



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Botánica



Efecto de la aplicación foliar de nanofertilizantes sobre la capacidad fotosintética de dos clones de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Trabajo especial de grado de licenciatura

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br.

Pedro Pablo Gómez Vera

como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

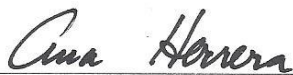
Tutores: Dr. Wilmer Tezara
Dra. Ana Marta Francisco

CARACAS, JUNIO DEL 2019

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. PEDRO PABLO GÓMEZ VERA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Pedro Pablo Gómez Vera, C.I: 24.171.724, titulado “Efecto de la aplicación foliar de nanofertilizantes sobre la capacidad fotosintética de dos clones de cacao (*Theobroma cacao* L.)”, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, al tercer día del mes de Junio del año dos mil diecinueve, dejando constar que el profesor Wilmer Tezara actuó como Coordinador del jurado examinador.



Dr^a. Ana Herrera
Jurado



Dr. Ismael Hernández
Jurado



Dr. Wilmer Tezara
Tutor



Dr^a. Ana Marta Francisco
Cotutora

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES.	7
OBJETIVO PRINCIPAL:	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Ubicación y descripción del área de estudio	17
Material Vegetal.....	17
Nanofertilizante foliar (NF- SiO ₂)	18
Experimentos en condiciones de invernadero	18
Características del suelo y del agua de riego	20
Condiciones microclimáticas	20
Estado hídrico	20
Intercambio de gases	21
Medidas alométricas.....	21
Pigmentos fotosintéticos.....	21
Contenido de proteínas solubles totales (PST)	22
Actividad fotoquímica del PSII	22
Concentración de nutrientes en suelos y en hojas	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Microclima.....	24
Intercambio de gases	25
Parámetros Alométricos	27

Pigmentos fotosintéticos.....	28
Proteínas solubles totales.....	28
Área foliar específica	28
Actividad Fotoquímica del PSII.....	28
Contenido de agua foliar	32
Concentración de nutrientes	32
DISCUSIÓN	35
Intercambio gaseoso.....	35
Contenido de pigmentos fotosintéticos y de proteínas solubles totales (PST)	39
Actividad Fotoquímica del PSII.....	41
Contenido de agua foliar (CAF)	42
Concentración de nutrientes	43
CONCLUSIONES.....	45
FINANCIAMIENTO	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estructura y composición general de la cutícula de la planta que cubre dos células epidérmicas adyacentes (EC) separados entre sí por laminillas intermedias, una capa pectinosa (ML) y por la pared celular (CW). Las ceras epicuticulares (CE) se encuentran sobre la cutícula propiamente dicha (C), seguido de la capa cuticular (CC). El gradiente de hidrofobicidad se debe a la composición química de cada una de las capas, siendo más hidrófoba la más externa (CE) y menos hidrófoba la más interna (CC). C está constituido por Cutina, Polipeptinas y Celulosa. CC está constituido por Pectinas y Hemicelulosas (Modificado de Guzmán y col., 2014b).8

Figura 2. En el lado derecho están los nanomateriales registrados que contienen elementos esenciales o no esenciales bajo una liberación controlada en función del tiempo o los estímulos ambientales. A la izquierda están las nanopartículas de elementos esenciales o no esenciales que se aplican directamente al suelo, al agua de riego o a la superficie de plantas, frutas o semillas (Modificado de Morales-Díaz y col., 2017). 11

Figura 3. Esquema resumen del diseño experimental por cada clon (n=33) con los respectivos tratamientos: Control (C), baja aplicación (cada 15 días; B) y alta aplicación (cada 7 días; A). Los "checks" corresponden a la aplicación de la solución con NF- SiO₂. 19

Figura 4. Parámetros microclimáticos dentro del invernadero durante los experimentos, desde las 7 am hasta las 5 pm. A, Densidad de flujo fotónico fuera del vivero (●) y dentro del vivero (○). B, temperatura del aire (○) y humedad relativa (●). C, temperatura del suelo (●), temperatura foliar en los clones OC-61 (○) y BR-05 (▼). 24

Figura 5. Cambio en el tiempo de los parámetros de intercambio gaseoso en los clones de cacao (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A-F, tasa fotosintética; B-G, tasa de transpiración; C-H, conductancia estomática; D-I, concentración intercelular de CO₂ y E-J, eficiencia del uso de agua. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta frecuencia (▼) de aspersión con NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, P < 0.05 y una prueba post hoc de Duncan). 26

Figura 6. Cambio en el tiempo de los parámetros alométricos en los clones de cacao (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A- D, altura total; B- E, altura de la rama principal del injerto; C- F, diámetro del injerto. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta

frecuencia (▼) de aspersión con NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, P <0.05 y una prueba post hoc de Duncan).27

Figura 7. Cambio en el tiempo de los parámetros de la actividad fotoquímica del PSII a una densidad de flujo fotónico saturante ($1198 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los clones (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A-F, Eficiencia cuántica máxima; B-G, transporte total de electrones; C-H, eficiencia cuántica relativa; D-I, coeficiente de extinción fotoquímica; E-J, coeficiente de extinción no fotoquímica. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta frecuencia (▼) de aspersión del NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7). Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7 por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía (P <0.05) y una prueba post hoc de Duncan.31

Figura 8. Cambio en el tiempo del contenido de agua foliar en los clones BR- 05 y OC-61 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A) del NF- SiO₂, antes aplicar los tratamientos (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7). Las letras indican diferencias significativas y no significativas (N. S.) obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía (P <0.05) y una prueba post hoc de Duncan.32

Figura 9. Cambio en el tiempo de la concentración de nutrientes en hojas de los clones de cacao OC-61 y BR- 05 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A) antes de la aspersión (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7 por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas y no significativas obtenidas entre los tratamientos en el día 35 a través de un ANOVA de una vía (P <0.05) y una prueba post hoc de Duncan.33

Figura 10. Cambio en el tiempo de la concentración de nutrientes en suelos de los clones BR- 05 y OC-61 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A), antes de la aspersión (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 3 por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos en el día 35 a través de un ANOVA de una vía (P <0.05) y una prueba post hoc de Duncan.34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Nanomateriales utilizados, características de las NP, tipo de tratamiento, especies estudiadas y resultados obtenidos en el crecimiento, desarrollo y fisiología de las plantas (Bao-shan, 2004; Haghghi y Pessarakli 2013; Siddiqui y col., 2014; Zarafshar y col., 2015; Ahmed y col., 2015; Sun y col., 2016; Zanetti y col., 2016; Raliya y col., 2017; Sun y col., 2019).</i>	13
Tabla 2. <i>Porcentaje de los elementos presentes en las NF- SiO₂.</i>	18
Tabla 3. <i>Caracterización de parámetros fisicoquímicos y del tipo de suelo utilizado en la siembra de los clones.</i>	20
Tabla 4. <i>Concentración de los elementos (N, P, K, Mg y Ca) presentes en el agua de riego. No detectable (N.D.).</i>	20
Tabla 5. <i>Concentración de clorofila a (Chl_a), clorofila b (Chl_b), relación entre la clorofila a y la clorofila b (Chl_a/Chl_b), clorofila total (Chl_{a+b}), carotenoides totales (C_{x+c}) y la relación entre la clorofila total y los carotenoides totales (Chl_{a+b}/C_{x+c}), Proteínas soluble total (PST) y área foliar específica (AFE), en hojas de los clones de cacao OC-61 y BR- 05 con los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersion (A), antes (día 0) y a los 35 días de aplicar los tratamientos. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7 por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía (P <0.05) y una prueba post hoc de Duncan.</i>	29

AGRADECIMIENTOS

Para mis tutores: Gracias tutores por creer en mí y por acompañarme a lo largo de esta etapa, por toda su paciencia y ganas de trabajar en un país que actualmente se encuentra repleto de oscuridad, por enseñarme que un buen trabajo siempre será recompensado y, finalmente, su amistad.

Wilmer, gracias por mover el cielo y la tierra en pro del proyecto, por el trato familiar en vez de desconocido y por todas las experiencias que se compartieron durante todo el trabajo. Ana Marta, gracias por todos los conocimientos compartidos y por ser columna en mi formación profesional.

Para mis padres: Gracias por mi educación y formación personal, por enseñarme a compartir la vida y disfrutar la de mis allegados.

Para el laboratorio: Héctor, gracias por ser un hermano y fiel compañero de campo, por todo el trabajo duro y tu guiatura. Olga, gracias por estar presente, por todo tú tiempo y los conocimientos agronómicos compartidos. Fabiola, gracias por soportar y aceptar todas mis oscuridades, por estar a mi lado siempre y por toda tu luz.

Para Moro, Yiyi y Heto: Gracias por todo el amor, la paciencia y la libertad. Gracias por darme la oportunidad de quedarme en mi país y de culminar mi licenciatura.

Para Liliana: Gracias por siempre ser tan atenta con el estado y necesidades del proyecto, por ser otra tía que forja el futuro de sus sobrinos.

Para mis amigos y colegas: “Una buena amistad se basa en humor negro y bullying”. Gracias por todo el amor y las experiencias. Sin ustedes no habría llegado tan lejos.

Agradezco a la familia Fisher por abrirnos las puertas de “Las Bromelias”, por toda la confianza y tan buena atención por parte de toda la comunidad.

Agradezco a la Fundación Empresas Polar y al CODECYT por el financiamiento de mi trabajo y por haber garantizado la culminación del mismo.

RESUMEN

La nanotecnología está emergiendo como una estrategia prometedora que ofrece mejorar la eficiencia del uso de nutrientes, reducir el impacto ambiental y aumentar la productividad de la planta. Los nanofertilizantes (NF) son compuestos de nutrientes de formulaciones nanoestructuradas que al aplicarse a las plantas permiten una absorción eficiente o una liberación lenta de micronutrientes, macronutrientes, fungicidas e insecticidas. Los trabajos que evalúen el efecto de la aplicación de NF en las respuestas fisiológicas de las plantas son escasos, especialmente los trabajos relacionados con la aspersión de nanofertilizantes de SiO₂ (NF- SiO₂) en plantas de cacao. Se utilizaron dos clones de cacao Criollo (OC-61 y BR-05) como modelo biológico para evaluar el efecto de dos frecuencias de aplicación foliar de NF-SiO₂ sobre el intercambio gaseoso, actividad fotoquímica del PSII, pigmentos fotosintéticos, concentración de nutrientes y el crecimiento, en condiciones microlimáticas parcialmente controladas. En ambos clones, el uso de NF-SiO₂ mejoró considerablemente la capacidad fotosintética: incrementando la tasa de fotosíntesis neta (A), tasa de transporte de electrones (J), y la eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}), sin ocasionar cambios en los pigmentos fotosintéticos. Se observó un aumento significativo de la eficiencia de uso del agua (EUA) causada por una disminución de la conductancia estomática (g_s) y la tasa de transpiración (E). La mayor capacidad fotosintética estuvo asociada a un aumento en la concentración foliar de N, P y de proteína soluble total (PST). Se concluyó que el NF- SiO₂ tuvo un efecto positivo en los aspectos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis en ambos clones de cacao Criollo, observándose una respuesta diferente entre los dos clones, siendo el clon BR-05 el que tuvo un mejor desempeño fisiológico.

Palabras claves: Nanopartículas, SiO₂, fertilización foliar, fotosíntesis, cacao (*Theobroma cacao* L.).

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol o arbusto semicaducifolio perteneciente a la familia Malvaceae. Presenta una distribución nativa que abarca los bosques lluviosos de la cuenta amazónica y otras áreas tropicales de Centro y Sur América (Zhang y col., 2009; Dostert y col., 2011). Su centro de diversidad se encuentra en la región amazónica en lo que hoy es Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia (Zhang y col., 2009).

Cheesman en 1944, estableció una clasificación del cacao en tres grupos diferenciados morfogénicamente, conocidos como: “Criollo”, “Forastero” y “Trinitario”, siendo el Trinitario el resultado de un cruce o hibridación entre el Criollo y el Forastero. Estos grupos presentan rasgos diferentes en cuanto a su calidad, vigor y rendimiento (Cheesman, 1944). Recientemente, se propuso una nueva clasificación más exhaustiva de germoplasma de cacao en 10 grupos diferenciados genética y geográficamente en Centro y Sur América (Motamayor y col., 2008). Esta clasificación refleja la importancia del cacao como recurso genético por su gran variabilidad genotípica y fenotípica, presentando un valor potencial para los agricultores que cultiven dichas variedades.

En muchos países, el cacao es uno de los cultivos perennes de gran importancia económica, donde es cultivado por casi 6 millones de agricultores (Baligar y col., 2008). Venezuela forma parte de un grupo selecto de países en América productores de cacao fino de aroma, que en conjunto ocupan cerca del 7% del total de la producción mundial (ICCO, 2018). Se estimó que la producción mundial de cacao para el 2018, supera las 4.587.000 toneladas, con un rendimiento superior a los 600 kg ha⁻¹ (ICCO, 2018); el rendimiento en Venezuela para 2016 fue de 360,7 kg ha⁻¹ con una producción neta de 23.254 toneladas y un área cosechada de 64.462 ha (FAO, 2016).

En la época de la colonia, el cultivo de cacao lideró la economía de la Venezuela del siglo XVIII, hasta el punto de convertirse en el mayor exportador entre las colonias hispanas productoras del fruto: Guayaquil, Tabasco, Zapotitlán (Rojas-López, 2012).

En Venezuela, el patrón tecnológico predominante para la producción de cacao se caracteriza por ser un sistema de plantación que utiliza prácticas agronómicas tradicionales (Quintero y col., 2010), las cuales consisten en el control de malezas, plagas y enfermedades, así como en la práctica planificada, continua y controlada del proceso de beneficiado de los granos (fermentación y secado). La mayoría de los productores no aplican fertilizantes, insecticidas ni fungicidas (Quintero y col., 2010), probablemente por elevado costo y/o escasez de estos.

La disminución de la producción del cacao en nuestro país se atribuye fundamentalmente a la vejez de las plantaciones, la baja densidad de siembra y el deficiente manejo agronómico del rubro (Quintero y col., 2010). En diferentes zonas agrícolas del mundo, una gran variedad de cultivos, enfrentan a una gama de desafíos, tales como el estancamiento de cosechas, la baja eficiencia en el uso de nutrientes, la disminución de la materia orgánica del suelo, las deficiencias nutricionales, la disminución de la superficie cultivable, la disponibilidad de agua y la escasez de mano de obra debido al escape de personas de la agricultura, por su migración de los campos a las ciudades (Godfray y col., 2010).

En pro de recuperar la competitividad y productividad del cacao a lo largo de la cadena agroproductiva venezolana, se han aplicado a nivel nacional diferentes tipos de estrategias, tales como el rescate y el uso de cultivares criollos, el aporte de materiales e instrumentos indispensables para el cultivo y la capacitación a los productores con miras a un adecuado manejo agronómico y postcosecha del grano (Quintero y col., 2010); también se promueve la búsqueda de nuevos

agroinsumos que no generen un efecto negativo en el ecosistema, y que a su vez, mantengan e incrementen la productividad de los cultivos, siempre y cuando éstos sean accesibles.

La creciente demanda de alimentos debido al crecimiento de la población mundial ha impulsado el uso a gran escala de fertilizantes tradicionales. Debido a las limitaciones de recursos y la baja eficiencia de uso de los fertilizantes, el costo para el agricultor está aumentando drásticamente (Raliya y col., 2017). La nanotecnología actualmente está emergiendo como una estrategia prometedora que ofrece un gran potencial para adaptar la producción de fertilizantes con la composición química deseada, mejorar la eficiencia del uso de nutrientes, reducir el impacto ambiental y aumentar la productividad (Morales-Díaz y col., 2017; Raliya y col., 2017).

La nanotecnología se puede definir como la investigación y el desarrollo tecnológico en una escala de 1 a 100 nm utilizando átomos, moléculas o macromoléculas (Environmental Protection Agency, 2007; Gogos y col., 2012; Raliya y col., 2017; Ram y col., 2018). Sin embargo, los fenómenos asociados con nano escalas ocurren con nanomateriales (NM) más grandes (Wang y col., 2013) y, por lo tanto, las partículas que tienen un tamaño de hasta 1000 nm (1 μm) se consideran nanopartículas (NP), es decir, NM de tamaño nanométrico (Gogos y col., 2012; Mukhopadhyay, 2014).

