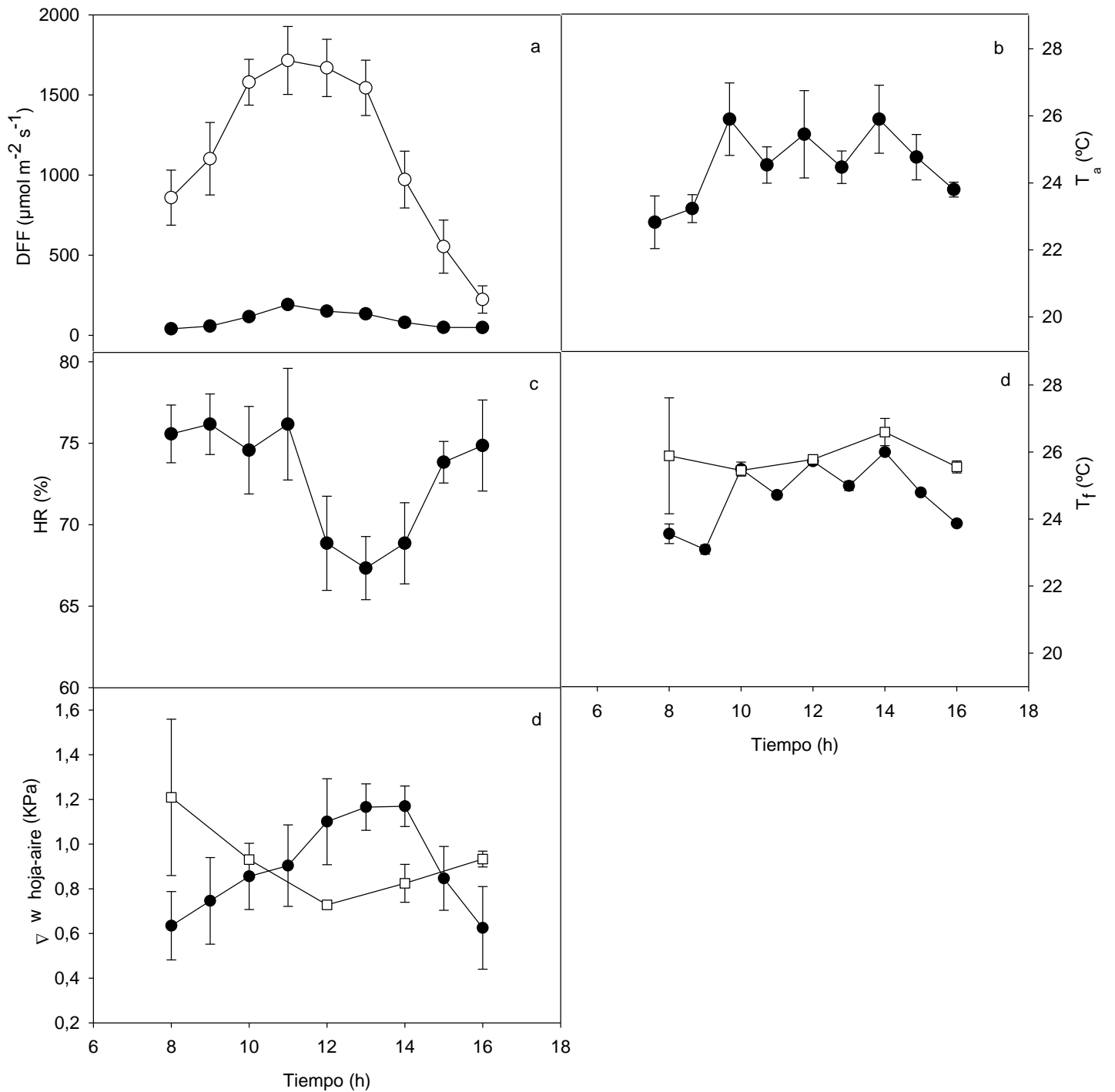
La figura 3 muestra los valores promedios de los cursos diarios de DFF,  $T_a$ ,  $T_f$ , HR y  $\Delta_w$  hoja-aire, registrados en el PE y SE en los diferentes tratamientos. El valor máximo de DFF registrado al mediodía fuera del dosel fue de  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y el mínimo en horas de la tarde fue de  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; mientras que en el sitio de tratamiento se obtuvo que sólo el 10% de la DFF llegaba al sotobosque (Fig. 3a). La  $T_a$  y  $T_f$  entre los tratamientos mostraron un comportamiento similar a lo largo de los días alcanzando valores máximos de  $27^\circ\text{C}$  a las 13h (Fig. 3b-d). La HR disminuyó a horas del mediodía hasta un 65% (Fig. 3c). El  $\Delta_w$  hoja-aire fue mayor en C a las 8 h mientras que en los otros tratamientos se encontró entre las 12 y 14h (Fig. 3e).

## 2. Estado hídrico

El  $\Psi$  matutino fue significativamente menor en C en comparación con los otros tratamientos ( $\Psi = -0,43 \text{ MPa}$ ). Los valores de  $\Psi$  al mediodía fueron menores en todos los tratamientos siendo entre  $-0.5$  y  $-0.7 \text{ MPa}$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Potencial hídrico ( $\Psi$ ) matutino (7 am) y al mediodía (12 am) de hojas (n=6) al  $t_5$  del SE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=3).

Tiempo	T	$\Psi$ (MPa)	
		7am	12am
$t_5$	C	$-0,43 \pm 0,04^b$	$-0,57 \pm 0,03^a$
	G	$-0,28 \pm 0,02^a$	$-0,58 \pm 0,08^a$
	M	$-0,28 \pm 0,02^a$	$-0,62 \pm 0,07^a$
	P	$-0,35 \pm 0,03^{ab}$	$-0,70 \pm 0,13^a$

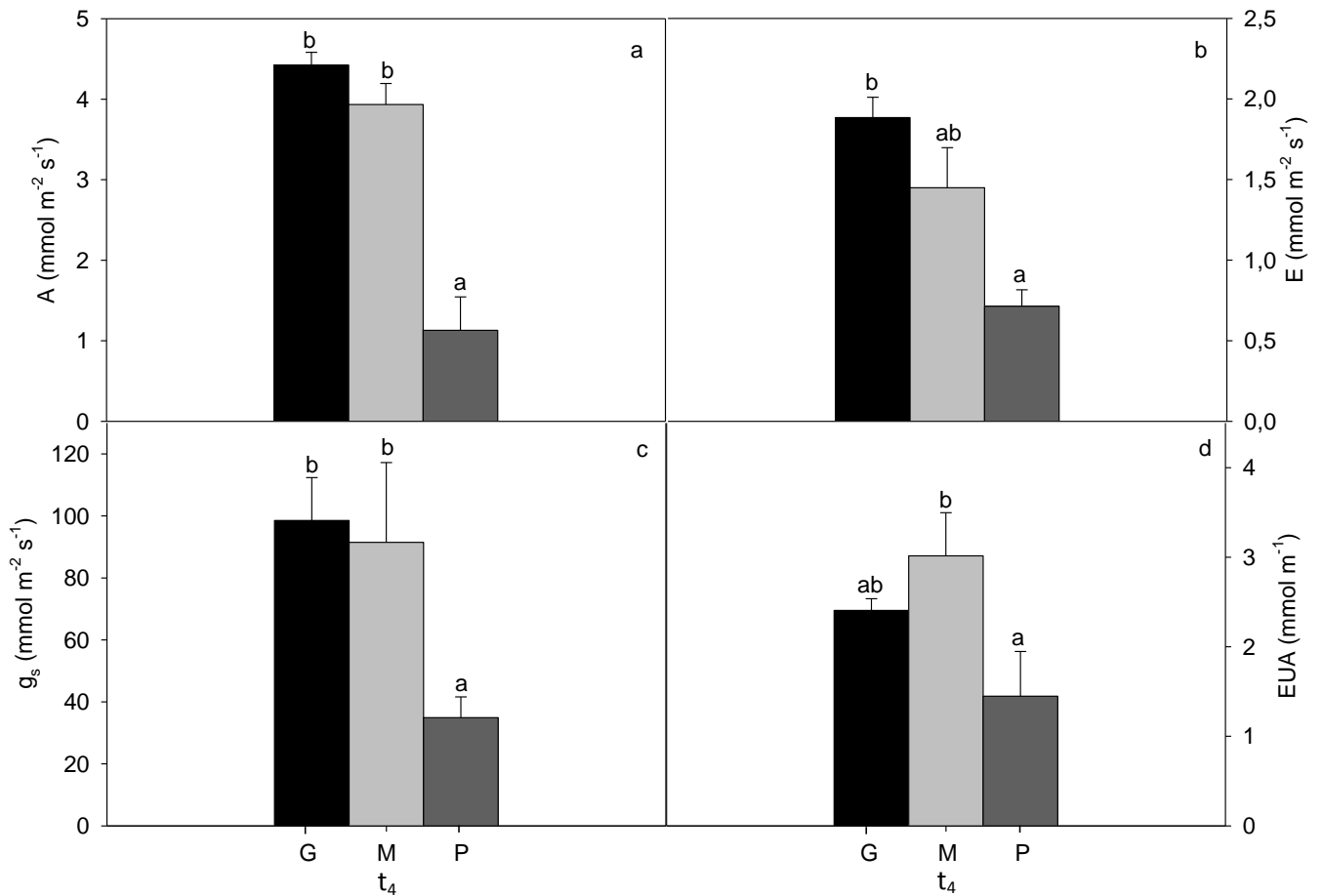


**Figura 3.** Promedio de cursos diarios del PE y SE de: a) densidad de flujo fotónico (DFF) fuera del dosel (○) y bajo el dosel (●); b) Temperatura del aire ( $T_a$ ); c) Humedad relativa (HR); d) Temperatura foliar ( $T_f$ ) y e) Gradiente de presión de vapor hoja-aire ( $\Delta w_{\text{hoja-aire}}$ ) en los diferentes tratamientos: C (□), G (■), M (▲) y P (●). Los valores son la media  $\pm$  ES (n=5).

