



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Caracterización del efecto de Cd^{2+} sobre la
fisiología de *Phaseolus vulgaris* L. Var. Jamapa”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Erick Alan Mancilla Diaz

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HUGO V. PERALES VELA

UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO. 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi madre, María Rosario Diaz Jiménez, con infinito cariño y veneración. Por haberme enseñado que nunca hay que rendirse y que no existen obstáculos insuperables “todo se puede hacer solo con tantitas ganas”. Por ser siempre mi cómplice en todas mis ocurrencias y locuras. Por brindarme siempre todo su amor, comprensión e infinito apoyo. Por darlo todo por mí sin importar nada. ¡Te amo mamá!

A mi padre, Mario Mancilla Urban, con infinito cariño y veneración. Por ser mi ejemplo a seguir y mi gran fuente de inspiración, por todos esos consejos que me han permitido salir adelante y seguir el camino correcto, por enseñarme siempre con el ejemplo a ser una persona responsable, honesta e íntegra. Por todo su amor, apoyo incondicional, comprensión y paciencia. ¡Te amo papá!

Mi infinito agradecimiento por haber hecho de mí un hombre de bien, por su apoyo incondicional, consejos, paciencia, sacrificios, sostén y protección. Gracias por que sin ustedes no hubiera podido llegar a hasta donde estoy. Gracias por que a pesar de que mi vida no será suficiente para pagarles todo lo que han hecho por mí siempre estarán a mi lado.

A la memoria de mi tía, María Eugenia Diaz Jiménez “Yayita”, mi segunda madre, por todo su amor y apoyo incondicional. Por haber estado en todo momento a mi lado, por su absoluta disposición, por esas palabras de aliento y consejos, porque sé que desde donde estas me observas con orgullo. ¡Gracias por todo, siempre te voy a llevar en mi corazón!

A la memoria de mi tío, Gustavo Mancilla Urban, que fue como un padre, sin duda una fuente de inspiración. Por haber estado a mi lado en todo momento, por los consejos y enseñanzas. Por haberme enseñado el valor de la Universidad de la Vida. Por todo el amor y cariño, porque sé que desde donde estas me observas con orgullo. ¡Gracias por todo, siempre te voy a llevar en mi corazón!

Agradecimientos

A mis tías, Lupita, la Guera y Tita por todo su amor y apoyo en todos los aspectos de mi vida, por estar siempre pendiente de mí y por continuamente motivarme, siempre estaré agradecido con ustedes. ¡Las quiero mucho!

A la familia Diaz, a mis tíos y a todos mis primos que han sido como unos hermanos, por apoyarme en todo momento, por sus consejos, por todos esos instantes de alegría, porque sé que siempre estarán en todo momento a mi lado, ¡Sin duda una familia maravillosa, los quiero mucho!

A mi tía Irma, mis primos Eduardo y Diana y mis hermanos Mauricio, Adriana y Laura por su cariño, su apoyo y por estar siempre pendiente de todos mis logros, porque sé que siempre estarán a mi lado y a la bonita familia Mancilla ¡Los quiero mucho!

A mi novia Estefanía, por estar a mi lado en esta etapa tan importante de mi vida, por apoyarme y ayudarme en todo momento, por motivarme y por todo lo que aprendimos juntos.

A mis grandes amigos y colegas: Mary Lu, Susana, Alberto, Santiago, Adriana, Gabriela, Brenda y Juan, por su cariño, alegría, compañía, por todas esas vivencias y experiencias, por el aprendizaje a su lado y por qué cada uno aportó algo a mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la FES Iztacala por haberme abierto las puertas, dejarme ser parte de la mejor Universidad del país y permitirme realizar una de las metas más importantes de vida.

A mi asesor, Dr. Hugo V. Perales Vela, por su confianza, conocimientos, apoyo, por su inmensa paciencia, y por permitirme realizar este trabajo.

A la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, por su amable disposición durante mi estancia en el laboratorio y su continuo apoyo.

A mis sinodales, Dr. Manuel Mandujano, Dr. Gerardo Ortiz, M en C. Josefina Vázquez, por sus recomendaciones, conocimientos y consejos.

Al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función donde se realizó este trabajo.

Al laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos por su ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Norma, Moisés, Félix, Paco, Paquito, Amed, Rogelio y Maribel por todos los momentos agradables y continuo apoyo en el laboratorio.