Se ha propuesto que la nanotecnología es la respuesta para la evolución de la ciencia de la agricultura de precisión, en la que los agricultores hacen uso de la tecnología para utilizar de manera eficiente el agua, los fertilizantes y otros insumos (Raliya y col., 2017), evadiendo consigo los altos costos de los agroinsumos necesarios para los cultivos. Recientemente se ha demostrado que las NP y NM son una alternativa atractiva para la fabricación de nanofertilizantes (NF), que son más efectivos y eficientes que los fertilizantes tradicionales, debido a su impacto sobre la

calidad nutricional de los cultivos y la tolerancia al estrés en las plantas (Morales-Díaz y col., 2017).

Los NF o fertilizantes inteligentes son compuestos de nutrientes de formulaciones nanoestructuradas que se pueden aplicar a las plantas, lo que permite una absorción eficiente o una liberación lenta de micronutrientes, macronutrientes, fungicidas u otros agroinsumos de interés (Raliya y col., 2017; Morales-Díaz y col., 2017). Los nutrientes minerales tienen funciones esenciales y específicas en el metabolismo de las plantas, como componentes de las estructuras orgánicas, osmoreguladores y activadores de reacciones enzimáticas (Schwambach y col., 2005; Latsague y col. 2014).

La fertilización foliar ha sido utilizada como un medio para suplir nutrientes, hormonas, bioestimulantes y otras sustancias benéficas, que son más específicas ante un caso particular, para las plantas. Los efectos observados de la fertilización foliar normalmente se traducen en un incremento en el crecimiento y rendimiento de los cultivos, mayor resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a déficit hídrico, y un mejoramiento en la calidad de la cosecha (Meléndez y Molina, 2002; Fernández, 2015). Esta respuesta de la planta a la nutrición foliar dependerá de la especie, la fuente del fertilizante, la concentración, la frecuencia de aplicación, y el estado de crecimiento de la planta (Meléndez y Molina, 2002; Fernández, 2015). Uno de los beneficios de las aplicaciones de nutrientes foliares consiste en que la aplicación constante coincide con estados específicos de crecimiento y fructificación, lo que permite ajustar la fórmula y dosis del fertilizante, evitando el uso de elevadas concentraciones que podrían generar un impacto ambiental (Meléndez y Molina, 2002; Morales-Díaz y col., 2017).

Recientemente, se han estudiado diferentes variables ecofisiológicas, tales como la actividad fotosintética e intercambio de gases, eficiencia de uso de agua (EUA) y actividad fotoquímica del PSII, en algunos clones de cacao venezolanos (Pereira y col., 2007; Jaimez y col., 2008; Araque y col., 2012; Ávila-Lovera y col., 2016; Tezara y col., 2016; De Almeida y col., 2017; De Almeida y col., 2018). Sin embargo, el efecto de NF específicos, como los NF de SiO₂, sobre los rasgos fisiológicos de algunas especies cultivables se desconocen, especialmente en respuesta a la aplicación de NM, como los NF foliares, en plantas de cacao.

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto de la frecuencia de aspersión de NF de SiO₂ sobre la actividad fotosintética (intercambio gaseoso, actividad fotoquímica del PSII), la concentración de nutrientes foliares y pigmentos fotosintéticos de dos clones de cacao (OC-61 y BR-05) y comparar si existe una respuesta fisiológica diferencial a la aspersión con NF.

ANTECEDENTES.

En una revisión bibliográfica sobre la eficiencia de uso de micronutrientes (EUM) de algunos cultivos sometidos a diferentes tratamientos con NF, se reportó que la aplicación de aerosoles o fertilizantes foliares implica que los nutrientes suministrados serán absorbidos y exportados desde el punto de aplicación (hoja) hasta el punto de utilización (Monreal y col., 2015). Por lo tanto, en aplicaciones foliares, los nutrientes deben transportarse primero a través de la cutícula de la hoja y, posteriormente, a través de los estomas, tricomas y otras posibles estructuras epidérmicas (Fernández y col., 2015). Se han reportado diferentes desafíos prácticos que definen la EUM con la fertilización foliar, que parece estar asociada con la presencia y el grosor de las ceras de la cutícula que limitan la penetración de nutrientes debido a su hidrofobicidad (Monreal y col., 2015). También, se ha hecho énfasis en que el paso de los nutrientes a través de los estomas es pequeño (< 10%) porque únicamente representan una fracción muy pequeña del área foliar total, y que en la mayoría de las plantas los estomas se ubican en mayor proporción en la superficie abaxial que en la adaxial de las hojas, dependiendo de las especies o variedades (Eichert y Fernández, 2011).

La absorción de soluciones nutritivas por la superficie de la hoja puede ocurrir a través de la cutícula, grietas e irregularidades de la cutícula y los estomas, tricomas, lenticelas u otras estructuras epidérmicas (Tyree y col., 1992; Riederer y Schreiber, 2001; Heredia, 2003; Riederer y Friedmann, 2006; Guzmán y col., 2014a, b; Fernández y col., 2015). La estructura y composición química de la superficie de la hoja determinará la difusión bidireccional de las sustancias entre la superficie foliar y el ambiente, y finalmente, la velocidad de absorción de los fertilizantes foliares (Fernández y col., 2015). Por lo tanto, es de gran importancia comprender la estructura y

composición química de la cutícula para comprender los mecanismos de penetración del fertilizante.

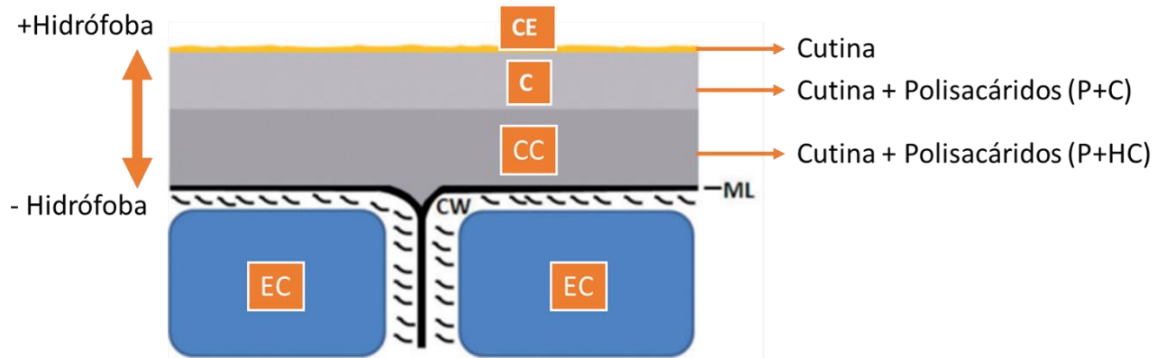


Figura 1. Representación esquemática de la estructura y composición general de la cutícula de la planta que cubre dos células epidérmicas adyacentes (EC) separados entre sí por laminillas intermedias, una capa pectinosa (ML) y por la pared celular (CW). Las ceras epicuticulares (CE) se encuentran sobre la cutícula propiamente dicha (C), seguido de la capa cuticular (CC). El gradiente de hidrofobicidad se debe a la composición química de cada una de las capas, siendo más hidrófoba la más externa (CE) y menos hidrófoba la más interna (CC). C está constituido por Cutina, Polipectinas y Celulosa. CC está constituido por Pectinas y Hemicelulosas (Modificado de Guzmán y col., 2014b).

Las diferentes capas que constituyen la cutícula contienen principalmente ceras, cutina y cutan. Se ha demostrado la presencia de distintos polisacáridos en algunas de las capas (Fig.1; Khayet y Fernández, 2012; Guzmán y col., 2014a, b), por lo que existe un incremento gradual de la polaridad desde la capa de cera epicuticular a la capa de pectina que puede facilitar el movimiento de moléculas polares (Khayet y Fernández, 2012) y, dependiendo de la composición específica de cada cutícula vegetal estudiada en términos de su cantidad y porcentaje de ceras, cutina y polisacáridos, diversas cutículas pueden ser más polares e hidrófilas (Guzmán y col., 2014b). La permeabilidad de diversos compuestos agroquímicos puede variar en relación con los cambios que se generen en la estructura y composición química de la cutícula (Khayet y Fernández, 2012).

La presencia de una micro y/o nano-topografía asociada con la forma de las células epidérmicas y/o la estructura de las ceras epicuticulares, junto con la composición química de la superficie, puede aumentar notablemente la ‘rugosidad’ y el área superficial vegetal (Fernández, 2015). La combinación de la rugosidad y composición química de las superficies vegetales determinará el grado de humectabilidad o mojabilidad, polaridad e hidrofobicidad de las mismas, así como la posibilidad de que se produzca la absorción de fertilizantes foliares aplicados sobre los órganos vegetales (Fernández y Brown, 2013; Fernández y col., 2014a, b).

Se han propuesto dos mecanismos de penetración cuticular de las sustancias según su composición química. El primero consiste en la penetración de sustancias apolares lipofílicas u hidrófobas a través de la cutícula mediante procesos de disolución-difusión, cuyos modelos consideran la primera ley de Fick (Riederer y Friedmann, 2006; Fernández y col., 2015). Los mecanismos de penetración cuticular de los compuestos hidrofílicos no están completamente claros todavía (Fernández y col., 2015). Como segundo mecanismo se ha propuesto que los solutos pueden penetrar la cutícula siguiendo una vía físicamente distinta, la cual han llamado ruta “polar” o “de los poros acuosos” (Schreiber, 2005; Schönherr, 2006; Schreiber y Schönherr, 2009). La demostración reciente de la presencia de pectinas y celulosa en la cutícula de algunas especies estudiadas puede ser una alternativa a la hipótesis de los “poros acuosos” para explicar los mecanismos de permeabilidad cuticular de agua y solutos hidrofílicos (Khayet y Fernández, 2012; Guzmán y col., 2014a, b).

Los mecanismos de penetración estomática del agua no están todavía completamente caracterizados, pero parecen estar relacionados con un proceso de difusión a lo largo de las paredes del poro estomático (Fernández y col., 2015). Diferentes experimentos que permitieron inferir que los estomas desempeñan un papel importante en la absorción de soluciones de nutrientes aplicadas

a las hojas, que entre los más resaltantes, se demostró que la mayor tasa de absorción de las superficies foliares ocurre donde hay estomas y en especial cuando las condiciones experimentales favorecen su apertura (Eichert y Burkhardt, 2001; Fernández y Eichert, 2009; Fernández y col., 2015). El papel de los estomas en el proceso de penetración de soluciones acuosas aplicadas por vía foliar en ausencia de agentes tensioactivos fue confirmado mediante análisis de los nutrientes que se incorporaron por absorción estomática, que fueron realizados a partir de la aspersión de partículas hidrofílicas suspendidas en agua (43 nm y 1 μm diámetro respectivamente), y su posterior observación por microscopia electrónica de barrido, demostrando que la solución de tratamiento pasó a través de los estomas por difusión a lo largo de las paredes de los poros estomáticos (Eichert y Goldbach, 2008). Recientemente, se ha reportado que el cacao es hipoestomático (estomas ubicados en la cara abaxial de la hoja), con 229-262 estomas por mm^2 (Hernández y col., 2017).

Los nutrientes minerales en forma de NF pueden contribuir a la nutrición de las plantas de dos maneras (Fig. 2). La primera consiste en utilizar elementos nanoestructurados dentro de un complejo portador que puede ser o no un nanomaterial, como es el caso de las NP de los elementos no esenciales incorporados por absorción o adsorción en una matriz como el quitosano, ácido poliacrílico, arcilla o zeolita (Golbashy y col., 2016). La segunda es usar el elemento *per se* en una forma nanoestructurada (en suspensión o encapsulada), como las NP de Fe o Zn (Fedorenko y col., 2015). Estos pueden añadirse al suelo o sustrato o ser aplicados por aspersión foliar. Ambos tipos de contribuciones de NF presentan ventajas específicas, como una mayor solubilidad y una absorción rápida o menos lixiviación, en comparación con los fertilizantes tradicionales (Morales-Díaz y col., 2017). El primer método es el más recomendado porque proporciona un mayor control sobre la velocidad y el momento de la liberación del elemento nutriente.

Para reducir la liberación incontrolada de NF al ambiente, se asocian a materiales tales como hidrogeles, películas u otros biopolímeros como el quitosano (Fig. 2) (Hasaneen y col., 2015; Kashyap y col., 2015). Estos biopolímeros responden a los estímulos ambientales, tales como la temperatura o la irradiancia, modificando la liberación de NF en función de las necesidades de las plantas, de modo que existan más nutrientes disponibles durante los períodos de crecimiento óptimo o con mayores requerimientos nutricionales. Por ejemplo, esto podría reducir las pérdidas de N por procesos de nitrificación asociados a bajas temperaturas (DeRosa y col., 2010).

La sílice y los aluminosilicatos mesoporosos (utilizados como NP) tienen propiedades importantes como canales altamente ordenados con gran porosidad accesible (con diámetros entre 2 y 50 nm, de acuerdo con el sistema de nomenclatura de compuestos químicos: IUPAC), grandes áreas de superficie, sitios activos para la adsorción, intercambio de iones y catálisis (Wu y col., 2008; Xu y col., 2009; Monreal y col., 2015).

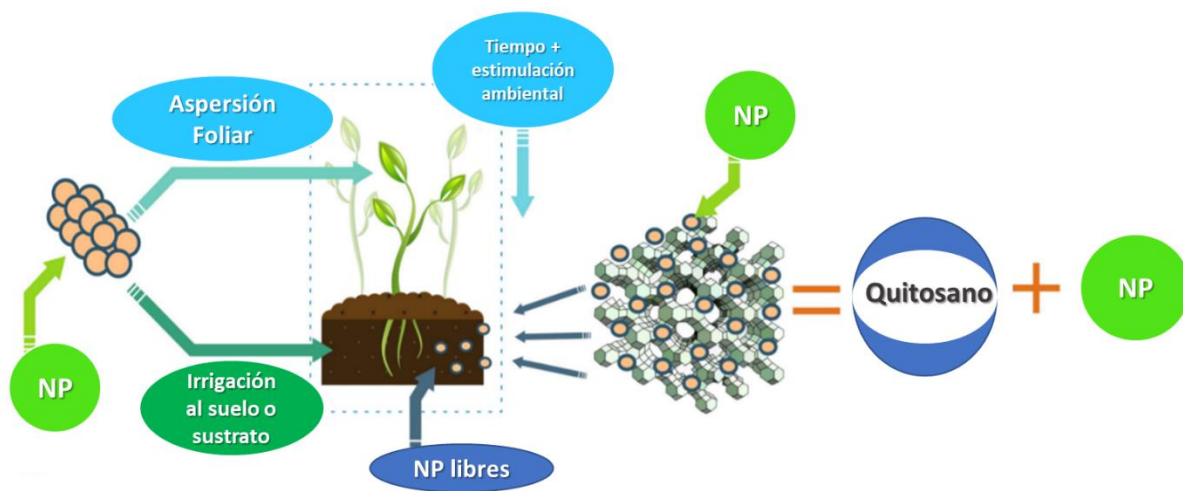


Figura 2. En el lado derecho están los nanomateriales registrados que contienen elementos esenciales o no esenciales bajo una liberación controlada en función del tiempo o los estímulos ambientales. A la izquierda están las nanopartículas de elementos esenciales o no esenciales que se aplican directamente al suelo, al agua de riego o a la superficie de plantas, frutas o semillas (Modificado de Morales-Díaz y col., 2017).

Recientemente, se han reportado un gran número de estudios relacionados con el uso de NF en cultivos, junto con listas exhaustivas de especies de plantas probadas, las NP utilizadas e incluso los tratamientos de aplicación (Tabla 1; Khot y col., 2012; Morales-Díaz y col., 2017; Raliya y col., 2017) pero los trabajos que abarquen las respuestas y rendimientos fisiológicos de las plantas ante la aplicación de NF son escasos, especialmente ante la aplicación de NF de SiO₂ en plantas de cacao, para los cuales no fueron encontrados.