### 3. Intercambio de gases

#### 3.1 Fotosíntesis instantánea en PE

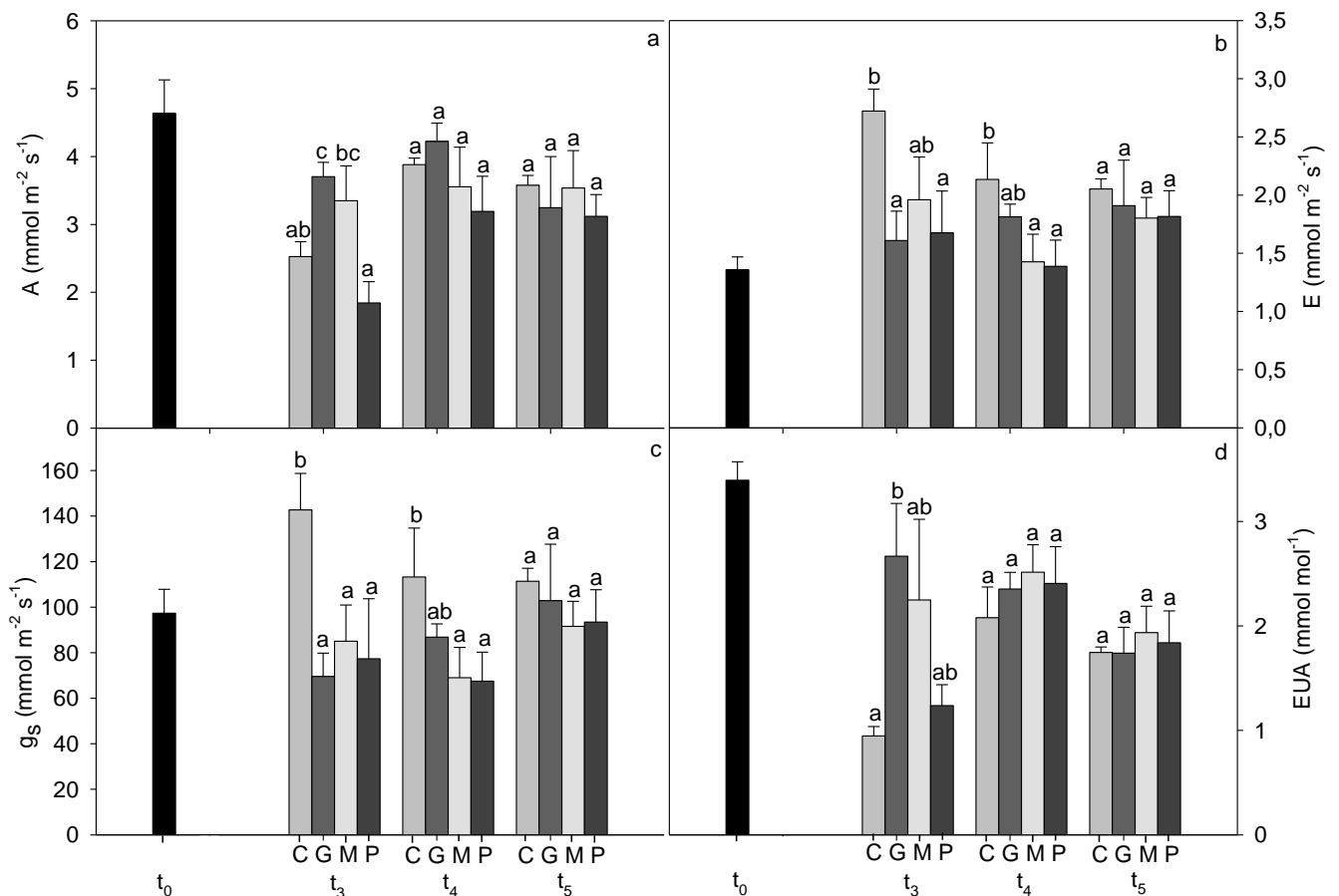
En el PE, al  $t_4$  se observó una reducción del 75% de A, del 58% de E y del 46% de  $g_s$  en P con respecto a G (Fig. 4a-c) al  $t_4$ . La EUA fue mayor en M (Fig. 4d).



**Figura 4.** Parámetros de intercambio gaseoso del PE a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $T= 25^\circ\text{C}$ . a) Fotosíntesis (A); b) Transpiración (E); c) conductancia estomática ( $g_s$ ) y d) eficiencia de uso de agua (EUA). Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

### 3.2 Fotosíntesis instantánea en SE

En el SE, al  $t_3$  se observó la misma tendencia que al  $t_4$  en el PE, con una reducción de A del 50% en P con respecto a G (Fig. 5a), la E y  $g_s$  tuvieron valores máximos en C de 2,72  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 150  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectivamente (Fig. 5b-c), mientras que al  $t_4$  se mantienen mayores  $g_s$  en C y en G. En contraste, no se observaron diferencias significativas de estos parámetros entre los tratamientos al  $t_5$ . La EUA fue significativamente mayor en G al  $t_3$  (Fig. 5d).

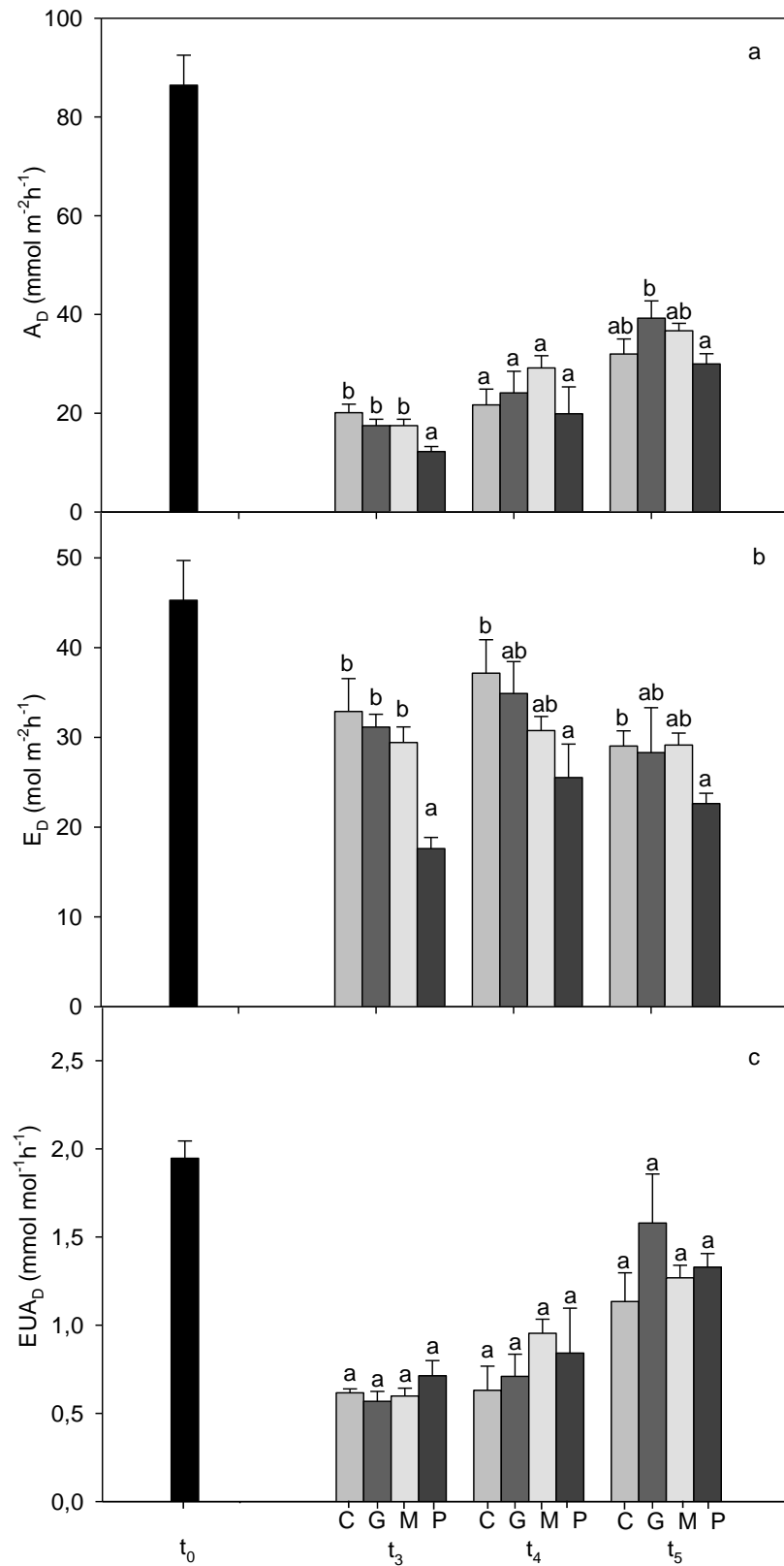


**Figura 5.** Parámetros de intercambio gaseoso mensuales del SE a  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $T=25^\circ\text{C}$ . a) Fotosíntesis (A); b) Transpiración (E); c) conductancia estomática ( $g_s$ ) y d) eficiencia de uso de agua (EUA). Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=6$ ).

### 3.3 Intercambio gaseoso integrado

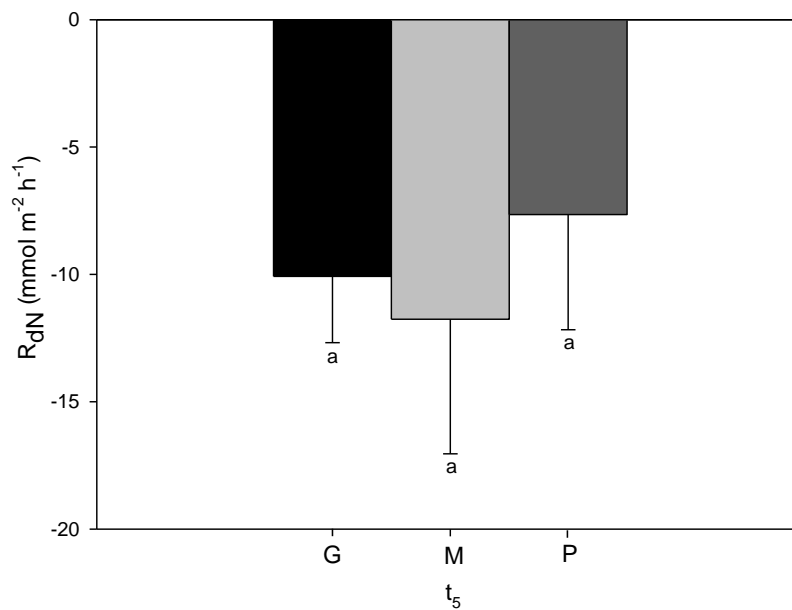
La figura 6 muestra los valores promedios de las medidas de intercambios gaseoso diurnas realizadas bajo condiciones de  $DFF_{amb}$  y  $T_{amb}$ . Los valores iniciales de  $A_D$ ,  $E_D$  y  $EUA_D$  fueron  $86,4 \text{ mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ;  $45,3 \text{ mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  y  $1,8 \text{ mmol mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente bajo  $DFF_{amb}$  promedio entre 300 y  $500 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  debido a un dosel menos denso. En los siguientes meses la  $DFF_{amb}$  promedio fue entre 30 y  $150 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , en el cual se observaron menores valores de  $A_D$  para P con respecto a los demás tratamientos ( $t_3$ ) y a G ( $t_5$ ) (Fig. 6a). En cuanto a la  $E_D$ , se observa una reducción entre el 43 y el 22% en P con respecto a C en todos los meses. Cabe destacar el mantenimiento de mayores  $E_D$  para C en todos los meses y una reducción de G y M a partir del  $t_4$  (Fig. 6b). Mientras que la  $EUA_D$  integrada fue igual entre los tratamientos en todos los meses (Fig. 6c).

No se encontraron diferencias en la tasa de respiración nocturna integrada ( $R_{dN}$ ) (Fig. 7) al  $t_5$  entre tratamientos. Los valores representan el 27%, 34% y 25% de  $A_D$  en G, M y P respectivamente, mientras que en C no fue determinado debido a que los individuos fueron cultivados en el suelo y las medidas fueron determinadas en el laboratorio.



**Figura 6.** Parámetros de intercambio gaseoso integradas diurnas a  $DF_{amb}$  ( $300-500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en el  $t_0$  y  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en el  $t_{3-5}$ ) y  $T_{amb}$  promedio ( $24,5^\circ\text{C}$ ) en el SE. a) Fotosíntesis integrada diurna ( $A_D$ ); b) Transpiración integrada diurna ( $E_D$ ); c) Eficiencia de uso de agua diurna integrada ( $EUA_D$ ). Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=6$ ).