Índice

	Página
Resumen	8
1. Introducción	10
1.1. Metales pesados	10
1.2 Fuentes de emisión y contaminación	10
1.3 Cadmio	11
Características generales	11
El cadmio y los suelos agrícolas de México	11
Normatividad mexicana	13
Toxicidad en humanos	14
1.4 Efecto del cadmio en plantas	14
Función	14
Toxicidad	15
Mecanismos de absorción	15
Efecto sobre la fotosíntesis	15
Estrés oxidativo	16
Mecanismos de tolerancia	17
1.5 <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
2. Antecedentes	19
2.1 Efecto del cadmio sobre la fotosíntesis	19
2.2 Efecto del cadmio sobre el balance hídrico	21
2.3 Estrés oxidativo y mecanismos de tolerancia a cadmio	22
3. Hipótesis	23
4. Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Particulares	24
5. Material y métodos	24
5.1 Obtención del material vegetal	24
5.2 Tratamiento	25
5.3 Evaluación del crecimiento	25
5.4 Medición de la concentración de pigmentos fotosintéticos	25
5.5 Ensayo de fotosíntesis	26
Tasa de liberación de oxígeno	26
Actividad fotoquímica por emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII	26
Tasa de fijación de bióxido de carbono, transpiración, conductancia estomática y concentración interna de CO ₂	28
5.6 Respiración	29
5.7 Cuantificación de iones	30
5.8 Tratamiento estadístico	30
6. Resultados y discusión	31
I. Efecto del Cd ²⁺ sobre el crecimiento	31
II. Acumulación y distribución de Cd ²⁺	36
III. Efecto del Cd ²⁺ sobre el contenido iónico	40

a. Contenido de Ca^{2+}	41
b. Contenido de Mg^{2+}	42
c. Contenido de K^+	43
IV. Efecto del Cd^{2+} sobre la conductancia estomática, la tasa de transpiración, la concentración interna de CO_2 y la tasa de fijación de CO_2	47
V. Efecto del Cd^{2+} sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos	51
VI. Efecto del Cd^{2+} sobre la respiración en hojas	54
VII. Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad fotoquímica y la liberación fotosintética de oxígeno	56
a. Efecto del Cd^{2+} sobre la tasa de liberación de oxígeno	56
b. Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad fotoquímica máxima potencial (F_v/F_m) y la operacional (ϕPSII) del fotosistema II	58
c. Efecto del Cd^{2+} sobre el flujo electrónico en el fotosistema II (PSII): Análisis de la emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del PSII	64
d. Actividad y eficiencia cuántica del transporte de electrones en los acarreadores intermedios ($\text{Q}_B\text{-PQ-Cit}_b/f\text{-PC}$) y los acarreadores del lado aceptor del PSI ($\text{A}_0\text{-A}_1\text{-F}_x\text{-F}_A/\text{F}_B\text{-Fd-FNR}$)	76
e. Efecto del Cd^{2+} sobre el Índice de Rendimiento Total	80
7. Conclusiones	85
8. Bibliografía	86
9. Apéndice	102

Índice de tablas y figuras

	Pagina
Tabla 1. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP.	27
Figura 1. Representación esquemática del protocolo de fluorescencia modulada, para la obtención de qP y NPQ, en hojas previamente acondicionadas a la oscuridad y posteriormente adaptadas a la luz.	29
Figura 2. Efecto del cadmio sobre el crecimiento y desarrollo fenológico de <i>P. vulgaris</i> L.	31
Figura 3. Efecto del cadmio sobre: a) Tasa media de Crecimiento Relativo (R), b) Índice de Área Foliar (IAF) y c) Tasa de asimilación neta (E) en <i>P. vulgaris</i> L.	33
Figura 4. Concentración de cadmio $\mu\text{mol/g}$ de peso seco (PS) en: a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	38
Figura 5. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de cadmio sobre la distribución de Ca^{2+} en los distintos órganos a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de <i>P. vulgaris</i> L.	42
Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de cadmio sobre la distribución de Mg^{2+} en los distintos órganos a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	43
Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de cadmio sobre la distribución de K^{+} en a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	45
Figura 8. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de cadmio sobre: a) Conductancia estomática (gs), b) Tasa de Transpiración, c) Concentración interna de CO_2 (Ci) y d) Tasa de asimilación de CO_2 en <i>P. vulgaris</i> L.	48
Figura 9. Concentración de pigmentos fotosintéticos, a) Clorofila a (Chl a), b) Clorofila b (Chl b), c) Carotenoides totales (Cars) y d) Relación clorofila a y b (Chl a/b), en <i>P. vulgaris</i> L. tratadas con cadmio.	51
Figura 10. Efecto del cadmio sobre el consumo de O_2 (respiración) en hojas de <i>P. vulgaris</i> L.	55
Figura 11. Efecto del cadmio sobre la velocidad de producción de oxígeno, medido en hojas de <i>P. vulgaris</i> L.	57
Figura 12. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el rendimiento cuantico máximo para la fotoquímica primaria del PSII en la luz (Fv/Fm), en hojas de <i>P. vulgaris</i> L.	59
Figura 13. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el Rendimiento cuántico máximo para el fotosistema II, obtenido del análisis de decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila a en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	60
Figura 14. Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el Transporte electrónico aparente, obtenido a partir del análisis del decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila a en <i>P. vulgaris</i> L.	61
Figura 15. Decaimiento No-Fotoquímico (NPQ) en plantas de <i>P. vulgaris</i> L. sometidas a tratamiento con cadmio.	63