En plantas de pera silvestre con irrigación de diferentes concentraciones de NF de SiO₂ durante 7 días, no se observaron cambios significativos sobre la tasa de fotosíntesis neta (A) y la conductancia estomática (g_s), pero si una reducción de la tasa de transpiración (E) y del contenido relativo de agua (CRA) de la hoja a medida que incrementaba la concentración de la NP (Zarafshar y col., 2015). En plantas de cacao sometidas a déficit hídrico ante la aspersión foliar de SiO₂ nanoestructurado, se observó un incremento en la densidad de centros de reacción activos del PSII y del índice de rendimiento para la conservación de energía hasta la reducción del aceptor final de PSI (PI_{TOTAL}), demostrando que el Si aumenta la eficiencia fotoquímica de la especie. También, se observó una reducción de la g_s, E y en el CRA foliar en plantas no irrigadas a ciertas concentraciones de SiO₂ (Zanetti y col., 2016). Por otro lado, se ha reportado que la nano-sílice confiere tolerancia ante el estrés salino a plantas de tomate (Haghighi y Pessaraki, 2013) y tolerancia contra la sequía en trigo (Ahmed y col, 2015), contribuyendo al incremento de A, la producción de biomasa, concentración de pigmentos fotosintéticos y de proteína soluble total (PST), y la reducción del CRA (Raliya y col., 2015; Ahmed y col., 2016; Sun y col., 2016).

Tabla 1. Nanomateriales utilizados, características de las NP, tipo de tratamiento, especies estudiadas y resultados obtenidos en el crecimiento, desarrollo y fisiología de las plantas (Baoshan, 2004; Haghghi y Pessaraki 2013; Siddiqui y col., 2014; Zarafshar y col., 2015; Ahmed y col., 2015; Sun y col., 2016; Zanetti y col., 2016; Raliya y col., 2017; Sun y col., 2019).

Tipo de NM	Características de las NP		Tratamiento aplicado	Especies	Observación
	Tamaño (nm)	Concentración (ppm)			
Nutrientes esenciales para las plantas					
Nitrogeno Úrea HA	<200	50 Kg ha ⁻¹	Exposición al suelo	<i>Oryza sativa</i>	•Liberación lenta del N.
Magnesio MgO	<10	15	Foliar	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	•Mejora de biomasa, contenido de clorofila y crecimiento fenológico.
Manganeso	20	0,1- 1	Semillas	<i>Vigna radiata</i>	•Mejora la absorción de N y su metabolismo.
Carbono NP de carbono (CNT, grafeno); MWCNT; SWCNT; Fullerol	1.5- 5	5- 500	Medio con nutrientes y absorción foliar; tratamiento de semillas	<i>Solanum lycopersicum,</i> <i>Nicotiana tabacum,</i> <i>Triticum spp,</i> <i>Cynodon dactylon,</i> <i>Cucumis melo,</i> <i>Spartina alterniflora,</i> <i>Glycine max,</i> <i>Zea mays,</i> <i>Hordeum vulgare,</i> <i>O. sativa,</i> <i>Panicum virgatum</i>	•Promueve la regulación positiva de los genes relacionados con el estrés; promover el crecimiento <i>in vitro</i> y desarrollo de biomasa. •Incremento del alargamiento de la raíz •Mejor rendimiento de los cultivos y la calidad de las semillas. •Reducir la toxicidad por metales pesados y el estrés.
Fósforo CaPO ₄ , CMC – HA, Fosforita Zn inducida P	<50	10- 100	Aplicaciones al suelo y foliar	<i>Gossypium sp,</i> <i>Pennisetum glaucum,</i> <i>Vigna aconitifoliaes,</i> <i>Triticum spp,</i> <i>Secale cereale,</i> <i>Pisum sativum,</i> <i>H. vulgare,</i> <i>Z. mays,</i> <i>Fagopyrum esculentum,</i> <i>Raphanus sativus,</i> <i>Cucumis sativus</i>	•Protege contra el estrés oxidativo. •Moviliza P nativo y mejora su captación. • Mejora el crecimiento y rendimiento de las plantas.
Cobre Cu-Quitano	>10	100- 1200	Tratamiento foliar y de semillas	<i>Z. mays,</i> <i>S. lycopersicum</i>	•Mejora del crecimiento de las plantas, biomasa y actividades bioquímicas.
Zinc ZnO	20- 30	20- 30	Aplicación foliar y de semillas	<i>Arachis hypogaea,</i> <i>V. aconitifoliaes,</i> <i>S. lycopersicum,</i> <i>Gossypium spp,</i> <i>Z. mays</i>	•Incremento del potencial de rendimiento y desarrollo de la planta. •Mejora del nivel de

					fitohormonas y desarrollo de la planta.
Hierro Óxido de hierro		10- 100	1,5- 4000	Aspersión Foliar	<p><i>Triticum spp,</i> <i>Citrullus lanatus,</i> <i>Trifolium spp,</i> <i>G. max,</i> <i>O. sativa,</i> <i>S. lycopersicum,</i> <i>A. hypogaea,</i> <i>Z. mays,</i> <i>Curcubita spp.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Mejora del rango fotosintético, contenido de clorofila, biomasa, rendimiento del grano y cualidad nutricional •Incremento del crecimiento de la planta. •Mejora de la absorción de nutrientes por el mejoramiento de la actividad enzimática microbiana en la rizosfera.
Nutrientes no esenciales para las plantas					
Titanio TiO ₂		5- 100	200- 600	Exposición en semillas, suelo y foliar	<p><i>Spinacia oleracea,</i> <i>Lemna minor,</i> <i>S. lycopersicum,</i> <i>Triticum spp,</i> <i>Citrullus lanatus,</i> <i>V. radiata,</i> <i>Vigna aconitifolia</i> <i>Moth,</i> <i>P. glaucum,</i> <i>C. tetragonoloba</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Incremento de la biomasa y actividad fotosintética de la planta. •Mejora la actividad bioquímica de enzimas y absorción de luz por los cloroplastos; incremento de la fotosíntesis, actividad de RuBisCO y fijación de carbono. •Incremento de la velocidad de germinación. •Metabolismo de N mejorado.
Cerio CeO		8- 30	0,1 – 250	Irrigación; semilla/ raíz	<p><i>S. lycopersicum,</i> <i>Arabidopsis thaliana,</i> <i>Coriandrum sativum,</i> <i>Triticum spp</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Mejora el crecimiento y rendimiento de las plantas. •Mejora en la respuesta fisiológica y molecular. •Aumenta la actividad de la enzima de tolerancia al estrés.
Indio In ₂ O ₃		20- 70	250	Semilla/ raíz	<p><i>Arabidopsis thaliana</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Mejora en la respuesta fisiológica y molecular.
Plata Ag		5- 25	1- 10	Hidropónicos, suelo	<p><i>Populus spp,</i> <i>A. thaliana,</i> <i>Trifolium spp L.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Influencia en el efecto fitoestimulador. •Incremento en la absorción de nutrientes por mejoramiento.
Silice Si SiO SiO ₂		8- 15	5- 800	Irrigación de suelos, exposición de semillas y raíces.	<p><i>S. lycopersicum,</i> <i>Triticum spp,</i> <i>Lupinus albus,</i> <i>Larix olgensis,</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Ayuda a superar el estrés por salinidad y a mejorar el crecimiento de las plantas.

			<p>En el caso del cacao: Aspersión foliar de SiO₂ no nanoestructurado.</p> <p>En el caso de la Pera silvestre: Aspersión foliar</p> <p><i>Oryza sativa</i>: Irigación de SiO₂ no nanoestructurado</p>	<p><i>Pyrus pyraster,</i> <i>Theobroma cacao</i> <i>O. sativa</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> •Promueve la germinación y el crecimiento. •Mejoramiento en la proteína total y en el contenido de clorofila. •Mejora la tolerancia de las plantas al déficit hídrico, mitigando el efecto del estrés oxidativo. •Incremento de la tasa fotosintética, eficiencia de uso de agua y eficiencia de carboxilación.
Ferrita de cobalto	-	1- 1000	Exposición de raíces	<i>S. lycopersicum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve el crecimiento de la planta.
Nanofosforos de conversión ascendente	-	10	Brotos de exposición	<i>V. radiata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve el crecimiento de la planta.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Caracterizar el efecto de la frecuencia de aspersión de nanofertilizantes de SiO₂ sobre la actividad fotosintética de dos clones de cacao (*Theobroma cacao* L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Evaluar el intercambio gaseoso: fotosíntesis (A), conductancia estomática (g_s), transpiración (E), concentración intercelular de CO₂ (C_i), y la eficiencia de uso de agua (EUA), en dos clones de cacao, a una densidad de flujo fotónico saturante ($DFF= 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2) Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos y de proteína soluble total (PST) en hojas de dos clones de cacao.

3) Evaluar la actividad fotoquímica del PSII: eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) al amanecer, eficiencia cuántica relativa del PSII (Φ_{PSII}), transporte total de electrones (J), coeficiente de extinción fotoquímica (q_p) y coeficiente de extinción no fotoquímica (q_N), a una densidad de flujo fotónico saturante ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4) Determinar el contenido de agua foliar (CAF), en dos clones de cacao.

5) Evaluar la concentración de macronutrientes totales (N, P, K, Mg y Ca), en hojas maduras de dos clones de cacao.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y descripción del área de estudio

El estudio se realizó en la finca “Las Bromelias” ubicada en Cumboto (Ocumare de la Costa), en el estado Aragua (coordenadas geográficas: 10°25'10.3"N y 67°46'48.2"O). Las plantas a estudiar se mantuvieron bajo condiciones parcialmente controladas en vivero.

Material Vegetal

Los clones utilizados en los experimentos provienen de injertos obtenidos a partir de la toma de las varetas procedentes de las plantas madre, utilizando como portainjerto o patrón plantas del clon OC-61. Los clones se sembraron en bolsas con capacidad de 3 kg, con suelo arenoso procedente de la orilla de los ríos cercanos, con incorporación constante de nutrientes que aseguró su crecimiento y desarrollo durante 7 meses en condiciones de invernadero hasta la realización del experimento.

Los clones a estudiar fueron seleccionados con base en su ubicación dentro del área de estudio y por presentar las siguientes características:

- **OC-61:** Ocumare 61, cacao Criollo Moderno de la selección del año 1945. El cacao Criollo Moderno es un cacao Trinitario que presenta características sensoriales y organolépticas muy similares al Criollo (Motamayor y col., 2002). Dicho cultivar presenta una alta productividad y calidad sensorial, por ende, es de gran interés comercial; también, se conocen algunas de sus respuestas fisiológicas.
- **BR-05:** Bromelia 05, una selección nueva con características de Criollo ubicado en la finca “Las Bromelias” del cual no se han realizado estudios genéticos y ecofisiológicos, sin embargo, presenta una alta productividad y calidad sensorial.

Nanofertilizante foliar (NF- SiO₂)

Partículas nanoestructuradas de SiO₂ recubierta de una matriz de quitosano con un tamaño de 34 nm, que contienen una fórmula N: P: K (15: 15: 15) y los % de micro y macronutrientes representados en la Tabla 2. El NF fabricado por el Dr. Jimmy Castillo del Centro de Fisicoquímica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Tabla 2. Porcentaje de los elementos presentes en las NF- SiO₂.

ELEMENTO	Co	B	Mo	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Ca	S
%	0,025	0,025	0,025	0,350	0,150	0,150	0,100	0,250	0,350	0,200

Experimentos en condiciones de invernadero

El experimento se realizó en plantas de 7 meses de edad luego de la injertación. Se aplicaron 3 tratamientos diferentes por cada clon (n = 33), en función del número de aspersiones o frecuencia de aplicación (25ml por planta con una concentración constante de aproximadamente 11 ppm NF-SiO₂) por unidad de tiempo (Fig. 3):

1. Control, C (sin aplicación del NF- SiO₂; n=11)
2. Baja frecuencia de aplicación, BF (aspersión del NF- SiO₂ cada 15 días; n=11)
3. Alta frecuencia de aplicación, AF (aspersión del NF- SiO₂ cada 7 días; n=11)

Se colocaron láminas de aluminio en las bases del vástago de cada planta (evitando escurrimiento al suelo) durante la aplicación de los tratamientos y se suspendieron las plantas del suelo vivero sobre mesas de bambú, para evitar la incorporación de nutrientes desde el suelo a las plantas a lo largo del estudio. Las plantas se organizaron en 3 bloques (un bloque por tratamiento) con un total de 22 plantas (n=11 por clon). Semanalmente, se procedía a la rotación de las plantas

entre las mesas con la finalidad de reducir el efecto de bloque. Todas las determinaciones se realizaron en diferentes plantas seleccionadas al azar, en cada tratamiento.

Se realizaron las medidas de intercambio gaseoso y actividad fotoquímica semanalmente desde el inicio del experimento (día 0) durante 3 semanas (hasta el día 21) y, finalmente, dos semanas después de la aplicación continua de los tratamientos (día 35). Las mediciones se realizaron en 7 plantas diferentes de cada tratamiento para cada clon (N= 42). Se realizaron las medidas y análisis fisiológicos en hojas totalmente expandidas de la misma edad (3^{er} par foliar) y, finalmente, se tomaron muestras de suelo, del agua utilizada en el riego y se cosecharon las hojas para los análisis de concentración de nutrientes al inicio del experimento (día 0) y al finalizar el experimento (día 35). También, se caracterizó la textura y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo, como pH y la conductividad eléctrica.

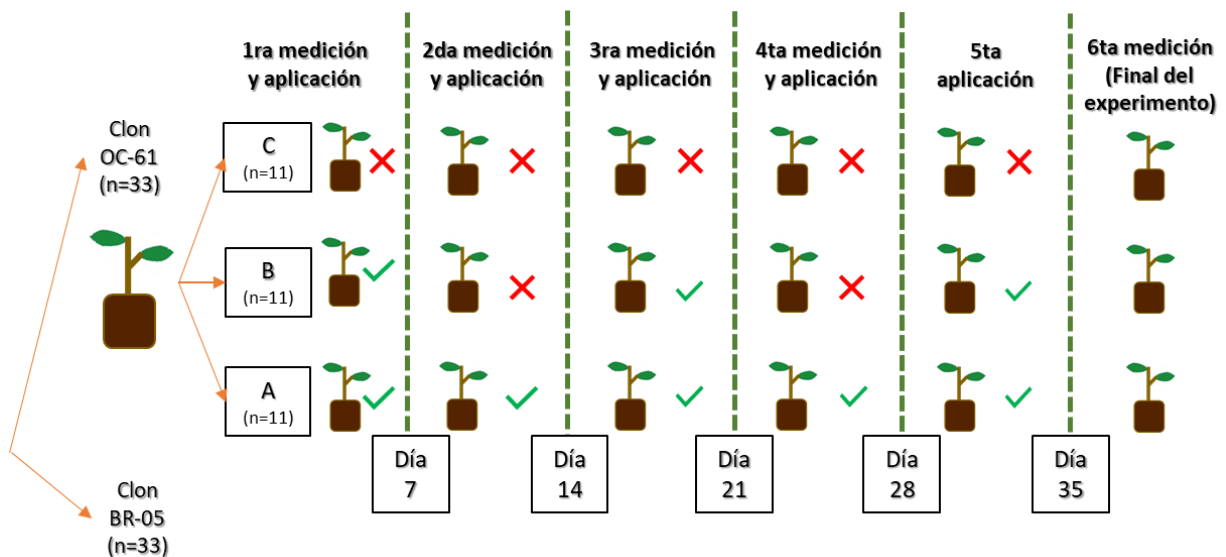


Figura 3. Esquema resumen del diseño experimental por cada clon (n=33) con los respectivos tratamientos: Control (C), baja aplicación (cada 15 días; B) y alta aplicación (cada 7 días; A). Los "checks" corresponden a la aplicación de la solución con NF- SiO₂.

Características del suelo y del agua de riego

El análisis de caracterización del tipo de suelo en conjunto con el análisis fisicoquímico, indican que el suelo es franco arenoso, ligeramente ácido (pH= 6,4) y no salino (CE= 1,3 mS).