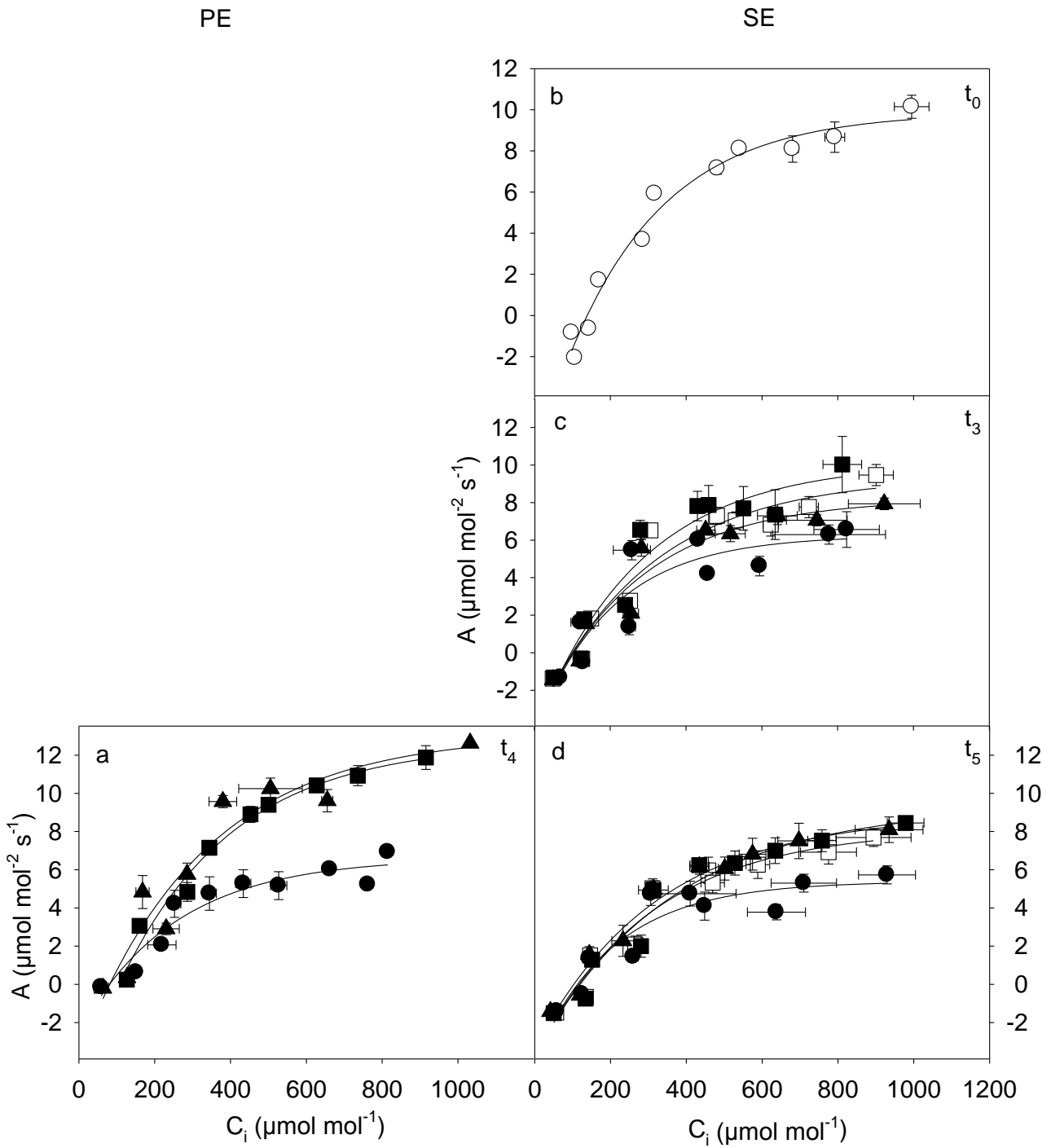
**Figura 7.** Respiración nocturna integrada ( $R_{dN}$ ) a  $DF_{amb}$  y  $T_{amb}$  medidas en el  $t_5$  del SE. Los diferentes colores de las barras indican los diferentes tratamientos en los que se realizaron las medidas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

### 3.4 Curvas respuesta A vs $C_i$ ( $A/C_i$ )

En el PE, el tratamiento P presentó una reducción de  $A_{CO_2sat}$  del 40% y de  $F_R$  del 50% con respecto a G y M (Fig. 8; Tabla 2).

Al inicio del SE ( $t_0$ ) la A se saturó a  $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $CO_2$ , mostrando valores máximos de  $A_{CO_2sat}$  de  $8,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 8). Luego de tres meses ( $t_3$ ) de haber iniciado el experimento se observó la misma tendencia que en el PE, con una disminución significativa de  $A_{CO_2sat}$  en P al  $t_3$  y  $t_5$ . (Fig. 8; Tabla 2).

La EC y  $\Gamma$  no mostraron cambios significativos entre los tratamientos y la  $L_s$  se mantuvo constante; en un 26% aproximadamente, mientras que  $L_m$  mostró mayores valores en P durante el muestreo (Tabla 2).



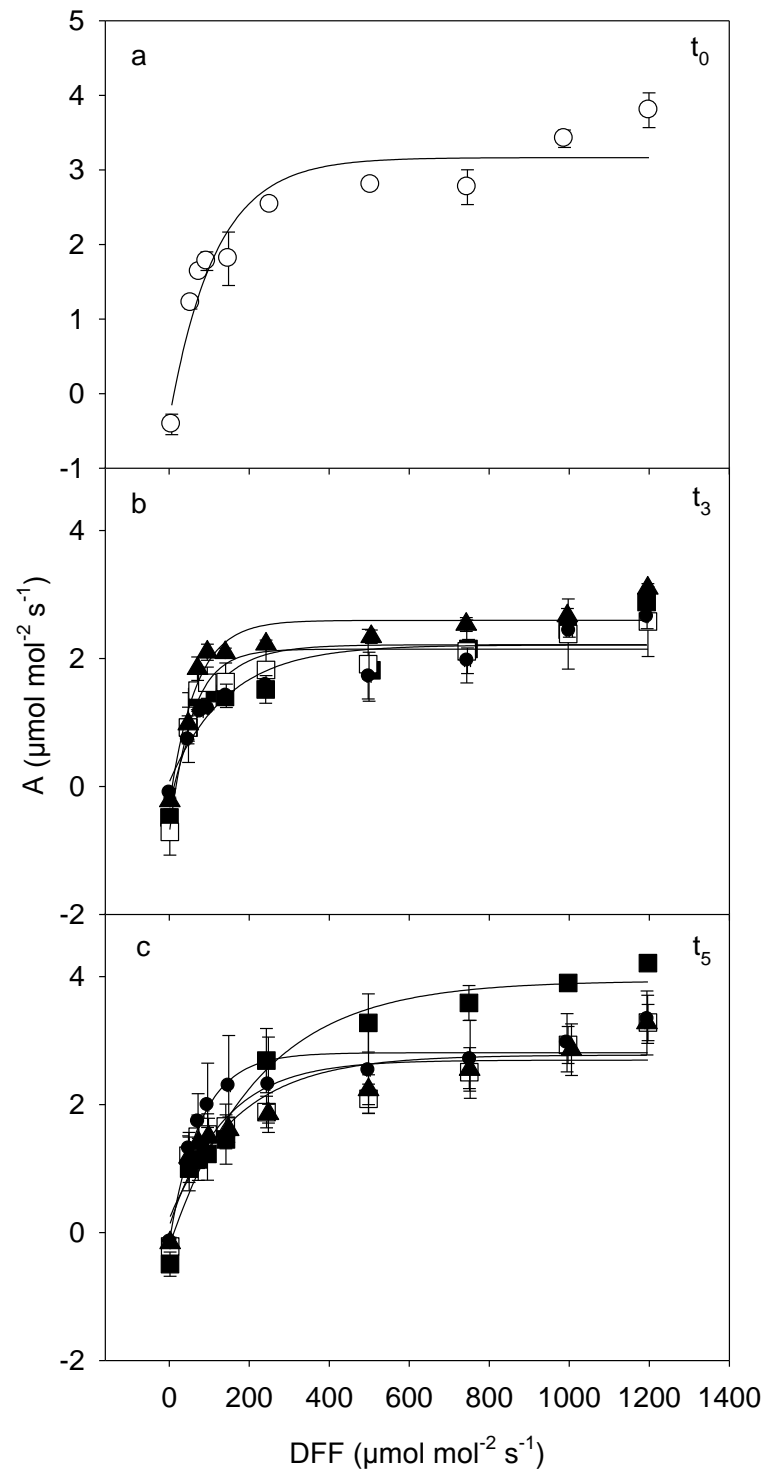
**Figura 8.** Curva de respuesta de fotosíntesis a la concentración intercelular de CO<sub>2</sub> (A/C<sub>i</sub>) de los diferentes tratamientos: C (□), G (■), M (▲) y P (●), a) en el PE (t<sub>4</sub>) (n=3), b) al t<sub>0</sub> (○), c) al t<sub>3</sub> y d) al t<sub>5</sub> en el SE. Los valores son la media ± ES (n=4).

**Tabla 2.** Tasas de fotosíntesis a CO<sub>2</sub> saturante ( $A_{CO_2sat}$ ), tasa de fotorespiración ( $F_R$ ), eficiencia de carboxilación (EC) y punto de compensación de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ), determinados en los diferentes tratamientos en el PE al t<sub>4</sub> (n=3) y en el SE a los diferentes tiempos (t<sub>0</sub>, t<sub>3</sub> y t<sub>5</sub>). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=4).

<b>PE</b>							
Tiempo	T	$A_{CO_2sat}$ ( $\mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$F_R$ ( $\mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	EC ( $\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\Gamma$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$L_s$ (%)	$L_m$ (%)
(t <sub>4</sub> )	G	11,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	-5,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	107 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>	26,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>
	M	10,8 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	-4,5 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	80,1 $\pm$ 17,2 <sup>a</sup>	24,1 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	P	6,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	-2,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	88,3 $\pm$ 24,4 <sup>a</sup>	23,6 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	41,8 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup>
<b>SE</b>							
Tiempo	T	$A_{CO_2sat}$ ( $\mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$F_R$ ( $\mu\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	EC ( $\text{mol mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\Gamma$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	$L_s$ (%)	$L_m$ (%)
t <sub>0</sub>		9 $\pm$ 0,8	-7,3 $\pm$ 0,6	0,07 $\pm$ 0,007	138,9 $\pm$ 0,5	*	*
t <sub>3</sub>	C	8,5 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>	-3,9 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	99,7 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	25,2 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	7,3 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>
	G	9,2 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	-5,2 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	94,7 $\pm$ 14,3 <sup>a</sup>	23,1 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	M	7,8 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	-4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	101,3 $\pm$ 18,1 <sup>a</sup>	25,5 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
	P	6,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	-4,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	102,1 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 4,4 <sup>c</sup>
t <sub>5</sub>	C	7,4 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	-3,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	110,8 $\pm$ 15,9 <sup>a</sup>	28,2 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	5,3 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>
	G	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	-3,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	113,3 $\pm$ 7,7 <sup>a</sup>	28,8 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	M	7,8 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	-3,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	102,6 $\pm$ 17,2 <sup>a</sup>	27,2 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 9,7 <sup>a</sup>
	P	5,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	-4,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	113,5 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	23,7 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	34,1 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>

### 3.5 Curvas respuesta A vs DFF (A/DFP)

En el t<sub>0</sub> la A se saturó a una DFF de 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 9). Al t<sub>3</sub> los tratamientos presentaron un menor punto de saturación de luz a una DFF de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 9) y no se observaron cambios significativos en los parámetros  $A_{DFP_{sat}}$  y  $\phi_{CO_2}$  en los tratamientos, sin embargo, se encontró un aumento en la  $R_d$  y una reducción significativa en el PCL en P (Tabla 3). Al t<sub>5</sub>, la curva A/DFP del tratamiento G presentó una mayor  $DFP_{sat}$  de 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 9). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en los parámetros calculados (Tabla 3).



**Figura 9.** Curva de respuesta de la fotosíntesis a la densidad de flujo fotónico ( $A/\text{DFF}$ ) de los diferentes tratamientos: C ( $\square$ ), G ( $\blacksquare$ ), M ( $\blacktriangle$ ) y P ( $\bullet$ ), a) al  $t_0$  ( $\circ$ ), b) al  $t_3$  y c) al  $t_5$  del SE. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=4$ ).

**Tabla 3.** Tasas de fotosíntesis a DFF saturante ( $A_{DFFsat}$ ), respiración en oscuridad ( $R_d$ ), eficiencia cuántica aparente ( $\phi_{CO_2}$ ) y punto de compensación de Luz (PCL), realizados en los diferentes tratamientos en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=4).