Figura 16.	Efecto del cadmio sobre la fluorescencia variable expresada en tiempo logarítmico, en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	66
Figura 17.	Efecto de las concentraciones de cadmio sobre la Fluorescencia variable relativa (Vt) expresada en tiempo logarítmico en plantas pre acondicionadas a la oscuridad de <i>P. vulgaris</i> L.	67
Figura 18.	Efecto del cadmio sobre la fluorescencia variable relativa (Vt experimental – Vt testigo) en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	68
Figura 19.	Efecto de las concentraciones de cadmio sobre los centros de reacción activos en la reducción de QA por cada complejo antena del Fotosistema II en <i>P. vulgaris</i> L.	70
Figura 20.	Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético, según la prueba OJIP.	71
Figura 21.	Efecto del cadmio sobre a) flujo de excitación absorbido por centro de reacción (ABS/RC), b) flujo de excitación atrapado por centro de reacción (TRo/RC), c) flujo electrónico por centro de reacción (ETo/RC) y d) disipación térmica por centro de reacción (Dlo/RC) del Fotosistema II en <i>P. vulgaris</i> L.	72
Figura 22.	Efecto de las concentraciones de cadmio sobre a) rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕP_o), b) eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de QA (Ψ_o) y c) rendimiento cuántico del transporte electrónico (ϕE_o) en <i>P. vulgaris</i> L.	75
Figura 23.	Efecto de distintas concentraciones de Cd^{2+} sobre la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor del PSI δRO en <i>P. vulgaris</i> L.	77
Figura 24.	Efecto del cadmio sobre el rendimiento cuántico para la reducción de los aceptores del lado aceptor del PSI (ϕRO) en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	78
Figura 25.	Efecto de las concentraciones de cadmio sobre el índice de funcionamiento o rendimiento total (PI_{total}) en plantas de <i>P. vulgaris</i> L.	81

Abreviaturas

Cd^{2+}	Ion cadmio
TCR	Tasa media de crecimiento relativo
TAN	Tasa de asimilación neta
IAF	Índice de área foliar
Mg^{2+}	Ion magnesio
Mn^{2+}	Ion manganeso
Ca^{2+}	Ion calcio
K^{+}	Ion potasio
GSH	Glutación
GR	Glutación reductasa
PC	Fitoquelatina
CO_2	Anhídrido carbónico
RuBP	Ribulosa 1,5 bifosfato
RUBISCO	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa
PSII	Fotosistema dos (agua-plastoquinona oxirreductasa impulsada por luz)
PSI	Fotosistema uno (plastocianina-ferredoxina oxirreductasa impulsada por luz)
CLO	Complejo liberador de oxígeno
LHC	Complejo cosechador de luz
RC	Centro de reacción
Q_A	Quinona a (Primer aceptor estable del fotosistema dos)
Q_B	Quinona b (Segundo aceptor estable del fotosistema dos)
PQH_2	Plastoquinona
Pc	Plastocianina
Fd	Ferredoxina
NADP (H)	Nicotina adenina dinucleótido fosfato (reducida)
ATP	Adenosín trifosfato
rETR	Tasa relativa de transporte de electrones
NPQ	Decaimiento no fotoquímico
ABS	Absorción de energía en las antenas del fotosistema dos
TR	Atrapamiento de excitones en el centro de reacción del fotosistema dos
ET	Transporte electrónico en los intermediarios de la cadena fotosintética
ETR	Tasa del transporte electrónico del fotosistema dos
ROS	Especie reactivas de oxígeno
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
O_2^-	Súperoxido
$^1\text{O}_2$	Oxígeno en estado singlete
OH^-	Radical hidroxilo
SOD	Superoxido dismutasa
CAT	Catalasa
APX	Ascorbato peroxidasa

Resumen

El cadmio (Cd^{2+}), es un elemento no esencial, a bajas concentraciones puede ser tóxico para todos los seres vivos ya que puede acumularse en los organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas. La absorción de Cd^{2+} por parte de las plantas depende tanto de su biodisponibilidad como de su concentración en el suelo. En México, industrias como la química, la petrolera, la del acero y la automotriz, así como la de la producción de fertilizantes son fuentes de contaminación por Cd^{2+} en agua y suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del Cd^{2+} sobre el crecimiento, contenido iónico, concentración de pigmentos fotosintéticos y la actividad fotosintética en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Jamapa.

Las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. fueron expuestas a Cd^{2+} (0 (testigo), 10, 20 y 30 mg/L) durante 14 días. Transcurrido el tiempo, se cuantificó el área foliar y el peso seco de la planta para determinar los siguientes parámetros: Tasa media de crecimiento relativo, tasa de asimilación neta e índice de área foliar. Se cuantificó el contenido de Cd^{2+} en los distintos órganos de la planta así como el contenido de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ . Se evaluaron algunos parámetros fisiológicos tal como: conductancia estomática, transpiración, contenido interno y asimilación de CO_2 a través de un analizador infrarrojo de gases portátil (IRGA). La concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b*, y carotenoides totales) se determinaron por espectrofotometría visible. La actividad fotosintética se determinó por oximetría, como liberación de oxígeno y la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II (PSII).