Tabla 3. Caracterización de parámetros fisicoquímicos y del tipo de suelo utilizado en la siembra de los clones.

TIPO DE SUELO	ARCILLA (%)	LIMO (%)	ARENA (%)	pH	CE (mS)
Franco arenoso	10	12,5	77,5	6,4	1,3

Tabla 4. Concentración de los elementos (N, P, K, Mg y Ca) presentes en el agua de riego. No detectable (N.D.).

N (mmol Kg ⁻¹)	P (mmol Kg ⁻¹)	K (mmol Kg ⁻¹)	Mg (mmol Kg ⁻¹)	Ca (mmol Kg ⁻¹)
N. D.	0,13	42	215	148

Condiciones microclimáticas

Se realizaron mediciones microclimáticas a cada hora (7:00 hasta 17:00 h) durante la caracterización fisiológica: densidad de flujo fotónico (DFF), temperatura foliar (T_f) y temperatura del suelo (T_s), mediante el uso de un sensor cuántico (LI-COR, Modelo 250A) y sensores de temperatura (YSI 04B0618-409B; Switch Craft LN4153-405) y un termómetro termistor (8402-10, Cole-Parmer Instrument Company). Simultáneamente, se registró la T_a y la HR del invernadero durante el todo el experimento con un HOBO (Pro V2).

Estado hídrico

Se determinó el contenido de agua foliar (CAF) mediante la recolección de discos de hojas de área conocida (1,54 cm²) a los cuales se les determinó el peso fresco (PF) y, luego de haberse

colocado todos los discos en la estufa a 60 °C durante 48 h, el peso seco (PS). El CAF se determinó como $CAF = (PF - PS) / PF$.

Intercambio de gases

Las medidas instantáneas de fotosíntesis (A), transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y concentración intracelular de CO₂ (C_i) se realizaron en hojas intactas (n = 7; 1 hoja por planta) que presentaban la misma edad foliar, utilizando un sistema abierto de intercambio de gases portátil (analizador infrarrojo de gases, CIRAS 2; cámara de asimilación PLC, Pp Systems, UK). Las medidas se realizaron a 410 μmol mol⁻¹ de CO₂, 21 % de O₂, 28 °C y 1000 μmol m⁻² s⁻¹ de DFF. La EUA instantánea se determinó como la relación A/ E. El déficit de presión de vapor hoja-aire (DPV) se mantuvo en ~ 1.25± 0.017 kPa, durante las medidas del intercambio de gases.

Medidas alométricas

Se determinó la altura total (h_t), la altura de la rama principal del injerto (h_{inj}), a partir del nudo del injerto, con una cinta métrica, y el diámetro de la rama principal del injerto (d_{inj}) con un vernier (n= 3 plantas por tratamiento) a los 14, 21 y 35 días del experimento.

Pigmentos fotosintéticos

Se determinó el contenido de los pigmentos fotosintéticos: clorofilas a (Chl a), b (Chl b) y carotenoides (X+C) en hojas (n = 7; 1 hoja por planta en cada tratamiento), según Bruisma (1963) y Wellburn (1994). Se tomaron 6 discos por hoja con área conocida (a= 1,54 cm²), se maceraron en frío con carbonato de calcio y acetona al 80% para la extracción de éstos. El extracto fue filtrado con papel de filtro, se enrasó a 25ml con acetona al 80% y se registró la densidad óptica de los extractos a cuatro longitudes de onda (λ; 470, 663, 652 y 645 nm) con un espectrofotómetro (Ultraspec Plus, Pharmacia LKB, UK). Los cálculos de la concentración de clorofilas y

carotenoides se realizaron en base a los coeficientes de extinción calculados para cada longitud de onda de acuerdo Bruisma (1963) y Wellburn (1994), respectivamente.

Contenido de proteínas solubles totales (PST)

Se determinó el contenido de PST según Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar, a partir de extractos obtenidos por maceración en frío (0-4 °C) de 4 discos de hoja en un buffer de extracción (100 mM Bicina- NaOH pH 8; 20 mM MgCl₂; 50 mM mercaptoetanol; 40 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil y PVP).

Actividad fotoquímica del PSII

Las medidas de fluorescencia de la Chl *a* del PSII se realizaron en hojas (n=7) a una DFF de 1000 μmol m⁻² s⁻¹, utilizando un fluorímetro portátil (PAM 2100, WALZ, Alemania). Se determinaron medidas instantáneas de la fluorescencia mínima (F_o) y la fluorescencia máxima (F_m) de hojas (aclimatadas a oscuridad), y la fluorescencia mínima (F'_o), fluorescencia máxima (F'_m) y fluorescencia estable (F) de hojas adaptadas a una determinada DFF. Con estas medidas, el equipo estimó los siguientes parámetros siguiendo los protocolos establecidos por Genty y col. (1989):

Eficiencia cuántica máxima del PSII: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$.

Eficiencia cuántica relativa del PSII: $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$.

Coefficiente de extinción fotoquímica: $q_P = (F'_m - F)/(F'_m - F'_o)$.

Coefficiente de extinción no fotoquímica: $q_N = 1 - (F'_m - F'_o)/(F_m - F_o)$.

El transporte total de electrones (J) se estimó como: $J = \Phi_{PSII} \times DFF \times a \times f$ (Krall y Edwards, 1992), donde *a* es la fracción de DFF absorbida por la hoja (considerada como 0,84) y *f* es la

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

Concentración de nutrientes en suelos y en hojas

Se determinó la concentración de los macronutrientes de suelos ($n=3$ por tratamiento) y de las hojas utilizadas en la determinación de los pigmentos fotosintéticos ($n=7$). El suelo fue secado al aire y posteriormente tamizado (1 mm de malla). El material foliar se secó en estufa durante 48 h a $70\text{ }^\circ\text{C}$ con ventilación forzada. Se registró el peso seco por muestra (200 mg de suelo y 50 mg de hoja). Para la determinación de P_{totales} y cationes (K^+ , Mg^{+2} y Ca^{+2}), se digirieron las muestras de con mezcla binaria $H_2SO_4:HClO_4$ (4:1), a $200\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. La determinación de la concentración de P_{totales} se realizó según la metodología modificada propuesta por Murphy y Riley (1962) a $\lambda=882\text{ nm}$; el K^+ , Mg^{+2} y Ca^{+2} se determinaron por absorción atómica de llama (SpectrAA 55B, Varian, Australia). Para los análisis de N orgánico total, se realizó según la metodología Kjeldahl (Jackson, 1968). La digestión utilizada fue con H_2SO_4 concentrado y una pizca de catalizador Kjeltabs, (3,5 g K_2SO_4 y 3,5 mg Se), a $350\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas (Digestion Kjeltac System 40-1016. Tecator, Suecia). El digerido se destiló con NaOH al 40% y el destilado se recolectó en fiolas con 25 ml de H_3BO_3 (2 %), con 5 gotas de indicador Corway. Posteriormente, se realizó una titulación con HCl 0,01 N (Titrisol®, Merck).

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Statistica 13.0 para realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Tratamiento), con un nivel de significancia de $p<0.05$. Se utilizó el programa SigmaPlot 13.0 para la representación gráfica de los resultados y el ajuste de las curvas.

RESULTADOS

Microclima

En la Figura 4, se muestran los valores de DFF, T_a , HR, T_s y T_f , registrados durante los días de muestreo a lo largo del experimento. Se observó que la mayor DFF fue alcanzada al mediodía (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); la malla neutra redujo efectivamente el 70 % de la DFF que incide sobre el invernadero. Las mayores T_a fueron alcanzadas al mediodía (30-32°C). La T_a , T_s y T_f presentaron un comportamiento similar a lo largo del día, siendo la T_s menores que T_a y T_f . La HR disminuyó desde un 90 a 60 % entre las 7:00 y 13:00 h. El déficit de presión de vapor hoja- aire (DPV) mostró valores mínimos a las 7:00 h (0,20 kPa) y máximos a las 13:00 h (1,89 kPa).

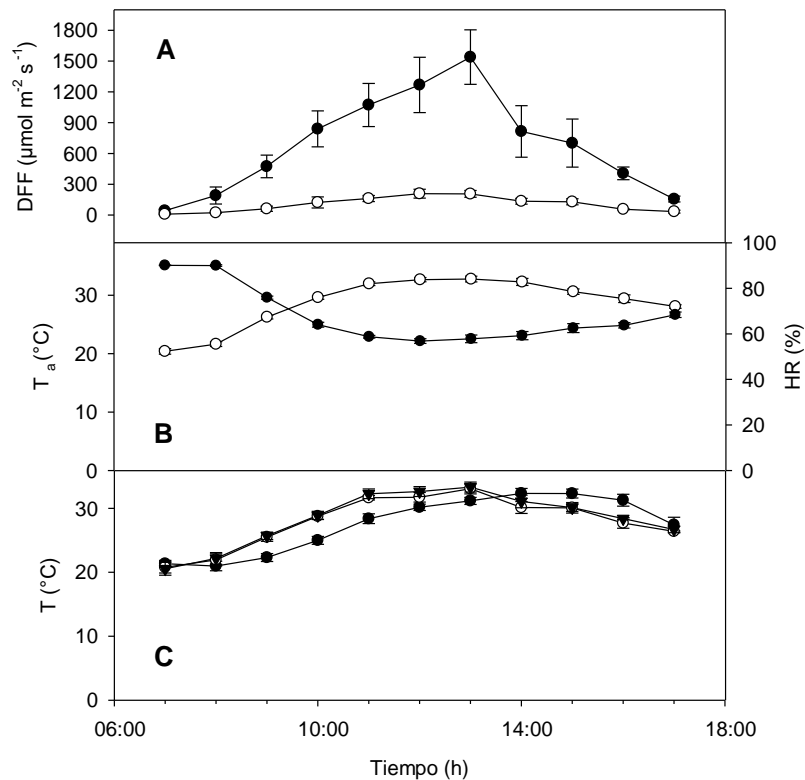


Figura 4. Parámetros microclimáticos dentro del invernadero durante los experimentos, desde las 7 am hasta las 5 pm. A, Densidad de flujo fotónico fuera del vivero (●) y dentro del vivero (○). B, temperatura del aire (○) y humedad relativa (●). C, temperatura del suelo (●), temperatura foliar en los clones OC-61 (○) y BR-05 (▼).

Intercambio de gases

Desde el día 14 y hasta la culminación del experimento (día 35), se observó en ambos clones un incremento significativo de A, en los tratamientos de baja frecuencia (BF) y alta frecuencia (AF) de aspersión del NF- SiO₂ en comparación con plantas control (C). Se obtuvo un incremento en A de 16 y 20 % en OC-61 en BF y AF, respectivamente. Para el clon BR-05, se obtuvo un incremento en A de 56 y 60 % en BF y AF respectivamente (Figura 5 A, F).

Al finalizar el experimento (día 35), el clon OC-61, mostró una reducción del 26 % en E en BF y AF en comparación con C. Para el clon BR-05, se obtuvo una reducción de 23 y 36 % de E en AF y BF de aspersión, respectivamente (Figura 5 B, G).

La g_s tuvo una tendencia similar a la E; en OC-61, se observó una reducción significativa de g_s del 11 y 37% en AF y BF respectivamente en comparación con C. Para el clon BR-05, se obtuvo una disminución del 22% en AF de aspersión en comparación con C (Figura 5 C, H). A lo largo del experimento, no se observó una variación significativa de C_i entre los tratamientos para el clon OC-61, con excepción al día 7. Para el clon BR-05, en el día 35 se observó una reducción significativa de C_i en AF y BF en comparación con C (Figura 5 D, I).

Al Final del experimento, se observó un incremento significativo de EUA en AF y BF de aspersión en comparación con C en ambos clones. En OC-61, se obtuvo un incremento significativo de 42 % para el tratamiento de BF (Figura 5 E). Para el clon BR-05, se obtuvo un incremento significativo del 100 % para ambos tratamientos, AF y BF (Figura 5 J).

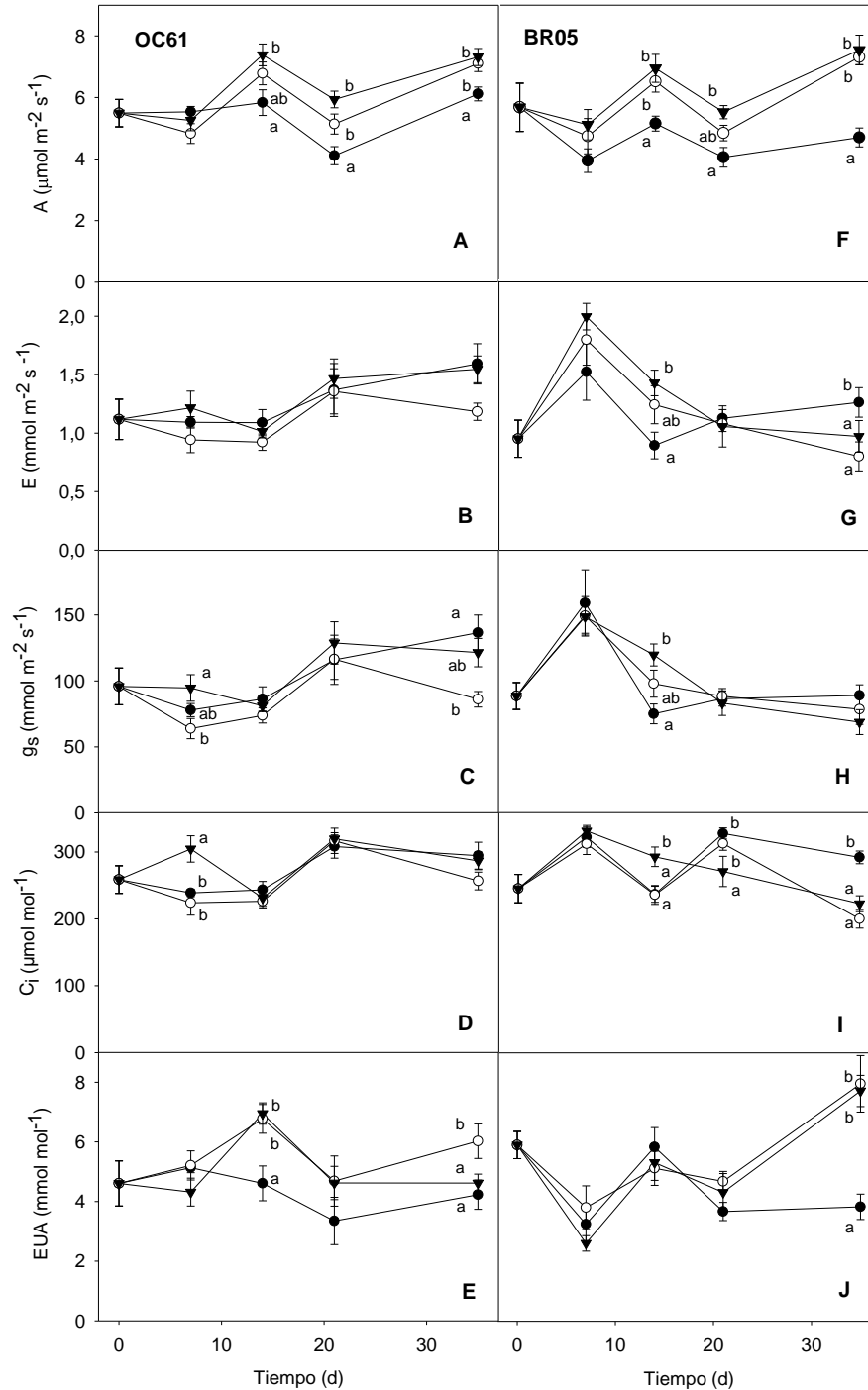


Figura 5. Cambio en el tiempo de los parámetros de intercambio gaseoso en los clones de cacao (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A-F, tasa fotosintética; B-G, tasa de transpiración; C-H, conductancia estomática; D-I, concentración intercelular de CO₂ y E-J, eficiencia del uso de agua. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta frecuencia (▼) de aspersión con NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 7). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, P < 0.05 y una prueba post hoc de Duncan).

Parámetros Alométricos

Desde el día 14 hasta el día 35, en el clon OC- 61 se observó un incremento significativo en d_{inj} de 26 y 32 % para las plantas con tratamientos BF y AF en comparación con las plantas C (Figura 6 C).