Tiempo	T	$A_{DFFsat}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$R_d$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\Phi_{CO_2}$ ( $\mu\text{mol CO}_2/\mu\text{mol fotones}$ )	PCL ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
$t_0$		3,1 $\pm$ 0,1	-0,32 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	11,2 $\pm$ 0,9
	C	2,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	-0,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	13,2 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>
	G	2,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	-0,4 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	13,9 $\pm$ 7,6 <sup>b</sup>
$t_3$	M	2,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	-0,3 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 1,1 <sup>ab</sup>
	P	2,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	-3,3 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>
	C	2,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	-0,14 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>
	G	4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	-0,22 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 22,5 <sup>a</sup>
$t_5$	M	2,9 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	-0,01 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>
	P	3,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	-0,29 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>

#### 4. Actividad fotoquímica del PSII

En el  $t_1$  a una DFF de 428  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  el tratamiento M mostró los mayores valores de J (Tabla 4), mientras que a DFF<sub>amb</sub> (38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no se observaron diferencias en los parámetros fotoquímicos entre tratamientos.

Por otra parte, al  $t_3$  y a una DFF de 452  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se observó una reducción significativa de J,  $\Phi_{PSII}$  y  $q_p$  del 25% en P con respecto a G y M, mientras que no se observaron cambios en  $q_N$  y  $F_v/F_m$ . En condiciones de DFF<sub>amb</sub> (38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se observó una reducción significativa del 20% de J en M con respecto a G y P. (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valores instantáneos de los parámetros de fluorescencia: tasa de transporte de electrones (J), eficiencia cuántica relativa del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), coeficiente de extinción fotoquímica ( $q_P$ ), coeficiente de extinción no fotoquímica ( $q_N$ ) y eficiencia cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ), determinados en los diferentes tratamientos en el SE a los tiempos  $t_0$ ,  $t_1$  y  $t_3$ . Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=6).

Tiempo	DFP ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	T	J ( $\mu\text{mol m m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\Phi_{PSII}$	$q_P$	$q_N$	$F_v/F_m$
$t_0$	399,3 $\pm$ 1,2		57,9 $\pm$ 2,2	0,3 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,002	0,8
	32,8 $\pm$ 2,4		9,7 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,001	
$t_1$	427,9 $\pm$ 13,4	<b>G</b>	71,8 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	*
		<b>M</b>	86,2 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	
		<b>P</b>	80,6 $\pm$ 2,5 <sup>ab</sup>	0,42 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	
	38,3 $\pm$ 3,4	<b>G</b>	11,7 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	0,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	
		<b>M</b>	13,8 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	
		<b>P</b>	9,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	
$t_3$	452,3 $\pm$ 4,4	<b>G</b>	89,2 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	<b>G</b> 0,84 <sup>a</sup>
		<b>M</b>	87,3 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,93 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	
		<b>P</b>	66,1 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,94 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	<b>M</b> 0,85 <sup>a</sup>
	37,8 $\pm$ 3,3	<b>G</b>	13,4 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	
		<b>M</b>	8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	
		<b>P</b>	10,5 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	0,73 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,73 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,91 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	<b>P</b> 0,84 <sup>a</sup>

## 5. Determinaciones bioquímicas

En el SE se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila por unidad de área (Cla, Clb y Cla+b) entre los tratamientos al  $t_3$  y al  $t_5$ . En  $t_3$  el contenido de Cl fue mayor en P y menor en M (Tabla 5), mientras que en  $t_5$  se observó una reducción significativa del 45, 39 y 44% en el contenido de Cla, Clb y Cla+b respectivamente, en P con respecto a C (Tabla 5). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de PST durante el experimento (Tabla 5).

**Tabla 5.** Contenido de clorofilas a ( $Cl_a$ ), b ( $Cl_b$ ), totales ( $Cl_{a+b}$ ), relación  $Cl_{a/b}$  y proteínas solubles totales (PST) determinados en los diferentes tratamientos en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=5).

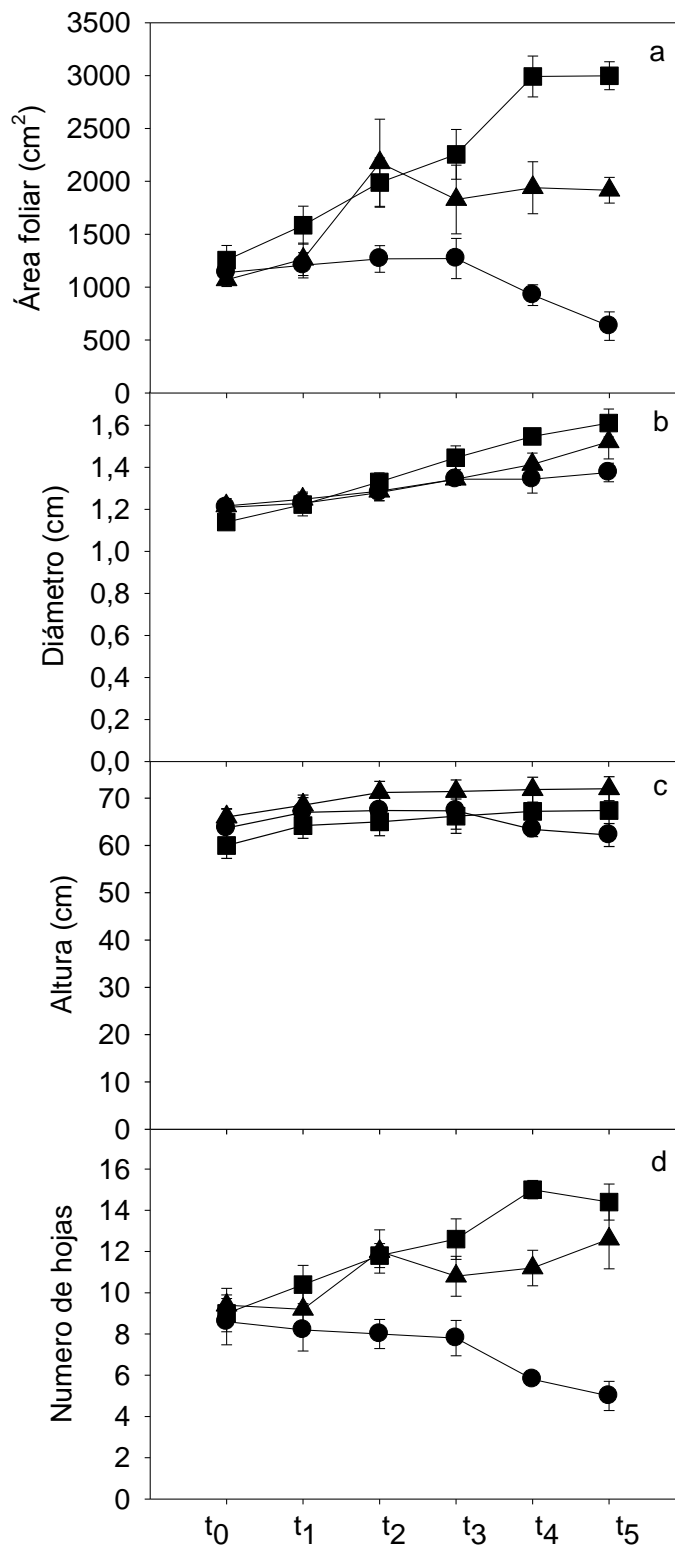
Tiempo	T	$Cl_a$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$Cl_b$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$Cl_{a+b}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$Cl_{a/b}$	PST ( $\text{g}/\text{m}^2$ )
$t_0$		16,6 $\pm$ 3,1	8 $\pm$ 1	25,5 $\pm$ 4,4	2,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1
	G	15,2 $\pm$ 3,7 <sup>ab</sup>	7,8 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	24 $\pm$ 5,3 <sup>ab</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
$t_3$	M	12,9 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	4,3 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	20 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
	P	22,4 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	10,2 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	33,8 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	C	25 $\pm$ 5,6 <sup>b</sup>	11,8 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	38,3 $\pm$ 8,1 <sup>b</sup>	2,08 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
$t_5$	G	17,5 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>	8,7 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	27,2 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	1,99 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
	M	20,6 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>	9,8 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	31,5 $\pm$ 2,7 <sup>ab</sup>	2,12 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
	P	13,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	21,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>

## 6. Parámetros de crecimiento

En el PE, sólo se encontraron diferencias significativas en el diámetro del tallo, siendo menor en P (Tabla 6). En el SE, los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas. El análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías realizado indicó diferencias significativas en el área foliar debidas al tiempo, al tratamiento y se observó interacción (Fig. 11, Tabla 7). Cabe destacar una disminución, a partir del  $t_3$  en P del área foliar y en el número de hojas (Fig. 11a y d) con diferencias debidas al tiempo y al tratamientos así como en la interacción (Tabla 7). En cuanto al Diámetro del tallo y la Altura, se encontró que sólo hay diferencias en el tiempo para ambas medidas y entre tratamientos sólo para la Altura (Tabla 7). En P se observó una disminución en la Altura al  $t_4$  y  $t_5$  (Fig. 11b).

**Tabla 6.** Medidas alométricas no destructivas (Altura, Número de hojas y diámetro del tallo) del PE al  $t_4$ . Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=3).

PE ( $t_4$ )	Altura (cm)	Número de Hojas	Diámetro Tallo (cm)
G	79,4 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	11,8 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>
M	89,2 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	14,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
P	73 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	8,2 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>



**Figura 10.** Medidas alométricas no destructivas (área foliar, diámetro del tallo, altura y número de hojas) realizadas mensualmente a los diferentes tratamientos: G (■), M (▲) y P (●), en el SE. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=6$ ).



**Tabla 7.** Análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías realizado a las medidas alométricas determinadas por tratamiento (G, M y P), tiempo ( $t_{0-5}$ ) y tratamiento x tiempo ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Medidas alométricas</b>		<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Área Foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Tiempo</b>	18468450	2	9234225	47,48	7,07E-14
	<b>Tratamiento</b>	7638296	5	1527659	7,86	6,03E-06
	<b>Tiempo x Tratamiento</b>	11506961	10	1150696	5,92	1,82E-06
	<b>error</b>	14002822	72	194484		
<b>Diámetro del tallo (cm)</b>	<b>Tiempo</b>	0,11	2	0,05	4,93	0,0098
	<b>Tratamiento</b>	1,09	5	0,22	19,39	3,51E-12
	<b>Tiempo x Tratamiento</b>	0,20	10	0,02	1,78	0,0808
	<b>error</b>	0,81	72	0,01		
<b>Altura (cm)</b>	<b>Tiempo</b>	513,8	2	256,9	5,80	0,0046
	<b>Tratamiento</b>	251,4	5	50,3	1,14	0,3496
	<b>Tiempo x Tratamiento</b>	215,6	10	21,6	0,48	0,89
	<b>error</b>	3188,7	72	44,3		
<b>Numero de hojas (cm)</b>	<b>Tiempo</b>	396,46	2	198,23	49,42	3,09E-14
	<b>Tratamiento</b>	43,30	5	8,66	2,16	0,068
	<b>Tiempo x Tratamiento</b>	189,53	10	18,95	4,73	3,46E-05
	<b>error</b>	288,80	72	4,01		

## 7. Biomasa seca

En M del PE se observaron los mayores valores de peso seco de los diferentes órganos de la planta incluyendo la biomasa total con una reducción del 37% en P (Tabla 8).

Se observó una disminución del peso seco de hojas y tallos en P al  $t_3$  y de todos los órganos al  $t_5$ . Al  $t_3$ , se encontró una reducción significativa del 25% del peso seco de la hoja, 30% del tallo y peso seco total en P con respecto a G. En el  $t_5$  se acentuó la reducción en todos los órganos (34% en hoja, 39% en tallo, 49% en raíz y 48% del peso seco total) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Distribución de biomasa: Peso seco de raíz, tallo, hojas y peso seco total realizados en los diferentes tratamientos en el PE al  $t_4$  ( $n=3$ ) y en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=5$ ).