Los resultados mostraron que conforme aumentó el Cd^{2+} en el suelo, disminuyó la tasa media de crecimiento relativo, la tasa de asimilación neta y el índice de área foliar. La cuantificación de Cd^{2+} en los distintos órganos de la planta mostró que la raíz juega un papel importante en la retención del ion ya que el contenido de Cd^{2+} en tallos y hojas fue menor. La conductancia estomática y la tasa de asimilación de CO_2 disminuyen conforme aumenta el contenido de Cd^{2+} en el suelo. De igual forma la liberación de oxígeno disminuye con el aumento de la concentración de Cd^{2+} . La concentración de pigmentos fotosintéticos aumentó por unidad de área foliar, sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad fotoquímica primaria, ni en el transporte electrónico *in vivo*. Estos resultados muestran que la restricción en el crecimiento de la planta se debe a

alteraciones en el funcionamiento de los estomas limitando la difusión de CO_2 al cloroplasto y probablemente a la interacción del Cd^{2+} con algunas enzimas del ciclo de Calvin-Benson. Sin embargo, en términos generales la planta es capaz de tolerar las concentraciones de Cd^{2+} probadas, ya que, aun cuando hubo un crecimiento modesto, la actividad fotoquímica por unidad de área foliar se mantiene, lo que indica que la energía transformada y el carbono fijado no se utilizan para el crecimiento sino para el control de la condición estresante.

1. Introducción

1.1 Metales pesados

El término metal pesado se asocia a un grupo de metales y metaloides que tienen una densidad de entre 3 y 5 g/cm³. Aunque es una definición muy vaga es ampliamente reconocida y aplicada a los contaminantes del suelo y agua (Saghir *et al.*, 2011). Estrictamente, y desde el punto de vista químico, los metales pesados están constituidos por elementos de transición y post-transición incluyendo algunos metaloides como el arsénico y selenio. Estos elementos tienen una gravedad específica significativamente superior a la del sodio, calcio, y otros metales ligeros (INECC, 2009).

Estos metales se encuentran de forma natural en suelos, rocas, sedimentos, cuerpos de agua y en los organismos en concentraciones muy bajas. Por lo que su persistencia en el medio y la toxicidad para los organismos vivos, los sitúa entre los contaminantes más peligrosos (Saghir *et al.*, 2011).

1.2 Fuentes de emisión y contaminación

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera a través de la actividad humana. En general esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por la liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea y de ambientes acuáticos (Sherameti y Varma, 2010).

Tanto las fuentes naturales como antropogénicas pueden contribuir de forma importante a la emisión de elementos metálicos a la atmósfera. Cabe señalar que al comparar las emisiones globales, la emisión de elementos como selenio, mercurio y manganeso se realizan en su mayoría por fuentes naturales; sin embargo, en el plano regional las fuentes antropogénicas pueden contribuir de manera importante y estos metales se convierten en contaminantes en la escala local (INECC, 2009).

1.3 Cadmio

Características generales

El cadmio es un catión divalente que pertenece al grupo IIB de la tabla periódica de los elementos. Es un elemento blanco, dúctil, maleable y resistente a la corrosión. Tiene una densidad de 8.642 g/cm^3 . A temperatura ambiente y en seco es estable, pero se oxida lentamente en presencia de humedad ambiental. Las sales que suele formar son de carácter tóxico (Sigel *et al.*, 2013).

Es un elemento poco abundante en la corteza terrestre, sin embargo se encuentra ampliamente distribuido en una concentración promedio de 0.1 mg/kg , pero puede alcanzar una concentración de 3 mg/kg , que depende del tipo de suelo y la roca madre (*Op. Cit.*). Naturalmente, el Cd^{2+} se introduce en el medio ambiente como resultado del intemperismo de las rocas que lo contienen, por otro lado la actividad volcánica es la mayor fuente natural de liberación de Cd^{2+} a la atmósfera (Rodríguez *et al.*, 2008), sin embargo, la principal fuente de contaminación por Cd^{2+} en agua y suelo se debe a la actividad humana y a los procesos industriales en los cuales está involucrado (Estévez *et al.*, 2000).

Al ser un elemento móvil puede llegar al suelo y combinarse con otros elementos y formar diversos compuestos tales como cloruros, óxidos y sulfuros, los cuales se unen fuertemente a las partículas del suelo donde permanecen por muchos años (Pernía *et al.*, 2008).

El cadmio y los suelos agrícolas de México

En los últimos años, y en las condiciones actuales en las que se han desarrollado las actividades agrícolas en México, pueden apreciarse diversas fuentes de contaminación que, con el paso del tiempo, tienden a provocar la alteración del suelo y a repercutir en la producción de los cultivos. Esto se debe a la adición de diversas sustancias, como: fertilizantes, aguas negras y lodos residuales de origen industrial y doméstico (Balderas *et al.*, 2003).

Entre los elementos presentes en este tipo de sustancias se encuentran los metales pesados, en particular el cadmio (Cd^{2+}). La contaminación de los suelos agrícolas mexicanos por este se ha incrementado considerablemente, como consecuencia del riego

con aguas residuales y el empleo intensivo de fertilizantes fosfatados (Méndez *et al.*, 2000).