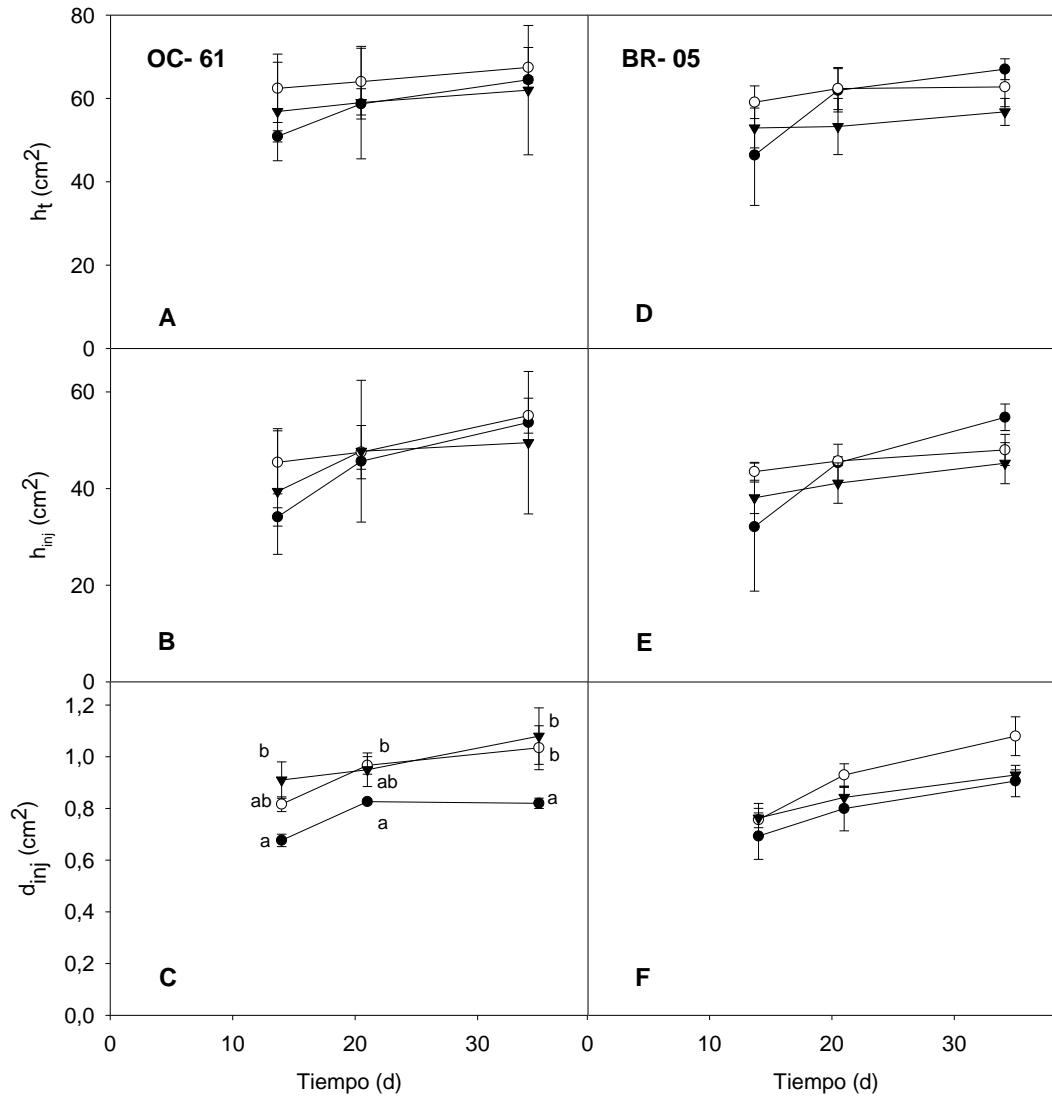


Figura 6. Cambio en el tiempo de los parámetros alométricos en los clones de cacao (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A- D, altura total; B- E, altura de la rama principal del injerto; C- F, diámetro del injerto. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta frecuencia (▼) de aspersión con NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios ± error estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, $P < 0.05$ y una prueba post hoc de Duncan).

Pigmentos fotosintéticos

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (BF y AF) y el control en las concentraciones de los diferentes pigmentos fotosintéticos, ni en la relación $\text{Chl } a/ \text{Chl } b$ y $\text{Chl } a/ \text{X+ C}$, en ninguno de los dos clones evaluados (Tabla 5).

Proteínas solubles totales

Se obtuvo un incremento del 15 y 54 % de PST en el clon OC-61 para los tratamientos de BF y AF, respectivamente. Mientras que en el clon BR-05, se obtuvo un incremento del 26 y 33% de la PST en los tratamientos de AF y BF, respectivamente (Tabla 5).

Área foliar específica

En el clon OC-61, se observó una disminución del AFE en los tratamientos con aspersion del NF- SiO_2 , mientras que en el clon BR-05, no cambió significativamente (Tabla 5).

Actividad Fotoquímica del PSII

Para el día 35, se obtuvo un incremento F_v/ F_m en ambos clones para los tratamientos AF y BF de aspersion de NF- SiO_2 en comparación con el tratamiento C (Figura 6 A, F). El clon OC-61 presentó valores más altos de F_v/ F_m ($0,810 \pm 0,002$ AF; $0,780 \pm 0,010$ BF; $0,810 \pm 0,005$ C) en comparación con el clon BR-05 ($0,790 \pm 0,006$ AF; $0,800 \pm 0,007$ BF; $0,770 \pm 0,010$ C).

En el día 35, el clon OC-61 mostró un incremento significativo del 44 % en J en AF en comparación con los tratamientos BF y C. Mientras que para el clon BR-05, se observó un incremento del 162 y 94 % en J para los tratamientos BF y AF, respectivamente (Figura 6 B, G).

La Φ_{PSII} tuvo una tendencia similar que J. El clon OC-61, mostró un incremento significativo del 52 % en Φ_{PSII} en AF en comparación con los tratamientos BF y C. En BR-05, se

observó un incremento del 148 y 81 % en Φ_{PSII} para los tratamientos BF y AF, respectivamente (Figura 6 C, H).

Tabla 5. Concentración de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*), relación entre la clorofila a y la clorofila b (Chl *a*/ Chl *b*), clorofila total (Chl *a+b*), carotenoides totales (C *x+c*) y la relación entre la clorofila total y los carotenoides totales (Chl *a+b*/ C *x+c*), Proteínas soluble total (PST) y área foliar específica (AFE), en hojas de los clones de cacao OC-61 y BR- 05 con los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A), antes (día 0) y a los 35 días de aplicar los tratamientos. Los valores representados son los promedios \pm error estándar ($n = 7$ por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía ($P < 0.05$) y una prueba post hoc de Duncan.

Tiempo	OC-61			
	Día 0	Día 35		
	C	C	B	A
Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	72,63 \pm 6,47	47,89 \pm 5,43	42,96 \pm 5,89	50,31 \pm 4,22
Chl <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	31,87 \pm 4,88	26,21 \pm 2,24	22,91 \pm 2,77	25,26 \pm 2,27
Chl <i>a+b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	106,60 \pm 11,80	72,53 \pm 8,00	68,28 \pm 8,68	77,75 \pm 6,25
X+C ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	17,54 \pm 1,50	10,79 \pm 1,67	10,50 \pm 1,11	11,69 \pm 1,38
Chl <i>a/b</i>	2,42 \pm 0,31	1,81 \pm 0,10	1,90 \pm 0,09	1,98 \pm 0,09
Chl <i>a+b</i> / X+C	6,07 \pm 0,30	7,05 \pm 0,42	6,60 \pm 0,43	6,87 \pm 0,38
PST ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	18,6 \pm 1,9	18,5 \pm 1,6 a	21,3 \pm 1,5 a	28,5 \pm 2,9 b
AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	276,03 \pm 16,17	287,22 \pm 11,30 c	207,60 \pm 7,97 a	241,79 \pm 5,69 b
	BR-05			
	Día 0	Día 35		
	C	C	B	A
Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	57,69 \pm 5,31	36,21 \pm 2,41	47,07 \pm 1,89.	41,73 \pm 3,31
Chl <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	14,77 \pm 4,08	17,78 \pm 1,14	22,45 \pm 0,59	20,16 \pm 2,07
Chl <i>a+b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	74,28 \pm 8,17	54,35 \pm 6,06	70,92 \pm 6,43	63,57 \pm 5,32
X+C ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	18,80 \pm 2,76	9,34 \pm 0,89	12,15 \pm 1,02	10,77 \pm 0,94
Chl <i>a/ b</i>	5,53 \pm 1,64	2,04 \pm 0,06	2,10 \pm 0,05	2,11 \pm 0,11
Chl <i>a+b</i> / X+C	4,22 \pm 0,64	5,78 \pm 0,18	5,83 \pm 0,19	5,95 \pm 0,21
PST ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	20,1 \pm 1,5	18,2 \pm 1,6 a	24,2 \pm 1,6 b	22,9 \pm 1,5 b
AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)	262,53 \pm 11,99	234,01 \pm 8,87	222,39 \pm 5,58	230,88 \pm 8,46

En el día 35, el clon OC-61 mostró un incremento significativo del 70 % en q_P para el tratamiento AF en comparación con los tratamientos BF y C. En BR-05, se observó un incremento del 221 y 45 % en q_P para los tratamientos B y A, respectivamente, en comparación con el tratamiento C (Figura 6 D, I). Finalmente, en el día 35 no se observó cambios en q_N para los tratamientos AF y BF en comparación con el tratamiento C de los dos clones (Figura 6 E, J).

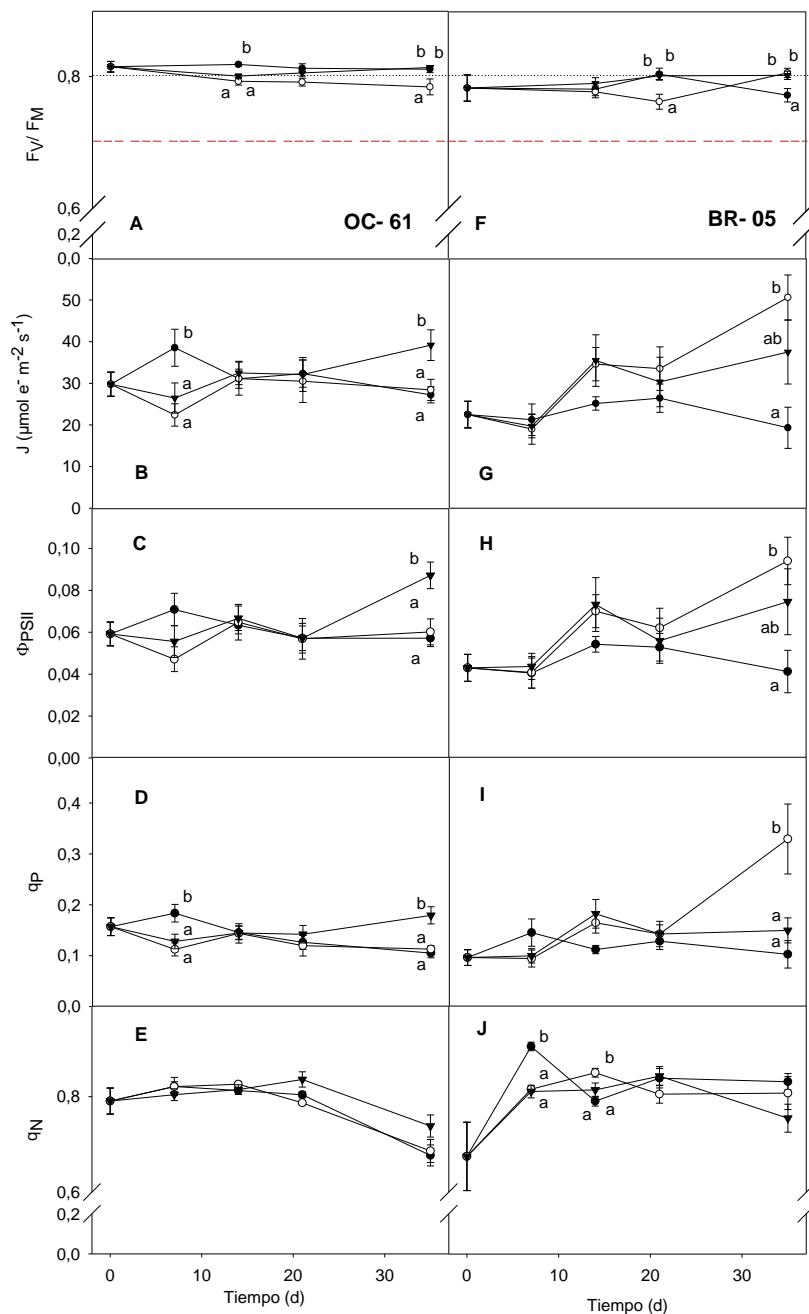


Figura 7. Cambio en el tiempo de los parámetros de la actividad fotoquímica del PSII a una densidad de flujo fotónico saturante ($1198 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los clones (OC-61 y BR-05) sometidos a los diferentes tratamientos, en: A-F, Eficiencia cuántica máxima; B-G, transporte total de electrones; C-H, eficiencia cuántica relativa; D-I, coeficiente de extinción fotoquímica; E-J, coeficiente de extinción no fotoquímica. Plantas control (●), baja frecuencia (○) y alta frecuencia (▼) de aspersión del NF- SiO₂. Los valores representados son los promedios \pm error estándar ($n = 7$). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía ($P < 0.05$) y una prueba post hoc de Duncan.

Contenido de agua foliar

En el clon BR-05, el CAF no varió significativamente entre los tratamientos, mientras que en el clon OC-61, se observó una reducción significativa en los tratamientos AF y BF en comparación con el tratamiento C, alcanzándose el menor CAF en el tratamiento AF (Figura 8).

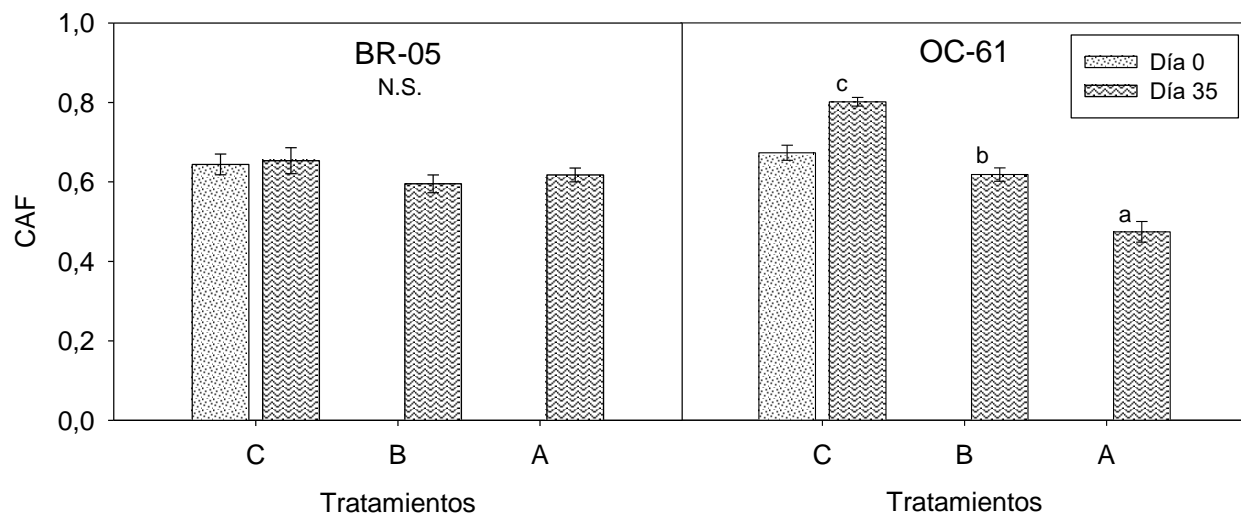


Figura 8. Cambio en el tiempo del contenido de agua foliar en los clones BR- 05 y OC-61 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A) del NF- SiO₂, antes aplicar los tratamientos (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios \pm error estándar ($n = 7$). Las letras indican diferencias significativas y no significativas (N. S.) obtenidas entre los tratamientos a través de un ANOVA de una vía ($P < 0.05$) y una prueba post hoc de Duncan.