Tiempo	T	Hoja (gr)	Tallo (gr)	Raíz (gr)	Total (gr)
<b>PE</b> <b>(<math>t_4</math>)</b>	<b>G</b>	6,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	14,1 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	28,6 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>
	<b>M</b>	10,1 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	20,5 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	12,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	42,9 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
	<b>P</b>	3,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	12,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	24,6 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
<b>SE</b>					
<b><math>t_0</math></b>		3,1 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,2	11 $\pm$ 0,7
	<b>G</b>	9,1 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	9,5 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
	<b><math>t_3</math></b>	<b>M</b>	9,6 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	8,2 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>	6,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
<b>P</b>		6,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	17,4 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
<b><math>t_5</math></b>	<b>G</b>	10 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	12,94 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	9,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	32,3 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
	<b>M</b>	6,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	14,7 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	9,3 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	30,8 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	<b>P</b>	3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	8,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	16,3 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>

## 8. Análisis de crecimiento

En ambos experimentos no se encontraron diferencias significativas en cuanto al AFE entre tratamientos.

El AFT fue mayor en M que G y P (Tabla 9) y no se observaron diferencias en CPF, CAF y R/V entre tratamientos después de 4 meses (PE).

En el SE, el AFT al  $t_3$  y  $t_5$  fue significativamente menor en P (Tabla 9), además de una reducción de la TRC y TAN en P, observándose inclusive una TRC negativa en P ( $t_5$ ). Por otra parte, al  $t_5$  el CPF y CAF fue menor en M y P, mientras que en la R/V no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 9.** Análisis de crecimiento: área foliar específica (AFE), área foliar total (AFT), tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN), cociente de peso foliar (CPF), Cociente de área foliar (CAF) y relación raíz vástago (R/V) realizados en los diferentes tratamientos en el PE ( $t_4$ ) ( $n=3$ ) y en el SE a los diferentes tiempos ( $t_0$ ,  $t_3$  y  $t_5$ ). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=6$ ).

<b>PE</b>								
Tiempo	T	AFE ( $\text{cm}^2/\text{gr}$ )	AFT ( $\text{m}^2$ )	CPF ( $\text{g g}^{-1}$ )	CAF ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	R/V ( $\text{g g}^{-1}$ )		
	G	271,8 $\pm$ 17,3 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,29 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	76,5 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>		
$t_4$	M	259,8 $\pm$ 15,2 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,33 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	86,5 $\pm$ 11,3 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>		
	P	264,7 $\pm$ 14,8 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 12,6 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>		
<b>SE</b>								
Tiempo	T	AFE ( $\text{cm}^2/\text{gr}$ )	AFT ( $\text{m}^2$ )	CPF ( $\text{g g}^{-1}$ )	CAF ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )	R/V ( $\text{g g}^{-1}$ )	TRC ( $\text{d}^{-1}$ )	TAN ( $\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ )
$t_0$		294,9 $\pm$ 8	0,1 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,03	104,1 $\pm$ 8,3	0,31 $\pm$ 0,03		
	G	270,9 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,48 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	131,8 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	1E-4 $\pm$ 1E-5 <sup>a</sup>
$t_{0-3}$	M	275,7 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,54 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	149,7 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,01 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	9E-5 $\pm$ 1E-5 <sup>a</sup>
	P	263,1 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	131,6 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,007 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	7E-5 $\pm$ 2E-5 <sup>a</sup>
	G	265,1 $\pm$ 20,1 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	114,1 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	4E-5 $\pm$ 1E-5 <sup>b</sup>
$t_{3,5}$	M	239,7 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	77,3 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	5E-5 $\pm$ 2E-5 <sup>b</sup>
	P	266,8 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	-0,001 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	-1E-5 $\pm$ 1E-5 <sup>a</sup>

## DISCUSIÓN

Los experimentos realizados permitieron evaluar el efecto de la restricción radical sobre la fotosíntesis y el crecimiento en dos diferentes híbridos de cacao: IMC67 x Ocumare (PE) y IMC67 x Santa Cruz10, sometidos a diferentes volúmenes de suelo (G, M y P) y sin limitación radical (C), durante 5 meses. Los resultados muestran una reducción en los parámetros fisiológicos ( $A$ ,  $E$ , y  $g_s$ ) y fotoquímicos ( $J$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$ ) a  $DF_{sat}$  y de  $A_D$ ,  $E_D$  a  $DF_{amb}$  a los tres meses de aclimatación en el tratamiento P, lo cual sugiere una pérdida en la capacidad fotosintética y en la asimilación de carbono diurna. Sin embargo, el aumento de  $L_m$ , el mantenimiento de PST y reducción de  $A_{CO_2sat}$  en el tiempo sugiere una limitación de  $A$  por factores metabólicos, por ejemplo: regeneración de RuBP. La reducción en la capacidad fotosintética, parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa en el tratamiento P en el tiempo, indican una interrelación entre la fotosíntesis y el crecimiento.

Las plantas de cacao tradicionalmente son cultivadas en sistemas agroforestales bajo condiciones de sombra, donde la densidad de plantas tanto en el sotobosque como en el dosel es reducida (Lobão y col., 2007; Araque y col., 2012; De Almeida, 2012). Además, son plantas que evolutivamente están adaptadas a ambientes de sotobosque con alta precipitación y baja disponibilidad lumínica (Baligar y col., 2008). Se ha reportado que tanto los dos tipos de cacao (Criollo y Forastero) así como también el híbrido entre estos dos tipos (Trinitario) se saturan a DFF comprendidas entre 400 a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , intensidades que constituyen entre 25 y 30% de la radiación máxima en un día despejado (Balasimha y col., 1991; Barrera, 2006; De Almeida 2012). En el sitio de estudio sólo el 10% de la DFF promedio llega al sotobosque con  $T_a$  y  $T_f$  máximos a horas del mediodía de 27 °C. Sin embargo, para los cultivos de cacao se recomienda una

sombra que sea entre 20 y 60% de la DFF total que llega al sotobosque (Jaimez y col., 2008; De Almeida, 2012). Otros estudios realizados en plántulas de cacao plantean intervalos de temperatura óptima para el crecimiento entre 18,7 y 30,3 °C (Gomes y Kozlowski, 1987).

Se ha demostrado que el uso de pequeños volúmenes de pote puede traer desventajas relacionadas con las limitaciones biológicas, debido a que un menor volumen implica menor cantidad de sustrato y por tanto una menor disponibilidad de agua y nutrientes, acompañado de una limitación en el crecimiento radical (Poorter y col., 2012). Los  $\Psi$  determinados en horas tempranas de la mañana fueron menores en C y en horas del mediodía no varían entre tratamientos. Los  $\Psi$  fueron similares a valores medidos en plantas de cacao presentes en bancos de germoplasma y en árboles en condiciones de lluvia, presentando  $\Psi$  altos (Pereyra, 2007; Tezara y col., 2009). Plantas de *Coffea arabica* (Ronchi y col., 2006) y de *Citrus reticulata* (Matta y Tominaga, 1998) sometidas a restricción radical tampoco mostraron cambios en el  $\Psi$  matutino y al mediodía.

Las A obtenidas en ambos experimentos bajo los diferentes tratamientos de volumen de suelo fueron similares a las reportadas por diversos autores (Baker y Hardwick, 1973, 1976; Hutcheon, 1977; Miyaji y col., 1985; Joly y Hahn, 1989; Rada y col., 2005; Barrera, 2006; Pereyra y col., 2007; Jaimez y col., 2008; Araque y col., 2012; De Almeida, 2012). Sin embargo, en el tratamiento P se observó una reducción significativa de A del 75% con respecto a G en el PE y del 50% al  $t_3$  en el SE. Esto podría deberse a una inhibición de A debido a una restricción del crecimiento radical por el volumen de pote. Poorter y colaboradores (2012) muestran que la fotosíntesis es un proceso que se encuentra fuertemente afectado por el tamaño del pote y que puede

ser revertido cuando las plantas son trasplantadas a volúmenes de pote mayor (Herold y McNeil, 1979).

Previos reportes en plantas de *Cucumis sativus*, *Gossypium hirsutum*, *Lycopersicon esculentum*, *Persea americana* y *Mangifera indica*, demuestran que una limitación en el crecimiento radical pueden llevar a una alteración en la relación fuente-sumidero, generando cambios en la distribución de asimilados (Robbins y Phar, 1988; Thomas y Strain, 1991; Whiley y col., 1999; Shi y col., 2008) y un desbalance entre la formación de carbohidratos y su posterior utilización (Thomas y Strain, 1991). Posiblemente, una disminución en la fuerza del sumidero debido a una limitación en el crecimiento radical, podría causar una inhibición de A por “feedback” (Paul y Pellny, 2003), siendo un mecanismo de “inhibición directa” (Stitt, 1991).

Bajo esta condición, los intermediarios forforilados de la vía que conduce a la síntesis de sacarosa en el citosol se acumulan y la concentración de  $P_i$  disminuye, por tanto, poco  $P_i$  puede ser reciclado en el cloroplasto (Herold, 1980), trayendo como consecuencia disminuciones en la regeneración de ATP y disminución en la regeneración de intermediarios y RuBP en el ciclo de Calvin, de modo que el proceso de carboxilación disminuye (Sharkey, 1985a; Stitt & Quick, 1989).

Las E y  $g_s$  obtenidas en ambos experimentos mostraron una reducción en el P con respecto a G (PE) y en los tratamientos G, M y P con respecto a C (SE) al  $t_3$ - $t_4$ . Estos valores así como la EUA son similares a los obtenidos en plantas de bancos de germoplasma (Pereyra y col., 2007; Jaimez y col., 2008). Ray y Sinclair (1998), demuestran que el suelo en volúmenes de pote pequeño pierde mayor cantidad de agua en comparación a volúmenes de pote mayor causando estrés por sequía en las plantas. Sin embargo, el tamaño de pote no afectó el  $g_s$  en plantas de *C. arabica* (Ronchi y col.,

2006). En contraste, en *Glicine max* L., hubo un aumento de  $g_s$  cuando las plantas eran trasplantadas a volúmenes de pote mayor (Kasai y col., 2012).

El rendimiento fotosintético depende de la interacción entre el metabolismo de las plantas y las variables ambientales a las cuales estén sometidas. Por lo tanto, la realización de cursos diarios son métodos directos que permiten evaluar la productividad primaria fotosintética de las plantas en el campo a un tiempo determinado (Zotz y Winter, 1993). Los cursos diarios realizados al inicio del tratamiento muestran altos valores de  $A_D$ ,  $E_D$  y por tanto de  $EUA_D$  debido a altas DFF ( $300-500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a causa de un dosel menos denso, mientras que al  $t_3$  y  $t_5$  se obtuvo una reducción significativa de  $A_D$  en P, lo cual constituye una menor ganancia de carbono con respecto a los otros tratamientos. Tezara y col (2009), demuestran una alta correlación ( $R^2 = 0,82$ ) entre las  $A_{DFF\text{sat}}$  y las  $A_D$  obtenidas en 11 especies xerofitas, lo cual apoya el hecho de que las bajas  $A_{DFF\text{sat}}$  obtenidas están asociadas a bajas  $A_D$  en los diferentes tratamientos.

El crecimiento de una planta depende del balance entre la ganancia de carbono por fotosíntesis y su pérdida respiratoria (Amthor, 1984, Taiz y Zeiger, 2010). En los cursos nocturnos realizados no se observaron diferencias entre tratamientos y las  $R_{dN}$  obtenidas constituyen entre el 25 y el 34% de  $A_D$  en G, M y P. Estos resultados sugieren una similar demanda energética para ambos componentes funcionales (crecimiento y mantenimiento) (Amthor, 1984) en todos los tratamientos y por tanto una menor ganancia de carbono para P.