El uso agrícola de aguas residuales ocurre, generalmente, en las zonas agrícolas cercanas a las grandes urbes, en donde los volúmenes de aguas residuales industriales y municipales que se generan, son cada vez mayores (*Op. cit.*). Según datos del INEGI estados como Jalisco, Michoacán, México, Veracruz y Chiapas tienen cada uno más de 100 puntos de descarga de aguas residuales sin tratamiento en ríos y arroyos, concentrando el 49% del total nacional (INEGI, 2013). El Instituto Nacional de Ecología (INE), a principios de los 90's estimó que alrededor del 44.3% de las aguas residuales generadas en México, se utilizaban en la agricultura sin tener un tratamiento previo (SEDESOL/INE, 1993). La Comisión Nacional del Agua (CNA) estimó que en el país se regaban alrededor de 350,000 ha con un volumen de 160 m³/seg de aguas de origen municipal, algunas mezcladas con aguas residuales industriales o con aguas superficiales o de pozo (CNA, 1993). Actualmente en México, existen más de 30 zonas importantes donde se cultiva maíz (*Zea mays*), alfalfa (*Medicago sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), cebada (*Hordeum vulgare*) donde la irrigación agrícola depende de las aguas residuales, en la mayoría de los casos no hay vigilancia ni control sanitario alguno para el reúso de este recurso (Garza, 2000).

Con relación a los fertilizantes fosfatados, la principal materia prima de éstos es la roca fosfórica, constituida principalmente por apatita, que, además de P, contiene Cd²⁺ en cantidades que varían entre 8 y 500 mg/kg, esta concentración depende principalmente del origen de la roca (Laegreid *et al.*, 1999). Se ha calculado que los fertilizantes procedentes de África occidental contienen entre 160 y 225 gramos de Cd²⁺ por tonelada de pentóxido de fósforo, en tanto que la concentración de Cd²⁺ en los fertilizantes procedentes de EE. UU., es de 36 g/ton, siendo este último país el mayor productor a nivel mundial de este tipo de fertilizantes con 28.1%. Esto significa un aumento del 1% en el nivel de Cd²⁺ en el suelo superficial en donde se apliquen los fertilizantes de EE.UU (PUMA, 2010).

El consumo aparente de fertilizantes en México reportó una fuerte reducción entre 1996 y 2002, período en el cual ocurrió un fuerte descenso en la producción nacional de estos insumos agrícolas. Sin embargo, a partir de 2003 se observó una tendencia creciente en

el consumo, abastecido principalmente a través de las importaciones (Gaucín y Torres, 2011). Así México se convirtió en el segundo consumidor de América latina de fertilizantes con 10 % y un incremento promedio anual en su consumo de 5.4%. (FAO, 2005). Durante el 2010, cinco fertilizantes concentraron el 71.2% del volumen importado, ocupando el 18.3% de la importación los fertilizantes fosfatados. Las importaciones de fosforo provinieron principalmente de Estados Unidos con 88.2% (Gaucín y Torres, 2011).

Normatividad mexicana

El uso de sustancias tales como agroquímicos y aguas residuales en la agricultura, al igual que otras prácticas con implicaciones ambientales, no se ha analizado detalladamente en la legislación ambiental mexicana. Cabe mencionar que la única norma que toca esta temática es la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, selenio, talio y/o vanadio. En el caso del cadmio se estipula que cuando el suelo que se presume contaminado tiene una superficie menor o igual a 1000 m², el responsable procederá a remediar a las concentraciones de referencia totales, en este caso 37mg de Cd²⁺/kg de suelo.

De manera que, cuando se trata de diagnosticar el grado de acumulación de los elementos traza en los suelos de México, se usan índices establecidos para otros países como criterios de comparación, como por ejemplo del Environmental Protection Agency (U.S. EPA), que establece como límite máximo permisible para suelos agrícolas la concentración de 20 mg Cd²⁺ kg⁻¹ de suelo (EPA, 1993), pero este umbral aumenta continuamente debido a la modificación del suelo y el uso intensivo de fertilizantes fosfatados, agua y lodos residuales (Singh *et al.*, 2012).

Si se quisiera recomendar o regular el uso racional de residuos contaminantes y mantener un mínimo riesgo de exposición de los humanos a contaminantes presentes en productos agrícolas, el primer problema que se enfrenta es la ausencia de límites permisibles de concentración en suelos (Vázquez *et al.*, 2005).

Toxicidad en humanos

Las plantas durante el crecimiento pueden acumular Cd^{2+} , principalmente en las partes comestibles, poniendo así en peligro el rendimiento y la calidad de los cultivos, de este modo se convierte en un peligro potencial para la salud humana y animal. Este metal pesado ocupa el puesto 7 entre los 20 agentes tóxicos más peligrosos. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer ha clasificado al Cd^{2+} como un carcinógeno y se ha informado que las plantas son la principal fuente para los seres humanos (Singh *et al.*, 2012).