Concentración de nutrientes

En la Figura 9, se muestra la concentración foliar de N, P, K, Mg y Ca obtenidos en los clones de cacao OC-61 y BR- 05 con los tratamientos control (C), baja frecuencia (BF) y alta frecuencia (AF) de aspersión del NF- SiO₂ en el día 0 y en el día 35. Para OC-61, se obtuvo un incremento significativo de 30 y 31 % en la concentración de N para los tratamientos BF y AF respectivamente, y de 26 % en la concentración de P para el tratamiento AF en comparación con el C en el día 35. Para BR-05, se obtuvo un incremento significativo de 22 % y, no significativo,

de 10 % en la concentración de N para los tratamientos BF y AF respectivamente, y de 38 y 23 % en la concentración de K para los tratamientos BF y AF respectivamente en comparación con el C en el día 35. En cuanto a los demás elementos en las hojas de ambos clones, se observó el mismo patrón de incremento entre los tratamientos con NF en comparación con el C, sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

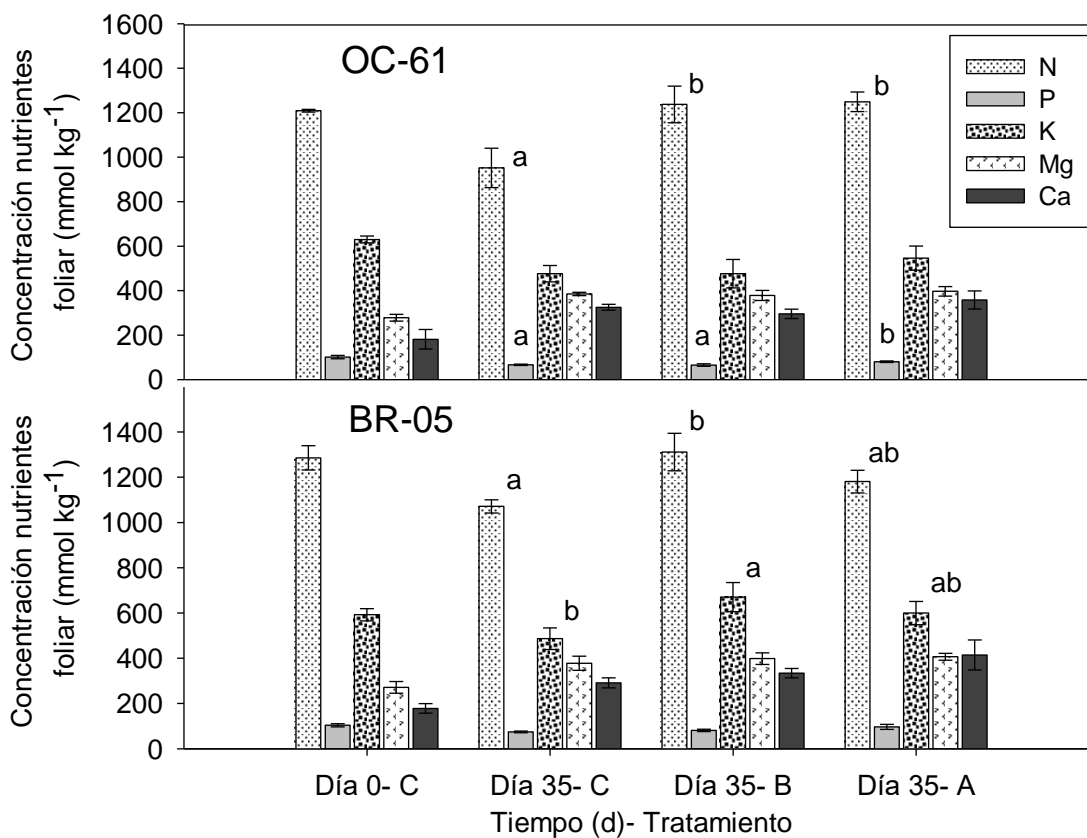


Figura 9. Cambio en el tiempo de la concentración de nutrientes en hojas de los clones de cacao OC-61 y BR-05 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A) antes de la aspersión (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios \pm error estándar ($n = 7$ por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas y no significativas obtenidas entre los tratamientos en el día 35 a través de un ANOVA de una vía ($P < 0.05$) y una prueba post hoc de Duncan.

Para OC-61, se obtuvo diferencias en la concentración de Ca en el suelo entre los tratamientos BF y AF de aspersión de NF- SiO₂. Para BR- 05, se obtuvo un resultado similar al de OC-61 con la concentración de P; también, se obtuvo una reducción significativa en la concentración de K del tratamiento AF en comparación con C (Figura 10).

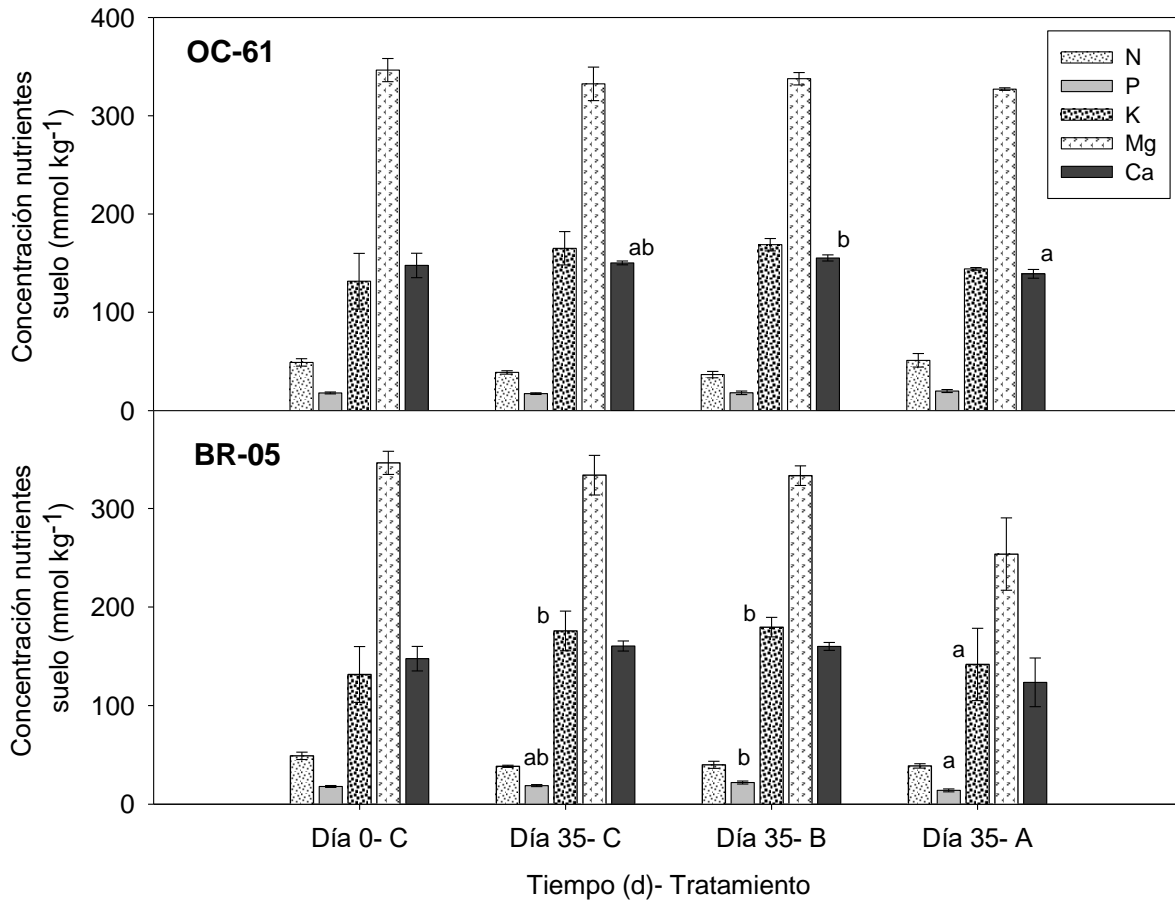


Figura 10. Cambio en el tiempo de la concentración de nutrientes en suelos de los clones BR- 05 y OC-61 sometidos a los tratamientos control (C), baja frecuencia (B) y alta frecuencia de aspersión (A), antes de la aspersión (día 0) y a los 35 días de tratamiento. Los valores representados son los promedios \pm error estándar ($n = 3$ por tratamiento). Las letras indican diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos en el día 35 a través de un ANOVA de una vía ($P < 0.05$) y una prueba post hoc de Duncan.

DISCUSIÓN

La fertilización foliar con el nanofertilizante de SiO₂ (NF- SiO₂) fue beneficioso para los clones de cacao Criollo estudiados. Principalmente, el NF- SiO₂ generó efectos positivos en los aspectos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis en ambos clones de cacao; producto de un incremento en la concentración foliar de nutrientes, tales como N y P, del contenido de PST y del efecto beneficioso del Si sobre las plantas, traduciéndose en una mejora en la capacidad fotosintética de esta especie (aumentos significativos en A, J, Φ_{PSII} , q_p); simultáneamente, la aspersión del NF- SiO₂ ocasionó un aumento en la EUA como resultado de la reducción de g_s y E, a pesar que los pigmentos fotosintéticos no fueron afectados. El incremento significativo en A y en la concentración de nutrientes foliares se tradujo en un mayor diámetro de la rama principal del injerto; sugiriendo que las plantas podrían ser más vigorosas para el momento de ser trasplantadas en el campo. Por lo tanto, los NF de SiO₂ pueden ser agroinsumos atractivos para los agricultores y productores nacionales, ya que podrían aplicarse como un complemento para estimular el aparato fotosintético, el crecimiento y la resistencia de las plantas contra el déficit hídrico, durante su etapa más importante de desarrollo. Es importante resaltar, que la respuesta fisiológica ante la aspersión con NF-SiO₂ fue diferente entre los clones, siendo el clon BR-05 el que tuvo un mejor desempeño fisiológico, dado los altos porcentajes de incrementos en muchas de las variables estudiadas.

Intercambio gaseoso

Los valores de A promedio obtenidas concuerdan con las reportadas previamente en diferentes variedades y/o clones de cacao (A entre los 0,5 y 7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Miyaji y col., 1997; Daymond y col., 2011; Araque y col., 2012; Bertolde y col., 2012; Almeida y col., 2014; Ávila-Lovera y col., 2016; Tezara y col., 2016; De Almeida y col., 2018). En los clones OC-61 y BR-05, se obtuvo una mejora considerable de la capacidad fotosintética ante la aspersión foliar del NF

de SiO₂ en comparación con el tratamiento C a partir del día 14, alcanzándose mayor A en el tratamiento AF y, consecutivamente, en el tratamiento BF. Los resultados de A coinciden con las concentraciones foliares de N y P de los clones OC-61 y BR-05 para el día 35, donde también se observa un incremento de las concentraciones en el tratamiento BF y AF. Estos resultados podrían deberse principalmente al suministro constante de nutrientes a las plantas, necesarios para suplir todos los requerimientos de las funciones esenciales y específicas del metabolismo durante su desarrollo (Schwambach y col., 2005; Latsague y col. 2014; Gattward y col., 2012). Nutrientes esenciales, como el N, son requeridos durante el proceso de fotosíntesis, debido a que son unos de los principales bioelementos indispensables para la síntesis de macromoléculas orgánicas (ácidos nucleicos) y en la bioquímica de muchos compuestos no proteicos como las coenzimas, los pigmentos fotosintéticos, los metabolitos secundarios y las poliaminas (Maathuis, 2009); el P es un componente indispensable de los ácidos nucleicos, ya que los nucleótidos trifosfato forman la “columna vertebral” del ADN y el ARN y está presente en todos los productos intermediarios del ciclo de Calvin. Una deficiencia de N y/o P generaría una reducción de la fotosíntesis debido a la escasez de proteínas y pigmentos, de ATP y de fosfatos de azúcar que se involucran en diferentes pasos intermedios durante la fijación de CO₂ (Maathuis, 2009).

Entre los parámetros alométricos que fueron considerados durante el ensayo, únicamente se observó un incremento significativo en el d_{inj} del clon OC-61. Se ha reportado que la acumulación de Si conduce a la rigidez, puede facilitar la erección de las hojas y, por lo tanto, aumentar la intercepción de la luz, por lo que podría contribuir en el incremento de la capacidad fotosintética y de fotoasimilación, crecimiento de la planta y, en última instancia, podría mejorar su rendimiento (Saud y col., 2014). Estos resultados se han reportado en diferentes especies, como *Solanum lycopersicum*, *Triticum spp* y *Lupinus albus* ante la aplicación de NP de SiO₂ sin

formulación de fertilizante (Haghighi y Pessaraki, 2013; Sun y col., 2016; Raliya y col., 2017), y se observó un incremento en el peso seco de las plantas de tomate, un incremento en tejidos de raíz y brotes de 51 y 26%, respectivamente para *Triticum spp* y *Lupinus albus*; también, en *Poa pratensis* ante la aplicación de Si (Saud y col., 2014); en ensayos de fertilización de Si en suelos de arroz enriquecidos y con deficiencias de Si (Sun y col., 2019), demostraron que la irrigación de Si podría promover el contenido de fitolitos (derivados de la biomineralización del Si), el incremento de la biomasa y mejorar el contenido de fitolitos de las plantas de arroz, a pesar que, en suelos enriquecidos el exceso de Si puede generar una reducción en la biomasa. Finalmente, en dos variedades de cacao, reportaron la mejora de parámetros alométricos, como la circunferencia del tallo y el peso de los brotes y raíces, en respuesta al aumento de la concentración de N en el suelo (Ribeiro y col., 2008); también, observaron un incremento en la concentración de N en las raíces y en los brotes, traduciéndose en una disminución en la eficiencia del uso de N ($EUN = \text{g de materia seca mg}^{-1} \text{ N}$) a medida que aumentaba la concentración. En este trabajo, también se obtuvo una reducción en la EUN foliar a los 35 días en los tratamientos que comprendían la aspersión de NF- SiO_2 en comparación con el control para OC- 61 ($0,078 \text{ g mg}^{-1} \text{ C}$; $0,059 \text{ g mg}^{-1} \text{ BF}$; $0,058 \text{ g mg}^{-1} \text{ AF}$) y BR-05 ($0,068 \text{ g mg}^{-1} \text{ C}$; $0,055 \text{ g mg}^{-1} \text{ BF}$).

Simultáneamente, para ambos clones se obtuvo una reducción de g_s en el día 35 ante la aspersión foliar del NF en comparación con el tratamiento C. Los cambios en g_s se relacionan con el control de la pérdida de agua y la asimilación de CO_2 a través de E, por lo tanto, la reducción de la g_s se traduciría en una disminución en la E, evitando consigo la pérdida de agua durante el intercambio gaseoso (Tognetti y col., 1998). Se ha reportado la reducción de la g_s y E en plantas de cacao sometidas a estrés por déficit hídrico ante la aspersión foliar de SiO_2 no nanoestructurado (Zanetti y col., 2016), sin embargo, no observó una mejora de la capacidad fotosintética en una

semana de experimentación. En plantas de pera silvestre, reportaron una reducción significativa de E ante la irrigación de NP- SiO₂ (Zarafshar y col., 2015). Las células vegetales presentan proteínas transportadoras de Si, por lo que su captación y retraslado podría ser activa o pasiva a lo largo del vástago de la planta (Ma y col., 2008; Ahmed y col, 2015). Esto contribuye a la mitigación de los efectos del estrés abiótico a nivel fisiológico, como el déficit hídrico y la disponibilidad de nutrientes, a través del aumento de la captación de agua a través de las raíces, manteniendo el balance de nutrientes, reduciendo la pérdida de agua por transpiración y promoviendo la tasa de fotosíntesis (Zhu y Gong, 2014). Se ha reportado que se genera una deposición de cristales de Si en las células epidérmicas formando una barrera que puede reducir la pérdida de agua a través de la cutícula (Trenholm y col., 2004); también que, mecánicamente, las NP SiO₂ forman una bicapa en la pared celular que contribuye con la estabilización y el mantenimiento estructural de la membrana plasmática vegetal, lo que reduce la pérdida de sólidos solubles y contribuye al ajuste osmótico (Bao-shan y col., 2004; Ming y col., 2012). Por lo tanto, parte del incremento de la A y de la EUA observada en los clones estudiados, también podría deberse a los efectos beneficiosos de la acumulación de Si y de NP SiO₂ en los tejidos vegetales.