Las curvas  $A/C_i$  brindan gran cantidad de información acerca de las limitaciones relativas estomáticas y no estomáticas (Lawlor y Tezara, 2009). Un incremento en la limitación estomática ( $L_s$ ) acompañada de una disminución en el  $C_i$  debido al cierre estomático (Lawlor, 2002) puede ocasionar un ajuste a las nuevas condiciones de estrés

(Cornic, 1994). En ambos experimentos no se observaron cambios en la EC y el promedio de la  $L_s$  fue de 26%, indicando que la  $g_s$  afectó de igual manera a todos los tratamientos.

Nuestros resultados muestran que posiblemente la limitación no estomática ( $L_m$ ) fue responsable de la limitación de A por la restricción radical. La respuesta de A a altas concentraciones de  $CO_2$  está limitada por la tasa de regeneración de RuBP, entre otros. La  $A_{CO_2sat}$  se obtiene cuando el sistema se encuentra saturado con  $CO_2$  y la difusión estomática no impone una limitación sobre la A. Las disminuciones en P de  $A_{CO_2sat}$  del 34%, acompañados de aumentos en  $L_m$  (30 - 40%) con respecto a los tratamientos menos estresados, podrían estar relacionadas con una limitación en la regeneración de ATP, RuBP y en el contenido y/o actividad de Rubisco (Farquhar y Von Caemmerer, 1982; Lawlor, 1995; Von Caemmerer, 1981). En *C. arabica*, sometida a restricción radical, no se encontraron cambios en el estado activo de Rubisco pero si en su contenido (Ronchi y col., 2006). Por otra parte, las disminuciones en la EC en *G. hirsutum*, los bajos contenidos y actividad de Rubisco en *G. max* fueron revertidos cuando las plantas eran trasplantadas a potes con un mayor volumen (Kasai y col., 2012), sugiriendo que la actividad de la Rubisco es sensible a desbalances en la relación fuente-sumidero (Thomas y Strain, 1991).

En las curvas A/DFP se obtuvo un menor punto de saturación de luz al  $t_{3.5}$  sin encontrar diferencias significativas en  $A_{DFP_{sat}}$  y  $\phi_{CO_2}$  entre tratamientos. Estos resultados son similares a los reportados en plantas de cacao sometidas a diferentes intensidades lumínicas (De Almeida, 2012). Además, se encontró una reducción significativa en  $R_d$  y el PCL en el tratamiento P. Las  $R_d$  obtenidas en todos los tratamientos son menores a las reportadas por De Almeida (2012). En contraste, en plantas de *P. americana* y *G. mangifera* cultivadas en potes pequeños, se encontró una reducción de  $A_{DFP_{sat}}$ , PCL y



$\phi_{CO_2}$  en comparación a plantas crecidas en el campo, lo cual fue atribuido a una mayor capacidad de suministro de asimilados y una disminución de la fuerza del sumidero debido a la restricción radical (Whiley y col., 1999).

Los mecanismos de regulación de A en curvas A/Ci y el desequilibrio en la relación fuente-sumidero en el tratamiento P debido a un menor volumen de suelo, podría traer como consecuencia una aclimatación de A con una regulación del PSII en las reacciones lumínicas. Los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* obtenidos en P en  $t_3$  se vieron afectados, con una reducción significativa del 27% en la  $\Phi_{PSII}$  y de  $q_P$ , sugiriendo una menor capacidad de transferencia de energía a los centros de reacción del PSII. Las reducciones en  $\Phi_{PSII}$  y  $q_P$  fueron acompañadas con una reducción en J en el mismo porcentaje bajo condiciones de  $DF_{sat}$ ; resultados similares han sido reportados en plantas de *C. arabica* (Ronchi y col., 2006), *L. esculentum* (Shi y col., 2008) y plántulas de *G. hirsutum* (Thomas y Strain, 1991) sometidas a restricción del crecimiento radical.

El descenso de los parámetros fotoquímicos en P y en las investigaciones antes mencionadas, fue atribuido a una regulación descendente de la actividad del aparato fotoquímico, con una menor obtención de energía y poder reductor, sugiriendo una pérdida parcial de la capacidad fotosintética acoplado a una alta disipación de energía en forma de calor ( $q_N$ ) en los tratamientos, lo cual fue atribuido como un ajuste a una menor demanda de ATP y NADPH (Shi y col., 2008; Ronchi y col., 2006; Thomas y Strain, 1991) y por tanto, una pérdida en la capacidad fotosintética (Cruz y col., 2003).

La regulación descendente de la actividad fotoquímica en P, podría desencadenar un inadecuado suministro de ATP y NADPH al ciclo de Calvin (PCR), ocasionando una disminución de la tasa de regeneración de RuBP (Thomas y Strain,

1991), acompañado por una baja actividad enzimática de Rubisco (Lawlor, 2002). Kasai y col. (2012), demuestran que al trasplantar plantas de *G. max* a potes de mayor volumen, aumenta la actividad de Rubisco, causado por un incremento en su contenido, lo cual podría contribuir a un incremento en su capacidad fotosintética.

Por otra parte, al  $t_3$  no se encontraron cambios en  $F_v/F_m$  entre tratamientos. En *C. arabica*, a pesar de que se obtuvo una ligera disminución significativa en éste parámetro en el tratamiento P, sugiere que la energía de las reacciones lumínicas es entregada a los centros de reacción del PSII con relativa eficiencia. (Ronchi y col., 2006).

En condiciones de  $DF_{amb}$  ( $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no se encontraron diferencias en los parámetros fotoquímicos entre tratamientos al  $t_1$ , mientras que al  $t_3$  se encontró un menor J en M seguido de P y G. Los valores de J fueron similares a los parámetros obtenidos en plantas de cacao cultivadas durante tres meses a bajas  $DF$  ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (De Almeida, 2012).

El contenido de clorofila está relacionado con la capacidad potencial que tiene la planta de transferir la energía lumínica a los centros de reacción (Taiz y Zeiger, 2010). En el SE el contenido de  $Cl_a$ ,  $Cl_b$ ,  $Cl_{a+b}$  y la relación  $Cl_{a/b}$  al  $t_3$  fue mayor en P, siendo similares a los reportados previamente en cacao (Pereyra, 2007; Daymond y col., 2011; De Almeida, 2012). Cabe destacar, que un mayor contenido de clorofila en este tratamiento no explica las reducciones en la actividad fotoquímica, posiblemente sea una consecuencia de un ajuste en el aparato fotoquímico debido a una baja demanda de energía causado por la alteración en el equilibrio fuente-sumidero por el tamaño de pote.

Al  $t_5$  se obtuvo una reducción significativa del contenido de clorofila total entre 39 y 45% en P con respecto a C. En *C. arabica*, se encontró una reducción en el

contenido de clorofila total en plantas P, siendo atribuido a una pérdida de la capacidad fotosintética (Ronchi y col., 2006).

Los valores de PST fueron similares a los reportados previamente en cacao (Pereyra, 2007; Tezara y col., 2009) y no cambiaron entre tratamiento. El 50% del contenido de PST corresponden a la enzima Rubisco (Stitt, 1991), lo cual apoya el hecho de que la A no está siendo limitada por disminuciones en el contenido de esta enzima importante del ciclo de Calvin.

El análisis de varianza de las medidas alométricas en el SE, muestra diferencias significativas en el área foliar (AF) entre tratamientos, en el tiempo e interacción. A partir del  $t_3$ , se observó una disminución del AF en P, lo cual podría estar asociado a una disminución en la captura de DFF y en consecuencia ser un factor determinante en el área destinada a la asimilación de carbono. Además, podría estar asociado a una menor superficie transpiratoria, manteniendo menores  $E_D$  en P y mayores en G y M. Posiblemente, la disminución del AF en P en el tiempo podría deberse a la pérdida de hojas y a una menor producción de nueva biomasa foliar con respecto a G y M, los cuales mantienen una tendencia positiva. Resultados similares fueron obtenidos en *L. escutellum* (Shi y col., 2008).

Posiblemente, la reducción en el AF y en el número de hojas en el SE sea una consecuencia del mecanismo de regulación metabólico de A en P, debido a una disminución de la fuerza del sumidero impuesto por la restricción del volumen radical.

Por otra parte, en el SE se encontró una reducción del peso seco del 25% en hojas y del 30% en el tallo en P al  $t_3$  y fue acentuado en el  $t_5$ . Resultados similares se han obtenido en *L. escutellum*, *G. hirsutum* y en *C. sativus*, sugiriendo que una menor acumulación de peso seco en el tiempo es el resultado de una menor asimilación de

carbono, de una reducción en el metabolismo y de la exportación de productos por parte de los órganos fuentes al resto de la planta, debido a acumulaciones de carbohidratos no estructurales en las hojas, como una consecuencia directa de una inhibición de A por feedback (Nishizawa y Saito, 1998; Robbins y Pharr, 1988, Thomas y Strain, 1991).

Recientemente, Poorter y col. (2012), demuestran que plantas cultivadas en potes de 2 L acumularon un 43% más de masa seca que plantas cultivadas en potes de 0,2 L, sin encontrar diferencias entre herbáceas y leñosas, sugiriendo que tales efectos son el reflejo de alteraciones del proceso fotosintético en las plantas.

En el análisis de crecimiento no se encontraron diferencias en cuanto al CPF y el CAF en el PE ( $t_4$ ) y en el  $t_{0-3}$  del SE. Sin embargo, en el SE a partir del  $t_3$  se observó una disminución en el CAF y CPF en M y P; posiblemente como una consecuencia de cambios en el AFT y en el peso seco foliar entre tratamientos. No se encontraron diferencias en la relación R/V entre tratamientos pero se observa un leve aumento al  $t_{3-5}$  indicando una menor inversión para la producción de la parte aérea en todos los tratamientos, coincidiendo con los resultados obtenidos en el AF y la altura del tallo obtenidos en esta cosecha.

Una disminución del AFE ha sido asociada a un incremento en la cantidad de carbohidratos y almidón (Newton, 1999). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, consistente con los resultados encontrados en experimentos realizados con plantas herbáceas y leñosas (Poorter., 2012).

En el SE, desde el  $t_{0-3}$  se encontró una menor TRC en P y al  $t_{3-5}$  la TRC y la TAN muestran valores negativos en P, como consecuencia de una pérdida del AF y de la biomasa total respectivamente. Los resultados sugieren que una menor tasa de asimilación de carbono por fotosíntesis (TAN) apoya la teoría de que cualquier

variación en la respuesta potencial para el mantenimiento y la formación de nuevas estructuras podría resultar en alteraciones significativas en la productividad (Amthor, 2006).

La acumulación de biomasa es proporcional al tamaño de la planta y es reflejado por la TRC (Evans 1972). Las diferencias en la TRC de plantas que crecen en diferentes tamaños del pote son menores que las diferencias encontradas en la biomasa final de cada tratamiento, sugiriendo que los factores fisiológicos y morfológicos se ven afectados en menor grado que la acumulación de biomasa (Poorter y col., 2012).

Otras hipótesis plantean que la relación entre el crecimiento y la actividad fotosintética puede ser directa, indirecta o de interrelación, donde el crecimiento en sí puede afectar las tasas de fotosíntesis y en vez de ser una relación de una vía, podría ser una relación mutua entre estos dos procesos (Sweet y Wearing, 1966).

## CONCLUSIONES

Los resultados discutidos permiten proponer un posible modelo que engloba los mecanismos de regulación de A en plántulas de cacao sometidas a restricción del volumen de suelo y su interrelación con los parámetros de crecimiento, medidas alométricas y acumulación de peso seco total en un tiempo de 5 meses. En condiciones de restricción del crecimiento radical en el tratamiento P, la alteración de la relación fuente-sumidero debido a una disminución en el volumen de suelo, podría conducir a una inhibición de A por feedback (Flechas rojas) como resultado de una disminución en la demanda del sumidero. Por lo tanto, la reducción en la exportación de asimilados, podría favorecer la vía que conduce la síntesis de almidón en el cloroplasto. En esta condición, es posible que poco ATP sea reciclado (disminución de  $P_i$ ) y por tanto un menor poder energético es disponible en el ciclo de Calvin.