El Cd^{2+} se acumula en el organismo humano, fundamentalmente en los riñones, causando hipertensión arterial. La absorción pulmonar es mayor que la intestinal, por lo cual, el riesgo es mayor cuando el cadmio es aspirado (INECC, 2009).

La concentración crítica en la corteza renal, que da lugar a una prevalencia de 10% de proteinuria de bajo peso molecular en la población en general, es aproximadamente de 200 mg/kg y se alcanza con una ingestión alimentaria diaria de unos 175 μg por persona durante 50 años. Partiendo de una tasa de absorción de Cd^{2+} vía los alimentos de 5% y de una tasa diaria de excreción de 0.005% de la carga corporal se estableció un nivel de ingestión semanal tolerable provisional de 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Op. cit.*).

En la ciudad de Toyama, en Japón, ocurrió un brote epidémico de intoxicación (síndrome de Itai-Itai), ocasionado por la ingestión de arroz contaminado con Cd^{2+} , el cual era irrigado con agua contaminada por jales mineros. Las personas afectadas, principalmente mujeres post-menopáusicas, sufrieron deformación de los huesos, acompañada de intenso dolor y fracturas, además de proteinuria y glaucoma. Se considera que estas alteraciones, se produjeron favorecidas por factores dietéticos, como deficiencia en vitamina D (Sigel *et al.*, 2013).

1.4 Efecto del cadmio en plantas

Función

El Cd^{2+} es uno de los metales pesados más tóxico para la mayoría de los seres vivos y no tiene ninguna función biológica descrita. Aunque no es esencial para el crecimiento de las plantas, es fácilmente absorbido por las raíces (Pagliano *et al.*, 2006) de esta manera se puede acumular en las plantas, transferir de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su

concentración a lo largo de la cadena trófica. La absorción de Cd^{2+} por parte de las plantas depende tanto de su biodisponibilidad como de su concentración en el suelo, de la presencia de materia orgánica, el pH y el potencial redox (Rodríguez *et al.*, 2008).

Toxicidad

Se ha observado que el Cd^{2+} afecta la actividad fisiológica y metabólica en distintos compartimientos celulares de la planta. Estos efectos incluyen la inhibición del crecimiento, alteración de la nutrición mineral, el balance hídrico y el intercambio gaseoso, reducción del contenido de clorofila, azúcares solubles y proteínas, alteración de la actividad fotosintética, cambios en el contenido de fenoles, especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas relacionadas (Ci *et al.*, 2010).

Mecanismos de absorción

Al ser un metal no esencial se asume que no existen transportadores específicos de entrada en la raíz para el Cd^{2+} . Se cree que entre las proteínas responsables de la entrada de Cd^{2+} a la célula se encuentran la proteína IRT1 y ZIP, que pertenecen a la familia de transportadores de Zn, Fe y otros cationes divalentes (Flores *et al.*, 2009). También se ha descrito que la proteína LCT1, que transporta Ca^{2+} está implicada en la absorción de Cd^{2+} (Rodríguez *et al.*, 2008).

En las plantas superiores la raíz es el primer órgano que entra en contacto con los iones metálicos, por lo tanto el primer efecto del Cd^{2+} se da en este órgano, puede causar diversos síntomas como oscurecimiento de las puntas, inhibición de la elongación y acumulación moderada de la biomasa (Ekmekci *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2012). Por otro lado se ha observado que el Cd^{2+} reduce la absorción y translocación de nutrientes esenciales por competencia como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} , también reduce la asimilación de agua a través del tonoplasto y las acuaporinas ya que provoca cambios estructurales en la célula (Nedjimi y Daoud, 2009)

Efecto sobre la fotosíntesis

Uno de los principales efectos del Cd^{2+} que se ha observado en la mayoría de las plantas estudiadas, es la inhibición de la fotosíntesis. Dicha inhibición se atribuye a dos efectos, un efecto indirecto, principalmente sobre el balance hídrico, la conductancia estomática y la absorción de CO_2 (Pagliano *et al.*, 2006). En el primero y segundo caso el efecto puede

deberse a alteraciones en la absorción de agua y a mecanismos de tolerancia a estrés hídrico que implica ajustes osmóticos con acumulación de solutos orgánicos. Por otra parte la disminución de la asimilación de CO₂ puede estar relacionada con los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico y con la reducción de la actividad de las enzimas carboxílicas como la ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxidasa (RUBISCO), y otras enzimas que participan en el Ciclo de Calvin-Benson (Ci *et al.*, 2010) como la aldolasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, NADP⁺-gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa y la anhidrasa carbónica (Ying *et al.*, 2010).