En cuanto a la EUA, se obtuvo la mejora considerable en ambos clones ante la aspersión foliar del NF de SiO₂ en comparación con el tratamiento C en el día 35, siendo en mayor magnitud en el clon BR-05 en comparación con el clon OC-61, que parece responder mejor ante la aplicación del NF. La mejora en el balance de CO₂ y en la pérdida de agua se traduce en un incremento de la EUA, por lo que ambos clones podrían ser más eficientes en el uso de agua durante el intercambio gaseoso cuando se les aplica el NF. Por lo tanto, las NP de SiO₂ podrían promover una mayor resistencia a la pérdida de agua durante los períodos secos (Ahmed y col, 2015; Zarafshar y col., 2015; Raliya y col., 2017), aspecto de gran interés para el cacao, ya que es un cultivo perenne que

puede verse afectada su productividad a períodos breves sequía, por lo que se promueve la búsqueda de nuevas estrategias para superar esta limitación (Belsky y Siebert, 2003, Bae y col., 2009). Finalmente, se han reportado resultados similares en *S. lycopersicum* (Haghighi y Pessarakli, 2013), los cuales demuestran que la aplicación de NP- SiO₂ mejoró la capacidad fotosintética de plantas bajo estrés salino, y mejoró la EUA por la reducción significativa de g_s y de E.

Estas respuestas fisiológicas nos confirman que las NP comprendidas en un tamaño de 34 nm, sí pueden ser utilizadas como un medio de suministro y transporte de nutrientes en plantas de cacao. Posiblemente, la incorporación de las NP estuvo mediada por mecanismos de penetración cuticular como la ruta “polar” o “de los poros acuosos” (Schreiber, 2005; Schönherr, 2006; Schreiber y Schönherr, 2009), ya que el cacao es una planta con hojas hipoestomáticas (Hernández y col., 2017).

Contenido de pigmentos fotosintéticos y de proteínas solubles totales (PST)

Los valores obtenidos del contenido de clorofila y carotenoides totales para los clones OC-61 y BR-05 son similares a los reportados anteriormente en otras variedades de cacao (entre 30-112 µg cm⁻² de clorofila total y los 5- 18 µg cm⁻² de carotenoides; Bertolde y col., 2012; De Almeida y col., 2018). Sin embargo, no se obtuvo variaciones en sus concentraciones en ninguno de los clones para los diferentes tratamientos a lo largo del experimento. Esto probablemente se deba al posible requerimiento de macronutrientes en la síntesis de proteínas que intervienen directamente en el proceso fotosintético, así como es el caso de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO).

Se ha reportado que el contenido de Chl_a, Chl_b y X+ C puede aumentar en plantas fertilizadas con N, P y K, contribuyendo a un incremento en la tasa fotosintética (Poole y Conover, 1990; Schwambach y col., 2005; Latsague y col., 2014). En las especies *Triticum spp* y *Lupinus albus*, se ha reportado un incremento dramático en el contenido de pigmentos fotosintéticos y de PST por efecto de la irrigación de altas concentraciones NP de SiO₂ (entre 500- 2000 mg L⁻¹; Sun y col., 2016). Se ha propuesto que el Si tiene un papel importante en la síntesis de compuestos orgánicos intracelulares y en la manutención de las funciones bioquímicas normales (Matichenkov y col., 2008; Song y col., 2014; Li y col., 2015), enfatizando en que la aplicación de Si puede mejorar significativamente la expresión de genes como HemD y PsbY que están relacionados con la biosíntesis y degradación de la clorofila. Por lo tanto, se sugiere que la estimulación de la expresión de estos genes con la adición de Si, puede mejorar la actividad del PSII y la velocidad de transferencia de electrones, debido a un incremento en el contenido de clorofila (Song y col., 2014; Li y col., 2015). Finalmente, se ha propuesto que el contenido de pigmentos fotosintéticos puede ser un indicador de toxicidad por las NP (Rico y col., 2013), hipótesis que, se podría descartar ya que en este estudio no se observó un efecto negativo del NF sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos.

El contenido PST en hojas para los clones OC-61 y BR-05 fueron similares a los valores previamente reportados para diferentes clones Trinitarios del banco de germoplasma de Barlovento, en los cuales se alcanzan valores entre 1,64 y 8,84 mg g⁻¹ (Quiñones-Gálvez y col., 2015). El clon OC-61, presentó valores más altos de PST en comparación con BR-05, con valores entre 5,1 y 6,9 mg g⁻¹ y, para el clon BR-05, valores entre 4,3 y 5,4 mg g⁻¹. Las diferencias obtenidas entre los tratamientos que contemplaron la aplicación del NF (AF y BF) en comparación a los controles en ambos clones, señalan que el NF- SiO₂ tuvo un efecto positivo en la formación

de proteínas en los tejidos de las plantas de cacao estudiadas. La aplicación de macronutrientes esenciales, como N, P y K, pueden influir directamente sobre el contenido de carbohidratos solubles (glucosa), lo que se relaciona directamente con la síntesis de pigmentos y proteínas (Schwambach y col., 2005; Latsague y col. 2014).

En el clon OC-61, el contenido de PST obtenido es directamente proporcional a la disponibilidad de nutrientes, ya que se alcanza en el día 35 el mayor valor en el tratamiento AF y seguido de BF en comparación con C, aunque para BR-05, no se observó el mismo patrón. Este resultado concuerda con los obtenidos en intercambio gaseoso, ya que el contenido de PST puede correlacionarse con el incremento o la mejora de la capacidad fotosintética y de la actividad fotoquímica (Sun y col., 2016). Un incremento de A, requiere una mayor concentración de RuBisCO, entre otras enzimas del ciclo de Calvin, por lo tanto, estos resultados indican que no hubo una limitación de la fotosíntesis por parte de la enzima, la cual representa el 40% del contenido de PST. Estos resultados coinciden con la concentración foliar de N obtenidas para el clon OC-61 y el clon BR-05 con los tratamientos de aspersión del NF, ya que aproximadamente un 50% del N foliar se encuentra invertido en RuBisCO (Spreitzer y col., 2002).

Actividad Fotoquímica del PSII

Los valores de F_v/F_m y Φ_{PSII} obtenidos concuerdan con los reportados previamente en diferentes estudios ecofisiológicos con diferentes variedades de cacao (Ávila-Lovera y col., 2016; Tezara y col., 2016; De Almeida y col., 2018). A lo largo del experimento, los clones OC- 61 y BR- 05 mostraron valores de F_v/F_m entre los 0,80 y 0,75 respectivamente, indicando, que no se observaron daños en el aparato fotoquímico, indicio de que las plantas se encontraron sanas (Maxwell y Johnson, 2000), y que no fueron sometidas a ningún tipo de estrés durante la aplicación de los tratamientos de NF.

Para los clones OC- 61 y BR- 05, debido al incremento de J , Φ_{PSII} y q_P sin variaciones de q_N se obtuvo la mejora parcial de la actividad fotoquímica en el día 35 en los tratamientos con aspersión del NF-SiO₂. Se ha reportado que el Si puede mejorar la eficiencia fotoquímica en una diversidad de especies sujetas a déficit hídrico (Xu y Xu, 2005; Chen y col., 2011), debido a que la emisión de fluorescencia de la Chl _a depende de las estructuras de la membrana, como los tilacoides, que permiten un anclaje más estable de los pigmentos fotosintéticos, cuanto mayor es la estructura de los tilacoides, mejor será la estabilización de los fotosistemas en la estructura membranosa de los cloroplastos (Zanetti y col., 2016). Por lo tanto, la aplicación de NF- SiO₂ en plantas de cacao pudo haber generado una disminución en la emisión de fluorescencia por una mejor estabilización de los fotosistemas en la estructura membranosa de los cloroplastos, traduciéndose una mayor actividad fotoquímica. Se ha reportado, en plantas de cacao sometidas a déficit hídrico ante la aspersión foliar de SiO₂ no nanoestructurado (Zanetti y col., 2016), mejoras en la eficiencia fotoquímica mediante el incremento en la densidad de centros de reacción activos del PSII y del índice de rendimiento para la conservación de energía hasta la reducción del aceptor final de PSI.

Contenido de agua foliar (CAF)

No se encontraron trabajos que evalúen el CAF ante la aspersión foliar de Si o de NP de SiO₂, sin embargo, se ha reportado la reducción del potencial hídrico en hojas de cacao a dosis altas de SiO₂ no nanoestructurado (Zanetti y col., 2016), debido al posible incremento de la concentración interna de solutos y la rigidez de la pared celular promovida por la aplicación foliar de Si. Esto genera efectos positivos sobre el déficit hídrico en una gran variedad de cultivos, lo que podría explicar la reducción significativa del CAF entre los tratamientos, alcanzándose el menor valor con el tratamiento AF.

Concentración de nutrientes

Los valores obtenidos de la concentración foliar de N, P, K, Mg y Ca para los clones de cacao OC- 61 y BR- 05 coinciden con algunas de las propuestas de diagnóstico nutricional para diferentes clones de cacao (entre los 16,1- 21,9 g kg⁻¹ N; 0,9- 2,2 g kg⁻¹ P; 3,8- 20,0 g kg⁻¹ K; 4,4- 9,0 g kg⁻¹ Mg; 8,3- 24,5 g kg⁻¹ Ca; Abreu-Junior, 1996; Malavolta y col., 1997; Sodré, 2002; Puentes-Páramo y col., 2016). En comparación con los reportes más recientes de diagnóstico nutricional de las hojas (Puentes-Páramo y col., 2016), para el clon OC- 61 y BR- 05 se obtuvieron valores más altos de P (2,0- 3,1 g kg⁻¹ OC-61; 2,3- 3,2 g kg⁻¹ BR- 05), K (18,6- 24,6 g kg⁻¹ OC- 61; 19,0- 26,2 g kg⁻¹ BR- 05) y valores más bajos de Ca (7,3- 14,4 g kg⁻¹ OC-61; 7,6- 16,6 g kg⁻¹ BR- 05), sin embargo, al compararse estos resultados con los clones estudiados, éstos son muy similares entre sí. Las diferencias pueden deberse principalmente al tipo de sustrato, edad de la planta, edad foliar, duración del experimento y a la exigencia nutricional específica para cada clon (Puentes- Páramo y col., 2016).

Para el clon OC-61, se obtuvo un incremento significativo en la concentración foliar de N para los tratamientos BF y AF en comparación con C; también en la concentración de P para el tratamiento AF. El clon BR-05, se observó un incremento significativo en la concentración foliar de N y K para el tratamiento BF. Este incremento probablemente se deba a la fuente de incorporación externa de nutrientes (aspersión del NF), ya que las muestras de sus respectivos suelos presentaron concentraciones de N y P muy bajas; en el caso del K para el clon BR-05, puede deberse a la aplicación de NF y, a su vez, a la incorporación constante de K a través del riego, además hay que considerar que el agua del riego presentó altas concentraciones de K, Mg y Ca. Por lo tanto, no se observa una disminución entre la concentración del suelo de BF en comparación con el suelo C.

Se ha reportado, que las concentraciones críticas en el suelo para plantas de cacao están por debajo de los 42,8 mmol kg⁻¹ N, 0,3 mmol kg⁻¹ P, 0,3 mmol kg⁻¹ K, 8 mmol kg⁻¹ Mg, 22,5 mmol kg⁻¹ Ca (Egbe y col., 1989; Aikpokpodion y col., 2010), por lo tanto, la concentración de nutrientes (P, K, Mg y Ca) obtenidas en los suelos del día 0 y día 35 para ambos clones fue adecuada para las plantas, con excepción con la concentración de N en el día 35 para los tratamientos C y BF (38,8 mmol kg⁻¹ C; 36,6 mmol kg⁻¹ BF) del clon OC-61 y los tratamientos C, BF y AF (38,4 mmol kg⁻¹ C; 39,9 mmol kg⁻¹ BF; 38,7 mmol kg⁻¹ AF) del clon BR-05. Sin embargo, esta deficiencia de N sólo afectó la fisiología de los tratamientos C en comparación con los tratamientos que contemplaban la aspersión de NF- SiO₂.

CONCLUSIONES

La aspersión foliar del NF de SiO₂:

- Mejora la capacidad fotosintética y la eficiencia de uso de agua de los clones OC-61 y BR-05 mediante la reducción de la conductancia estomática y, consecutivamente, de las tasas de transpiración.
- No afectó el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides totales) de los clones OC-61 y BR-05.
- Promueve la síntesis de proteínas solubles totales en los clones OC-61 y BR-05.
- Mejora la actividad fotoquímica del PSII de los clones OC-61 y BR-05, mediante el incremento de la tasa de transporte de electrones, eficiencia cuántica relativa y del coeficiente de extinción fotoquímica.
- Redujo el contenido de agua foliar en el clon OC- 61, alcanzando el menor valor con el tratamiento de alta frecuencia de aspersión.
- Incrementó la concentración foliar de N y P en el clon OC-61, y de N y K en el clon BR-05.

Recomendaciones:

- Realizar experimentos con plantas madre o plantas adultas en campo (*in situ*).
- Realizar experimentos similares cuyo medio de aplicación del NF- SiO₂ sea por irrigación con 4 controles diferentes: 1. Suelo sin ningún tratamiento. 2. Con solución nutritiva (Hoagland). 3. Con NP- SiO₂ (sin fórmula fertilizante). 3. Con NF- SiO₂.

- Incrementar el esfuerzo muestral para la determinación de los parámetros alométricos.
- Considerar las metodologías para la determinación de la concentración de Si o SiO₂ en los tejidos vegetales en diferentes estados de desarrollo.
- Alargar el tiempo de experimento para evaluar el comportamiento de las variables fisiológicas y de la concentración de nutrientes foliares y del suelo en períodos prolongados de tiempo.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en la finca “Las Bromelias”, por parte del Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela y en el Laboratorio de Ecofisiología Vegetal del Centro de Ecología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), que en conjunto con el financiamiento otorgado por la Fundación Empresas Polar y la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT), se contó con todos los equipos, reactivos, transporte y viáticos para la culminación del trabajo.

El Nanofertilizante de SiO₂ fueron producidas por el Dr. Jimmy Castillo de la Universidad Central de Venezuela, con el financiamiento de la compañía WP Agropecuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Junior, C. H. (1996) Foliar nutrient concentration and ratios in height yield cocoa genotypes and relations yield and intensity of witches broom disease. International Conference on Cacao Research. Cocoa Producer's Alliance. CEPLAC/ CEPEC. Atas, Lagos, NGR, pp: 773-780.
- Ahmed, M., Qadeer, U., Ahmed, Z. I., Hassan, F. (2015) Improvement of wheat (*Triticum aestivum*) drought tolerance by seed priming with silicon. *Arch. Agronom. Soil Sci.* **62**: 299- 315.
- Aikpokpodion, P. E. (2010) Nutrients dynamics in cocoa soils, leaf and beans in Ondo State, Nigeria, *J. Agric. Sci.*, **1**: 1-9.
- Almeida, A.-A. F., Gomes, F. P., Araujo, R. P., Santos, R. C., Valle, R. R. (2014). Leaf gas exchange in species of the *Theobroma* genus. *Photosynthetica* **52**:16– 21.
- Araque, O., Jaimez, R. E., 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. *Expl. Agr.* **48**: 513 – 522.
- Ávila-Lovera, E., Coronel, I., Jaimez, R., Urich, R., Pereyra, G., Araque, O., Chacón, I., Tezara, W. (2016) Ecophysiological traits of adult trees of Criollo cacao cultivars (*Theobroma Cacao L.*) from a germplasm bank in Venezuela. *Expl. Agric.* **52** (1); 137–153.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., Bailey, B. A. (2009) The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* **60**: 3279–3295.
- Baligar, V.C., Bunce, J.A., Machado, R.C.R., Elson, M.K. (2008) Photosynthetic photon flux density carbon, dioxide concentration and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. *Photosynthetica* **46**:216 – 221.
- Bao-shan, L., Shao-qi, D., Chun-hui, L., Li-jun Fang, Shu-chun, Q., Min, Y. (2004) Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *J. Forestry Res.* **15**:138 –140.
- Belsky, J. M., Siebert, S. F. (2003) Cultivating cacao: implications of sun-grown cacao on local food security and environmental sustainability. *Agric. Hum. Val.* **20**: 277– 285.
- Bertolde, F. Z., Almeida, A. F., Pirovani, C. V., Gomes, F. P., Ahnert, D., Baligar, V. C., Valle, R. R. (2012) Physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to flooding. *Photosynthetica* **50** (3): 447-457.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bruinsma, J. (1963) The quantitative analysis of Chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem.Photobiol.* **2**:241 – 249.
- Cheesman, E.E. (1944) Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Trop. Agr.* **21**:144 – 159.
- Chen, W., Yao, X., Cai, K., Chen, J. (2011) Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. *Biol. Trace Elem. Res.* **142**: 67- 76.
- Daymond, A., Tricker, P., Hadley, P. (2011) Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. *Biol. Plantarum* **55**:99– 104.