La reducción en  $R_d$  y PCL en P en  $t_3$  podría ser una consecuencia de la disminución en la fuerza del sumidero. En condiciones de inhibición de A por feedback, esta respuesta podría permitir el reciclaje de ATP y NADPH disponible para ser utilizado en el ciclo de Calvin conduciendo a altas A temporales ( $t_{4-5}$ ) e iguales  $A_{DFFsat}$  ( $t_{3-5}$ ), como respuesta a un posible equilibrio en la distribución de asimilados (Flechas azules).

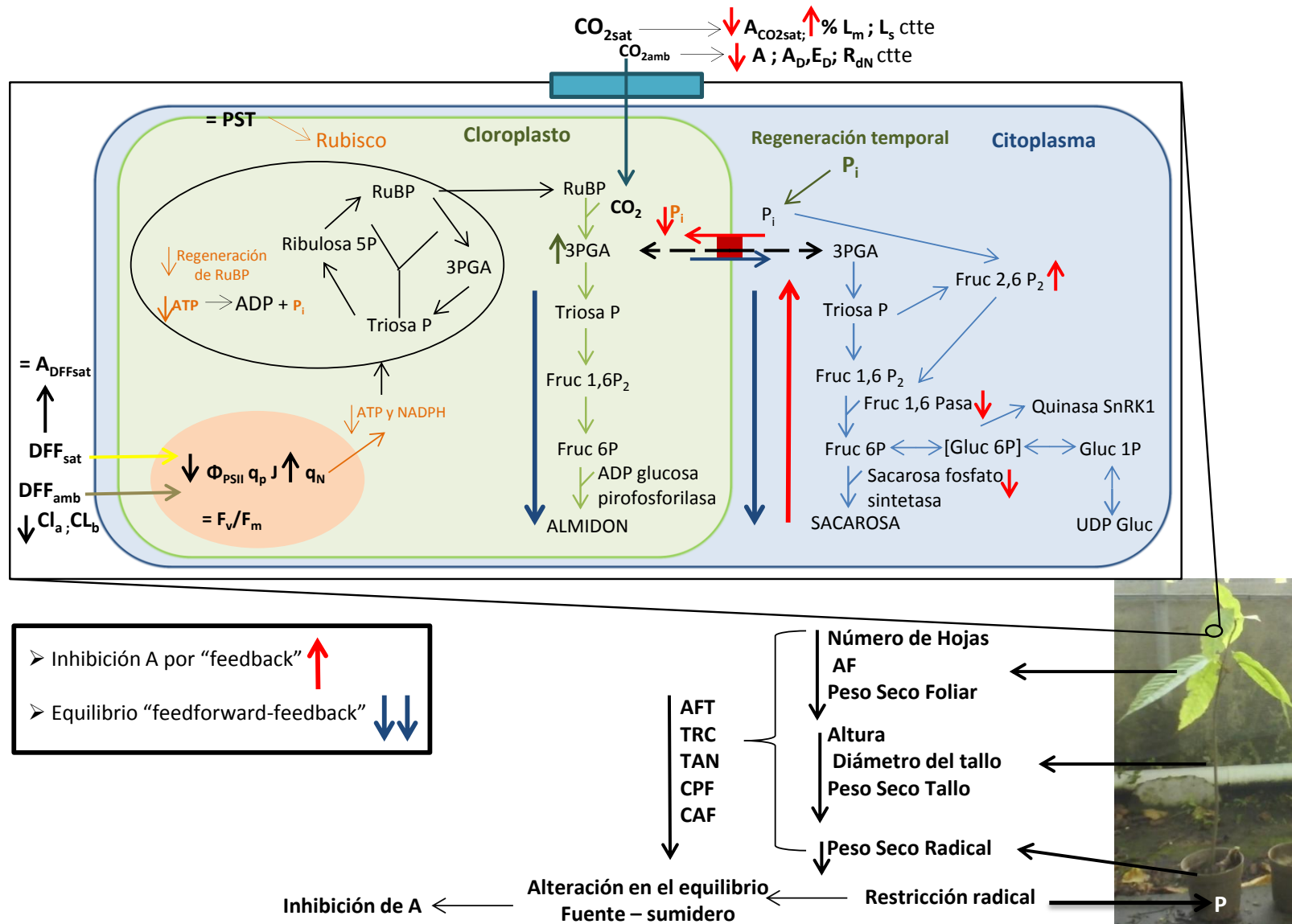
La disminución en el contenido de clorofilas (a, b y total) acoplado a una disminución en  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_p$ , J y ningún cambio en  $F_v/F_m$ , sugiere un ajuste de la actividad fotoquímica que podría conducir a una menor producción de ATP y NADPH. Además, una reducción en  $A_{CO_2sat}$  en curvas A/ $C_i$ , se traduciría en una limitación de A por regeneración de RuBP y no por una disminución en su contenido y/o actividad, reflejado por el mantenimiento de PST, y en EC entre tratamientos en curvas A/ $C_i$ . Por

otra parte, la reducción en  $g_s$ , el mantenimiento de  $L_s$  y el aumento de  $L_m$  en el tratamiento P, sugiere que los factores mesofilares afectan la regulación de A.

En condiciones de  $DFF_{amb}$  y  $CO_{2amb}$ , la reducción de  $A_D$  en P y el mantenimiento de  $R_{dN}$  en todos los tratamientos demuestran una disminución en la ganancia de carbono en P. La reducción en el AF y el número de hojas en P, sugieren una menor superficie transpiratoria, viéndose reflejada en disminuciones en  $E_D$  con respecto a los otros tratamientos. Sin embargo, el  $\Psi$  no se vio afectado por la restricción radical.

Los mecanismos de regulación de A, se vieron evidenciados con la reducción de los parámetros de crecimiento, medidas alométricas y acumulación de peso seco total en el  $t_{3-5}$  (zona inferior del esquema). Sin embargo, los cambios observados en estas medidas de crecimiento a partir del  $t_3$ , pueden afectar el desempeño fisiológico y bioquímico de toda la planta, por lo que se plantea una interrelación entre A y el crecimiento.

Estos resultados sugieren que el volumen de suelo adecuado a utilizar en plantas de cacao en estas condiciones sería el Grande y el Mediano durante 5 meses, tiempo en el cual no se vieron afectados las variables fisiológicas y de crecimiento con respecto a las plantas control. La selección de volúmenes de pote adecuado y el tiempo en el cual se encuentran cultivados, son factores importantes a tener en cuenta no sólo en la realización de experimentos sino también en la obtención de plantas que presenten un mejor desempeño fisiológico y de crecimiento para ser cultivadas en el campo.



**Figura 11.** Posible modelo del mecanismo de regulación metabólico de A y su relación con los parámetros de crecimiento, medidas alométricas y acumulación de peso seco en plántulas de cacao.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida, A., Valle, R. 2008. Ecophysiology of the cacao tree. *Braz J. Plant Physiol.* **19**: 425-448.
2. Amthor, J. 1984. The role of maintenance respiration in plant growth. *Plant Cell Environ.* **7**: 561-569.
3. Amthor, J. 2006. The role of maintenance respiration in plant growth. *Plant Cell Environ.* **7**: 561-569.
4. Aranjuelo, I., Pérez, P., Hernández, L., Irigoyen, J., Zita, G., Martínez- Carrasco, R., Sánchez-Díaz, M. 2005. The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO<sub>2</sub>: photosynthetic down regulation. *Physiol Plantarum.* **123**: 348-358.
5. Araque, O., Jaimez , R., Tezara, W., Coronel, I., Urich, R., Espinoza, W. 2012. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Exp Agr.* **48**: 513-522.
6. Arp, B., Drake, B. 1991. Increased photosynthetic capacity of *Scirpus olneyi* after 4 years of exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ.* **14**: 1004-1008.
7. Azcón-Bieto, J., Talón M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. **pp**: 247-263. Editorial McGraw-Hill/Interamericana. Segunda edición. Madrid, España.
8. Baker, N., Hardwick, K. 1973. Biochemical and physiological aspects of leaf development in cacao (*Theobroma cacao*). I. Development of chlorophyll and photosynthetic activity. *New Phytol.* **72**:1315-1324.
9. Baker, N., Hardwick, K. 1976. Development of photosynthetic apparatus in cacao leaves. *Photosynthetica.* **10**: 361-366.

10. Balasimha, D., Daniel, E., Bhat, P. 1991. Influence of environmental factor on photosynthesis in cocoa trees. *Agr Forest Meteorol.* **55**:15-21.
11. Baligar, V., Bunce, J., Machado, R., Elson, M. 2008. Photosynthetic photon flux density carbon, dioxide concentration and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica.* **46**: 216-221.
12. Barrera, L. 2006. Respuesta de la clorofila *a* y la fotosíntesis al déficit hídrico y diferentes condiciones de luz en dos variedades de Cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología. Universidad de los Andes. **pp**: 65.
13. Barrett, D., Gifford, R. 1995. Acclimation of photosynthesis and growth by cotton to elevated CO<sub>2</sub>: interactions with severe phosphate deficiency and restricted rooting volume. *Aust J Plant Physiol.* **22**: 955-963.
14. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for a quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem.* **72**: 248-254.
15. Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plants extracts. *Photochem Photobiol.* **2**: 241-249.
16. Carmi, A., Hesketh, J., Enos, W., Peters, D. 1983. Interrelationships between shoot growth and photosynthesis as affected by root growth restriction. *Photosynthetica.* **17**: 240-245.
17. Chiariello, N., Mooney, A., Williams, K. 1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissues. En: Pearcy, R., Ehlenringer, J., Mooney, H., Rundel, P. *Plant Physiol Ecol.* **pp**: 327-365. Editions Chapman & Hall. London, England.

18. Cornic, G. 1994. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. En: Baker, N.R., Bowyer, J.R. *Photoinhibition of Photosynthesis*. pp: 297-313. Bios Scientific Publishers. Oxford, England.
19. Cruz, J., Mosquim, P., Pelacani, C., Araujo, W., DaMatta, F. 2003. Photosynthesis impairment in cassava leaves in response to nitrogen deficiency. *Plant Soil*. **257**:417-423.
20. DaMatta, F. 2003. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. *Advan Plant Physiol*. **5**: 227-265.
21. Daymond, A., Tricker, P., Hadley, P. 2011. Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. *Biol Plant*. **55** (1): 99-104.
22. De Almeida, J. 2012. Respuestas ecofisiológicas de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes intensidades lumínicas. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. pp: 7.
23. Dubik, S., Krizek, D., Stimart, D. 1990. Influence of root zone restriction on mineral element concentration, water potential, chlorophyll concentration, and partitioning of assimilate in spreading euonymus (*E. kiautschovica* Loes. "Sieboldiana"). *J Plant Nutr*. **13**: 677-699.
24. Evans, A. 1991. Whole-plant responses of *Brassica campestris* (Cruciferae) to altered sink-source relations. *Am J Bot*. **78**(3): 394-400.
25. Evans, G.C. 1972. The quantitative analysis of plant growth. pp: 734. California: University of California Press.
26. Farquhar, G., Sharkey, T. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol*. **33**: 317-345.