Los efectos directos se centran sobre la estructura, composición y funcionalidad del fotosistema II (PSII) y fotosistema I (PSI), siendo el PSII más sensible a la presencia del Cd²⁺ (Tang *et al.*, 2013). Se sabe que el Cd²⁺ es capaz de afectar tanto el lado donador como el aceptor del PSII e inhibir o alterar la función del LHCII al sustituir el centro activo de la clorofila (Mg²⁺) e inhibir la actividad de las enzimas que sintetizan esta molécula. Del lado donador el efecto se lleva a cabo en el complejo liberador de oxígeno (CLO), ya que el Cd²⁺ puede sustituir al Ca²⁺ por competencia en el clúster de Mn₄O₅Ca (Faller *et al.*, 2005). También puede alterar o inhibir la función del centro de reacción del PSII (P680). En el sitio aceptor el Cd²⁺ interfiere con el paso de electrones entre Q_A y Q_B, este proceso reduce algunos parámetros de fluorescencia, como la eficiencia cuántica máxima de la fotoquímica primaria del PSII (Fv/Fm) (Franco *et al.*, 1999).

La interacción del Cd²⁺ con los grupos sulfhidrilo (-SH) funcionales de las proteínas ha sido considerado como un posible mecanismo de acción (*Op. cit.*). Sin embargo, diversos estudios *in vitro* indican que la inhibición de la fotosíntesis no puede ser atribuida totalmente a la interferencia directa del metal con las reacciones fotoquímicas, si no que empieza desde la inhibición de la fijación de CO₂, en ocasiones sin provocar ningún efecto perceptible sobre las reacciones fotoquímicas en cloroplastos. Esto aparentemente implica que el Cd²⁺ limita la tasa de fotosíntesis a través de efectos deletéreos en la fase oscura del proceso fotosintético (Chugh y Sawhney, 1999).

Estrés oxidativo

El Cd²⁺ casi siempre adopta un solo estado de oxidación, que es como catión divalente. A diferencia de metales activamente redox como el Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺, el

Cd^{2+} no es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton (Smeets *et al.*, 2005).

Dependiendo de la especie de la planta y la concentración del Cd^{2+} , este puede generar estrés oxidativo a través de mecanismos indirectos como la inhibición o estimulación de la actividad de varias enzimas antioxidantes y a través de la interrupción de la cadena transportadora de electrones antes de que aparezcan síntomas visibles de toxicidad. Las ROS pueden reaccionar con los lípidos, proteínas, pigmentos, y el ácido nucleico, lo cual puede provocar daños de la membrana y la inactivación de las enzimas, lo que afecta a la viabilidad celular (Qui *et al.*, 2008).

Por otra parte, las células vegetales han desarrollado un sistema de defensa antioxidante para contrarrestar los radicales libres con el fin de protegerse del estrés oxidativo, este sistema de defensa opera con la acción secuencial y simultánea de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y glutatión reductasa (GR) (Zhang *et al.*, 2009); y de componentes no enzimáticos, tales como ascorbato (ASC), glutatión (GSH), α -tocoferol y β -carotenos (Qui *et al.*, 2008). La respuesta de las enzimas antioxidantes puede variar entre las especies y entre los diferentes tejidos.

El súper oxido (O_2^-) producido en las células se convierten en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la SOD. La acumulación de H_2O_2 , un oxidante fuerte, se elimina en la célula, ya sea por la CAT o por el ciclo ascorbato-glutatión, donde el APX lo reduce a H_2O . El ASC y el GSH, suelen aumentar su concentración significativamente bajo condiciones de estrés oxidativo (Ranieri *et al.*, 2005). El GSH, en la forma reducida, protege a los grupos tiol de muchas enzimas en condiciones oxidativas. Por esta razón, su concentración es controlada por un mecanismo homeostático complejo en el que la disponibilidad de azufre parece ser necesario (Iannelli *et al.*, 2002). Sin embargo la acumulación de ROS puede ser la consecuencia de una interrupción en el equilibrio entre su producción y la actividad del sistema antioxidante. (Zhang *et al.*, 2009).

Mecanismos de tolerancia

El GSH es un tiol tripéptidico con un elevado porcentaje de cisteína y residuos sulfhidrilos, su forma reducida es γ -Glu-Cys-Gly y juega un papel muy importante en las plantas

expuestas a Cd^{2+} ya que aparte de participar como antioxidante es monómero de la molécula fitoquelatina (PCs) (Mohamed *et al.*, 2012), con propiedades similares a las de la glutatión-S-transferasa (Iannelli *et al.*, 2002).

Las PC son los principales péptidos que forman complejos con los metales pesados en plantas y comprenden una familia de péptidos con la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n es el número de veces que se repite la unidad $(\gamma\text{-Glu-Cys})\text{-Gly}$, que puede variar de 2 a 11. Las PCs se sintetizan por la acción de la enzima γ -glutamylcisteína transpeptidasa dipeptidil, también llamada fitoquelatina sintasa (PCS). La enzima se expresa constitutivamente, pero puede ser regulada a nivel transcripcional y traduccional por la presencia de metales y metaloides (Mishra *et al.*, 2006). Las PCs reducen la concentración del metal libre en el citosol mediante la unión y transporte a compartimentos específicos, principalmente la vacuola y la pared celular (Mohamed *et al.*, 2012). La capacidad quelante de las PCs reside en el alto porcentaje de residuos sulfhidrilo presentes en la cisteína que se unen a los iones metálicos formando complejos estables (Srivastava *et al.*, 2004). Las PCs pueden transportar los iones metálicos de la raíz a otros sitios y por lo tanto la cuantificación del metal en diferentes partes de la planta puede correlacionar la producción de PC con la acumulación de metales y su transporte (Mishra *et al.*, 2006).