- De Almeida, J., Ávila-Lovera, E., Jaimez, R. E., Araque, O., Móvil, O., González, R., Tezara, W. (2017) Características fotosintéticas de cuatro clones de cacao en un sistema agroforestal en Barlovento, Edo. Miranda. *Inves. Sab.* **3**(3): 3–21
- De Almeida, J., Herrera, A., Tezara, W. (2018) Phenotypic plasticity to photon flux density of physiological, anatomical and growth traits in a modern Criollo cocoa clone. *Physiol. Plant.* doi:10.1111/ppl.12840
- DeRosa, M. C., Monreal, C. M., Sultan, Y., Schnitzer, M., Walsh, R. (2010) Nanotechnology in fertilizers. *Nat. Nanotechnol.* **5**(2): 91.
- Egbe, N. E., Ayodele, E. A., Obatolu, C. R. (1989) Soils and nutrition of cacao, coffee, kola, cashew and tea. *Progress in Tree Crop Research*, CRIN Ibadan, pp: 28-38.
- Eichert, T., Burkhardt, J. (2001) Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot.* **52**:771 – 781.
- Eichert, T., Fernandez, V. (2011) Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts. *Marschners' mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, Oxford, pp 71-84.
- Eichert, T., Goldbach, H. E. (2008) Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.* **132**:491 – 502.
- Environmental Protection Agency (2007) Nanotechnology White Paper. (Washington, DC: EPA). EPA 100/B-07/001.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) FAOSTAT of crop statistics. Official page of the FAO. Last update May 28, 2018.
- Fedorenko, V. F., Buklagin, D. S., Golubev, I. G., Nemenushchaya, L. A. (2015) Review of Russian nanoagents for crops treatment. *Nanotechnol. Russ.* **10**: 318 – 324.
- Fernández, V., Brown, P. H. (2013) From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Front. Plant Sci.* **4**: 289.
- Fernández, V., Eichert, T. (2009) Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **28**: 36- 68.
- Fernández, V., Guzmán, P., Peirce, C. A. E., McBeath, T. M., Khayet, M., McLaughlin, M. J. (2014a) Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar applied phosphorus. *Plant and Soil* **384**: 7 – 20.
- Fernández, V., Sancho-Knapik, D., Guzmán, P., Peguero-Pina, J. J., Gil, L., Karabourniotis, G., Khayet, M., Fasseas, C., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., Gil-Pelegrín, E. (2014b) Wettability, polarity and water absorption of *Quercus ilex* leaves: effect of leaf side and age. *Plant. Physiol.* **166**: 168 – 180.
- Fernández, V., Sotiropoulos, T., Brown, P. H. (2015) Fertilización foliar: principios científicos y práctica de campo. International Fertilizer Industry Association. Primera edición, pp 13-31.
- Gattward, J. N., Almeida, A.-A. F., Souza, J. O., Gomes, F. P., Kronzucker, H. J. (2012) Sodium-potassium synergism in *Theobroma cacao*: stimulation of photosynthesis, water-use efficiency and mineral nutrition. *Physiol. Plant.* **146**(3): 350–362.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of Chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990** (1): 87–92.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., Toulmin, C. (2010) Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**: 812 – 818.

- Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T. D. (2012) Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications, and research priorities. *J. Agric. Food Chem.* **60**: 9781 – 9792.
- Golbashy, M., Sabahi, H., Allahdadi, I., Nazokdast, H., Hosseini, M. (2016) Synthesis of highly intercalated urea-clay nanocomposite via domestic montmorillonite as eco-friendly slow-release fertilizer *Arch. Agron. Soil Sci.* **63**: 84- 95.
- Guzmán, P., Fernández, V., García, M. L., Khayet, M., Fernández, A., Gil, L. (2014 a) Localization of polysaccharides in isolated and intact cuticles of eucalypt, poplar and pear leaves by enzyme-gold labelling. *Plant. Physiol. Biochem.* **76**:1 – 6.
- Guzmán, P., Fernández, V., Graça, J., Cabral, V., Kayali, N., Khayet, M., Gil, L. (2014 b) Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: a lipidized cell wall region. *Front. Plant Sci.* **5**: 481.
- Haghighi, M., Pessaraki, M. (2013) Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Sci. Hortic.* **161**: 111 – 117.
- Hasaneen, M. N. A., Abdel-Aziz, H. M. M., El-Bialy, D. M. A., Omer, A. M. (2015) Preparation of chitosan nanoparticles for loading with NPK fertilizer. *African J. Biotechnol.* **13** (31): 3158-3164.
- Heredia, A. (2003) Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Bioch. Bioph. Acta* **1620**:1 – 7.
- Hernández, C.E., Leiva, R., Ramírez, R (2017) Dinámica estomática en cacao (*Theobroma cacao* L.). *International Symposium on Cocoa Research (ISCR)*, Lima, Peru, pp 13 –17.
- ICCO: The International Cocoa Organization (2018) Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLIV, No. 2, Cocoa year 2017/18.
- Jackson, M.L. (1968) Análisis químico de suelos. Ed. Omega, S. A., Barcelona, pp 662.
- Jaimez, R. E., Tezara, W., Coronel, I., Urich, R. (2008) Ecophysiology of cocoa (*Theobroma cacao* L.): its management in agro forestry system. Suggestions for improvement in Venezuela. *Rev. For. Ven.* **35** (2): 253 – 258.
- Kashyap, P. L., Xiang, X., Heiden, P. (2015) Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *Int. J. Biol. Macromol.* **77**:36-51.
- Khayet, M., Fernández, V. (2012) Estimation of the solubility parameter of model plant surfaces and agrochemicals: a valuable tool for understanding plant surface interactions. *Theor. Biol. Med. Model.* **9**: 1- 22.
- Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., Schuster, E.W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protect.* **35**: 64 – 70.
- Krall, J. P., Edwards, G. E. (1992) Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Physiol. Plant.* **86**: 180 – 187.
- Latsague, M., Sáez, P., Mora, M. (2014) Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook.f. *Gayana bot.* **71** (1): 37-42.
- Li, P., Song, A., Li, Z. J., Fan, F. L., Liang, Y. C., (2015) Silicon ameliorates manganese toxicity by regulating both physiological processes and expression of genes associated with photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* **397**: 289-301.
- Ma, J. F., Yamaji, N. (2008) Functions and transport of silicon in plants. *Cel. Molec. Life Sci.* **65**(19): 3049– 3057.

- Maathuis, F. J. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**(3): 250– 258.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., De Oliveira, S. A. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e aplicações. 2a edição. Piracicaba. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, pp: 319.
- Matichenkov, V. V., Bocharnikova, E. A., Kosobryukhov, A. A., Biel, K. Y., (2008) Mobile forms of silicon in plants. *Dokl. Biol. Sci.* **418**: 39-40.
- Maxwell, K., Johnson, G. (2000) Chlorophyll fluorescence a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**: 659–668.
- Meléndez, G., Molina, E. (2002) Memoria: Fertilización foliar de cultivos agrícolas: principios y aplicaciones. Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Laboratorio de Suelos y Foliaves, pp: 15- 84.
- Ming, D. F., Pei, Z. F., Naeem, M. S., Gong, H. J., Zhou, W. J., (2012) Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stresses in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *J. Agron. Crop Sci.* **198**: 14- 26.
- Miyaji, K. I., Silva, W. S., Alvim, P. T. (1997) Longevity of leaves of a tropical tree, *Theobroma cacao*, grown under shading, in relation to position within the canopy and time of emergence. *New Phytologist.* **135**:445– 454.
- Monreal, C. M., DeRosa, M., Mallubhotla, S. C., Bindraban, P. S., Dimkpa, C. (2015) Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. *Biol. Fertil Soils* **52**: 423 – 437.
- Morales-Díaz, A. B., Ortega-Ortíz, H., Juárez-Maldonado, A., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A. (2017) Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* **8**: 1 – 13.
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., Wallace, J., Loor, R., Kuhn, D., Steven, J., Schnell, R. (2008) Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One* **3**: 1 – 8.
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz C. F., Moreno, A., Lanaud, C. (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* **89**, 380–386.
- Mukhopadhyay, S. S. (2014) Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **7**: 63 – 71.
- Murphy, J., Riley, J. P. (1962) A modified single method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Act.* **27**: 31– 36.
- Pereira, G., Villalobos, V., Rondón, O., Chacón, I., Jaimez, R., Tezara, W. (2007) Intercambio gaseoso en diferentes cultivares de cacao. XVII Congreso de Botánica de Venezuela. Maracaibo, Venezuela, pp: 669-672.
- Poole, R., Conover, C. (1990) Leach an electrical conductivity and pH for ten foliage plants. *J. Environ. Hortic.* **8**: 166- 172.
- Puentes-Páramo, Y. J., Menjivar-Flores, J. C., Aranzazu-Hernández, F. (2016) Concentración de nutrientes en hojas, una herramienta para el diagnóstico nutricional en Cacao. *Agron. Mesoam.* **27**(2): 329- 336.
- Quiñones-Gálvez, Q., Sosa, D., Demey, J. R., Aleman, S., Sosa, M., Parra, D., Móvil, O., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y., Hernández, M., Infante, D. (2015). Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **17** (2): 33- 43.

- Quintero, R., Maria, L., García, L., Ligia, N. (2010) La producción de cacao en Venezuela: Hacia una nueva ruralidad. *Act. Cont. FACES* Año 13. **20**: 114 –123.
- Raliya, R., Saharan, V., Dimkpa, C., Biswas, P. (2017) Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: Current state and future perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **66** (26): 6487–6503.
- Ram, P., Kumar, R., Rawat, A., Pandey, P. Singh, V. P. (2018) Nanomaterials for efficient plant nutrition. *Int. J. Chem. Stud.* **6**(3): 867 – 871.
- Ribeiro, M. A. Q., Da Silva, J. O., Aitken, W. M., Machado, R. C. R., Baligar, V. C. (2008) Nitrogen use efficiency in cacao genotypes. *J. Plant Nutr.* **31**: 239- 249.
- Rico, C. M., Hong, J., Morales, M. I., Zhao, L. J., Barrios, A.C., Zhang, J. Y., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. R., (2013) Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environ. Sci. Technol.* **47** (11): 5635- 5642.
- Riederer, M., Friedmann, A. (2006) Transport of lipophilic non-electrolytes across the cuticle. *Biol. Plant Cu.* **23**: 250 – 279.
- Riederer, M., L. Schreiber, L. (2001) Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* **52**: 2023 – 2032.
- Rojas- López, J. (2012) La Producción de cacao en la Venezuela de la segunda mitad del siglo XVIII: ¿grandes o modestas plantaciones? *Der. Ref. Agr., Amb. Soc.* **38**: 89 – 109.
- Saud, S., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., Fahad, S., Hussain, S., Sadiq, A., Chen, Y. (2014) Silicon application increases drought tolerance of kentucky bluegrass by improving plant water relations and morphophysiological functions. *The Sci World J*, pp: 1-10.
- Schönherr, J. (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* **57**: 2471 – 2491.
- Schreiber, L. (2005) Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis. *Annals. Bot.* **95**: 1069 – 1073.
- Schreiber, L., Schönherr, J. (2009) Water and solute permeability of plant cuticles: Measurement and data analysis. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany*, pp: 1 – 28.
- Schwambach, J., Fadanelli, C., Fett-Neto, A.G. (2005) Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.* **25**(4): 487- 494.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. (2014) Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds mill.). *Saudi J. Biol. Sci.* **21**: 13 – 17.
- Sodré, G. A. (2002) Uso do desvio padrão para estimativa do tamanho de amostra de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) em estudos de nutrição. *Agrotrópica* **13**: 145- 150.
- Song, A., Li, P., Fan, F. L., Li, Z. J., Liang, Y. C., (2014) The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high zinc stress. *PLoS ONE* **9** (11), e113782.
- Spreitzer, R. J., Salvucci, M. E. (2002) RuBisCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 449-475.
- Sun, D., Hussain, H. I., Yi, Z., Rookes, J. E., Kong, L., Cahill, D. M. (2016) Mesoporous silica nanoparticles enhance seedling growth and photosynthesis in wheat and lupin. *Chemosphere* **152**: 81 – 91.
- Sun, X., Liu, Q., Tang, T., Chen, X., Luo, X. (2019) Silicon fertilizer application promotes phytolith accumulation in rice plants. *Front. Plant Sci.* **10**: 425.

- Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R., Coronel, I., Araque, O., Azocar, C., Chacón, I. (2016) Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as Forastero? *Bot. Sci.* **94**(3): 563– 574.
- Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A. (1998) Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Env.* **21**: 613- 622.
- Trenholm, L. E., Datnoff, L. E., Nagata, R. T. (2004) Influence of silicon on drought and shade tolerance of st. augustinegrass. *HortTechnology* **14**: 487- 490.
- Tyree, M. T., Wescott, C. R., Tabor, C. A., Morse, A. D. (1992) Diffusion and electric mobility of KCl within isolated cuticles of *Citrus aurantium*. *J. Plant Physiol.* **99**:1057 – 1061.
- Wellburn, A. (1994) The spectral determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**: 307 – 313.
- Wu, Z. Y., Wang, H. J., Zhuang, T. T., Sun, L. B., Wang, Y. M., Zhu, J. H. (2008) Multiple functionalization of mesoporous silica in one-pot: direct synthesis of aluminum-containing plugged SBA-15 from aqueous nitrate solutions. *Adv. Funct. Mat.* **18**: 82 – 94.
- Xu, C., Xu, X. (2005) Effects of silicon on chlorophyll fluorescence and gas exchange of *Zizyphus jujuba* cv. Jinsi-xiaozao under salt stress. *J. Nanjing Med.Univ.* **29**: 25- 28.
- Xu, Y., Wu, Z., Zhang, L., Lu, H., Yang, P., Webley, P. A., Zhao, D. (2009) Highly specific enrichment of glycopeptides using boronic acid-functionalized mesoporous silica. *Annal. Chem.* **81**: 503 – 508.
- Zanetti, L. V., Milanez, C. R. D., Gama, V. N., Aguilar, M. A. G., Souza, C. A. S., Campostrini, E., Ferraz, T. M., Figueiredo, F. A. M. M. A. (2016) Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesq. Agropec. Bras.* **51** (3): 215 – 223.
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, H., Hosseini, S. H., Rahaie, M., Struve, D. (2015) Toxicity assessment of SiO₂ nanoparticles to pear seedlings. *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**(1): 13– 22.
- Zhang, D., Boccara, M., Motilal, L., Mischke, S., Johnson, E. S., Butler, D. R., Bailey, B., Meinhardt, L. (2009) Molecular characterization of an earliest cacao (*Theobroma cacao* L.) collection from upper Amazon using microsatellite DNA markers. *Tree Genet. Genomes* **5**(4): 595 – 607.
- Zhu, Y., Gong, H. (2014) Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agron. Sustain Dev.* **34**: 455- 472.