27. Farquhar, G., Von Caemmerer, S. 1982. Modeling of photosynthetic responses to environmental conditions. En: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. *Encyclopedia of Plant Physiology*. **pp:** 549-587. Editorial Springer-Verlag. (New Series). Berlin, Alemania.
28. Fitter, A. 2002. Characteristics and functions of root systems. En: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. *Plant Roots: The Hidden Half*. **pp:** 15-32. Editorial Marcel Dekker, Tercera edición. New York, EEUU.
29. Genty, B., Briantais, J., Baker, N. 1989. The relations between the quantum yield of photosynthesis electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Bioph.* **990:** 87-92.
30. Gomes, S., Kozlowski, T. 1987. Effects of temperature on growth and water relations of cacao (*Theobroma cacao* var. *Comum*) seedlings. *Plant Soil.* **103:** 3-11.
31. González, E. 2007. Denominación de origen Cacao Chuao. *Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen*. **pp:** 1-62.
32. Herold, A. 1980. Regulation of photosynthesis by sink activity: the missing link. *New Phytol.* **86:** 131-144.
33. Herold, A., McNeil, P. 1979. Restoration of photosynthesis in pot-bound tobacco plants. *J Exp Bot.* **30:** 1187-1194.
34. Hoad, S., Russell, G., Lucas, M., Bingham, I. 2001. The management of wheat, barley, and oat root systems. *Advan Agron.* **74:** 193-254.
35. Hutcheon, W. 1977. Water relations and other factors regulating the seasonal periodicity and productivity of cacao in Ghana. *Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Cacao Conference*. **pp:** 233-244. Ibadan, Nigeria.

36. International Cocoa Organization (ICCO). 2010. *Annual report*. **pp:** 15-18. Londres, Inglaterra.
37. Jacob, J., Lawlor, D. 1991. Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficit sunflower, maize and wheat plants. *J Exp Bot.* **42:** 1003-1011.
38. Jaimez, R., Tezara, W., Coronel, I., Urich, R. 2008. Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*) su manejo en el sistema agroforestal. Sugerencias para su manejo en Venezuela. *Rev for venez.* **52(2):** 253-258.
39. Joly, R., Hahn, D. 1989. Net assimilation of cacao seedlings during periods of plant water deficit. *Photosynth Res.* **21:**151-159.
40. Kasai, M., Koide, K., Ichikawa, Y. 2012. Effect of pot size on various characteristics related to photosynthetic matter production in soybean plants. *Int Jo of Agro.* **2012:** 2-7.
41. Kemble, J., Davis, J., Gardner, R., Sanders, D. 1994. Root cell volume affects growth of compact-growth -habit tomato transplants. *Hortscience.* **29:** 261- 262.
42. Koch, K. 1997. Molecular crosstalk and the regulation of C and N responsive genes. En: Foyer, C., Quick, W. *Molecular approach to primary metabolism in higher plants*. **pp:** 105-124. Editorial Tailor y Francis. London, England.
43. Krall, J., Edwards, E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Plant Physiol.* **86:** 180-187.
44. Krause, G., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **42:** 313-349.
45. Krizek, D., Carmi, A., Mirecki, R., Snyder, F., Bruce, J. 1985. Comparative effects of soil moisture stress and restricted root zone volume on morphogenetic and physiological responses of soybean (*Glycine max* L). *J Expt Bot.* **36:** 25-38.

46. Lambers, H., Stuart, F., Stuart Chapin, F., Pons, T. 2008. *Plant Physiology Ecology*. **pp:** 11-99. Editorial Springer. Segunda edición. EE.UU.
47. Latimer, J. 1991. Container size and shape influence growth and landscape performance of marigold seedlings. *Hortscience*. **26:**124-126.
48. Lawlor, D. 1995. The effects of water deficit on photosynthesis. En: Smirnov, N. *Env Plant B*. **pp:** 129-160. Bios Scientific Publishers. Oxford, England.
49. Lawlor, D. 2002. Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata versus metabolism and the role of ATP. *Ann Bot-London*. **89:** 871-885.
50. Lawlor, D., Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ*. **25:** 275-294.
51. Lawlor, D., Tezara, W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot-London*. **4:** 561-579.
52. Lima, A., DaMatta, F., Pinheiro, H., Totola, M., Loureiro, M. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot*. **47:** 239-247.
53. Liu, A., Latimer, J. 1995. Root cell volume in the planter flat affects watermelon seedling development and fruit yield. *Hortscience*. **30:** 242-246.
54. Lobão, D., Setenta, W., Lobão, E., Curvelo, K., Valle, R. 2007. *Cacau cabruca: sistema agrossilvicultural tropical*. **pp:** 290-323. Ilhéus: Edición Valle RR, Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro. Editorial Vital Ltda.
55. Mataa, M., Tominaga S. 1998. Effects of root restriction on the tree development in ponkan mandarin (*Citrus reticulata* B). *J Amer Soc Hort Sci*. **123(4):** 651-655.

56. Miyaji, K., Silva, W., Alvim, P. 1985. Actividade fotossintética em folhas dos cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) em duas estações do ano. *Informe Técnico*, 1983, *Centro de Pesquisas do Cacau*. pp: 122-125. Ilhéus, Brasil.
57. Moore, B., Cheng, S-H., Sims, D., Seemann, J. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ.* **22**: 567-582.
58. Motamayor, J., Risterucci, A., Lopez, P., Ortiz, C., Moreno, A., Lanaud, C. 2002. Cacao domestication. The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity.* **89**: 380-386.
59. NeSmith, D., Bridges, D., Barbour, J. 1992. Bell pepper responses to root restriction. *J Plant Nutr.* **15**: 2763- 2776.
60. NeSmith, D., Duval, J. 1998. The effect of container size. *Hort Technol.* **8(4)**: 495-498.
61. Newton, P. 1991. Direct effects of increasing carbon dioxide on pasture plants and communities. *N. Z J Agric Res.* **34**: 1-24.
62. Nishisawa, T., Saito, K. 1998. Effects of rooting volume restriction on the growth and carbohydrate concentration in tomato plants. *J Amer Soc Sct.* **123(4)**: 581-585.
63. Paul, M., Foyer, C. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot.* **52**: 1383-1400.
64. Paul, M., Pellny, T. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot.* **54**: 539-547.
65. Pereyra, G., Villalobos, V., Rondón, O., Chacón, R., Jaimez, R., Tezara, W. 2007. Variación estacional del intercambio gaseoso y el estado hídrico en accesiones de germoplasma nacional de cacao (*Theobroma cacao* L.). XVII

*Congreso Venezolano de Botánica*, resumen in extenso. **pp: 669-672.**

Venezuela.

66. Peterson, C., Klepper, B., Pumphrey, F., Rickman, R. 1984. Restricted rooting decreases tillering and growth of winter wheat. *Agron J.* **76:** 861-3.
67. Peterson, T., Reinsel, M., Krizek, D. 1991. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant response to root restriction. Root respiration and ethylene generation. *Exp Bot.* **42:** 1241-1249.
68. Pinheiro, H., DaMatta, F., Chaves, A., Fontes, E., Loureiro, M. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci.* **167:** 1307-1314.
69. Poorter, H., Bühler, J., Dusschoten., J., Climent, J. Johannes A. 2012. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Funct Plant Biol.* **39:** 839-850.
70. Rada, F., Jaimez, R., García-Núñez, C., Azócar, A. 2005. Water relations and gas exchange in *Theobroma cacao* var. Guasare under periods of water deficit. *Rev Fac Agron (LUZ).* **22:** 112-120.
71. Ray, JD., Sinclair, TR. 1998. The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *J Exp Bot.* **49:** 1381-1386.
72. Robbins, N., Pharr, D. 1988. Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol.* **87:** 409-413.
73. Ronchi, C., DaMatta, F., Batista, K., Moraes, G., Loureiro, M., Ducatti, C. 2006. Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Funct Plant Biol.* **33:** 1013-1023.



74. Rundel, P.W., Jarrel, W.M. 1989. Water in the environment. En: Pearcy, R.W., Ehleringer, J., Mooney, H.A., Rundel, P.W. *Plant Physiological Ecology: Fields, methods and instrumentation*. pp: 29-56. Chapman & Hall, primer edition. London, England.
75. Sharkey, T. 1985a. Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev.* **51**: 53-106.
76. Sharkey, T. 1985b. O<sub>2</sub>-insensitive photosynthesis in C<sub>3</sub> plants. Its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiol.* **78**: 71-75.
77. Sharkey, T., Bernacchi, C., Farquhar, G., Sings, E. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant Cell Environ.* **30**: 1035-1040.
78. Shi, K., Ding, X., Dong, D., Zhou, Y., Yu, J. 2008. Root restriction induced limitation to photosynthesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Sci Hortic-amsterdam.* **117**: 197-202.
79. Sonnewald, U., Braue, M., Schaewent, A., Stitt, M., Willmitzer, L. 1991. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink source interactions. *Plant J.* **1(1)**: 95-106.
80. Stitt, M. 1991. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ.* **14**: 741-762.
81. Stitt, M., Quick, W. 1989. Photosynthetic carbon partitioning, its regulation and possibilities for manipulation. *Physiol Plantarum.* **77**: 633-641.
82. Stitt, M., Krapp, A. 1999. The interactions between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* **22**: 583-621.

83. Sweet, G.B., Wearing, P.F. 1966. Role of plant growth in regulating photosynthesis. *Nature*. **210**: 77-79
84. Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. **Pp**: 11-99. Editorial Board. Quinta edición. EE.UU.
85. Tezara, W., Coronel, I., Urich, R., Marín, O., Jaimez, R., Chacón I. 2009. Plasticidad ecofisiológica de árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes ambientes de Venezuela. En: *III Congreso Latinoamericano de Ecología y IX Congreso de Ecología de Brazil*. **pp**: 1-5. São Lorenço, Brasil.
86. Thaler, P., Pages, L. 1998. Modeling the influence of assimilate availability on root growth and architecture. *Plant Soil*. **201**: 307-320.
87. Thomas, R., Strain, B. 1991. Root restriction as a factor in photosynthetic acclimation of cotton seedlings grown in elevated carbon dioxide. *Plant Physiol*. **96**: 627-634.
88. Townend, J., Dickinson, A. 1995. A comparison of rooting environments in containers of different sizes. *Plant Soil*. **175**: 139-46.
89. Van Iersel, M. 1997. Root restriction effects on growth and development of salvia (*Salvia splendens*). *Hortscience*. **32**:1186-1190.
90. Von Caemmerer, S. Farquhar, G. 1981. Some relationships between biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*. **153**: 376-387.
91. Wang, K., Kellomäki, S. 1997. Effects of elevated O<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations on photosynthesis and stomatal conductance in Scots pine. *Plant Cell Environ*. **20**: 995-1006.

92. Wang, K., Kellomäki, S., Laitinen, K. 1996. Acclimation of photosynthetic parameters in Scots pine after three years exposure to elevated CO<sub>2</sub> and temperature. *Photosynthetica*. **82**: 195-217.
93. Weston, L. 1988. Effect of flat cell size, transplant age, and production site on growth and yield of pepper transplants. *Hortscience*. **23**: 709-711.
94. Whiley, A., Searle, C., Schaffer, B., Wolstenholme, B. 1999. Cool orchard temperatures or growing trees in containers can inhibit leaf gas exchange of avocado and mango. *J Am Soc Hortic Sci*. **124**: 46-51.
95. Whitfield, C., Davison, A., Ashenden, T. 1996. Interactive effects of ozone and soil volume on *Plantago major*. *New Phytol*. **134**: 287-94.
96. Will, R., Teskey, R. 1997. Effect of elevated carbon dioxide concentration and root restriction on net photosynthesis, water relations and foliar carbohydrate status of loblolly pine seedlings. *Tree Physiol*. **17**: 655-661.
97. Zaharah, S., Razi, I. 2009. Growth, stomata aperture, biochemical changes and branch anatomy in mango (*Mangifera indica*) cv. Chokanan in response to root restriction and water stress. *Sci Hortic-amsterdam*. **123**: 58-67.
98. Ziska, L., Hogan, K., Smith, A., Drake, B. 1991. Growth and photosynthetic response of nine tropical species with long-term exposure to elevated carbon dioxide. *Oecol*. **86**: 383-389.