1.5 *Phaseolus vulgaris*

Phaseolus vulgaris es una planta perteneciente a la familia Fabacea, del orden Fabales. Es una planta dicotiledónea, anual, herbácea y es cultivada intensamente desde la zona tropical hasta las templadas. Cuenta con folíolos de tres hojas y flores con distintas tonalidades, como blancas, rosas, lilas y violetas. Sus semillas, lo que conocemos como frijol propiamente, tiene forma de riñón y crecen en una vaina comestible como legumbre (ejotes, del náhuatl *exotl*). Dentro del grupo de las especies leguminosas, el frijol común es una de las más importantes y es originaria de América. En el mundo se conocen alrededor de 150 especies, de las cuales 70 se encuentran en México con gran variedad de tamaños, colores y requerimientos ecológicos (Financiera Rural, 2011).

Entre las especies más importantes cultivadas en México, que por prácticas agrícolas pudiera estar expuesto al Cd^{2+} se encuentra el frijol común, *Phaseolus vulgaris* L. El frijol

es un cultivo que ocupa el segundo lugar por superficie cultivada y el sexto por valor de la producción, su importancia es ancestral y es la base de la alimentación y fuente de nutrientes desde la época prehispánica (Financiera Nacional de Desarrollo, 2014). En consecuencia, el uso agrícola de estos suelos contaminados por Cd^{2+} , aparentemente, produce cultivos normales, pero potencialmente peligrosos para el consumo humano y animal (Balderas *et al.*, 2003). Por lo anterior, es de importancia económica y toxicológica, la caracterización fisiológica y metabólica de los efectos del Cd^{2+} en las plantas de frijol.

2. Antecedentes

2.1 Efecto del cadmio sobre la fotosíntesis

Muchos metales pesados inhiben las reacciones de transferencia de electrones en el fotosistema II (PSII). Se sabe que el Cd^{2+} tiene una alta afinidad con el clúster de $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ y es capaz de sustituir al Ca^{2+} en una reacción lenta. Esto resulta en la inhibición de la evolución de oxígeno fotosintético. Sigfridsson y colaboradores en 2004 estudiaron la interferencia del Cd^{2+} en las reacciones de transporte de electrones del PSII en tiempos de incubación cortos. Observaron varios efectos: 1) la inhibición de la transferencia de electrones de la tirosina al centro de reacción P680 del PSII, un efecto similar al del Cu^{2+} ; 2) disminución del transporte de electrones hacia Q_B lo que indica que el Cd^{2+} tiene un punto de unión más cerca de Q_B que de Q_A ; 3) la evolución de oxígeno en estado estacionario disminuye, esta inhibición abarca solo el 20% de los centros de reacción del PSII.

Por otro lado, en 2006, Pagliano y colaboradores estudiaron el efecto del Cd^{2+} (7.5 a 75 μM) en plantas de arroz, observando una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos, en el número de tilacoides, en la evolución de oxígeno y la proporción de Fv/Fm. Sin embargo las proteínas del centro de reacción y las del complejo antena del PSII no se vieron afectadas, indicando que el Cd^{2+} no altera la organización estructural de este fotosistema.

En plántulas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Bonneville) Chugh y Sawhney, en 1999, observaron una disminución progresiva dependiente del aumento de la concentración de

Cd^{2+} (2.5, 5, 7.5 y 10 mM durante 12 días) de la tasa de fotosíntesis, el contenido de clorofila, la actividad del PSI y PSII, reportaron un efecto más pronunciado en este último complejo en los primeros 6 días de tratamiento, y la actividad de algunas enzimas de la fase oscura de la fotosíntesis, como la Rubisco, NADP-gliceraldehído-3-fosfato, fructosa-1,6-bisfosfatasa y deshidrogenasa NADP-malato. También observaron que el efecto en las enzimas fotosintéticas podría reducir la regeneración de la RUBP provocando la reducción de la actividad fotosintética de las plantas.

Singh y colaboradores en el 2012, en plantas de *Lepidium sativum* L. expuestas a estrés por Cd^{2+} (0, 25, 50 y 100 mg/kg de suelo) reportaron la reducción del área foliar y el peso seco así como una disminución significativa de la tasa neta de la fotosíntesis (PN), conductancia estomática (gs), concentración intercelular de CO_2 (Ci), clorofila a y b y de algunas enzimas de la fijación del CO_2 como la anhidrasa carbónica, alterando de esta forma la maquinaria fotosintética y perturbando el crecimiento de las plantas expuestas a Cd^{2+} . Por otro lado observaron un aumento en la actividad de la ATP-S y el contenido de azufre (S), lo que sugiere una sobre regulación de la vía de asimilación de S para una posible tolerancia a Cd^{2+} a partir de la actividad de las enzimas antioxidantes y la GSH.

En el 2010 Ying y colaboradores, en plantas de *P. divaricata* expuestas a estrés por Cd^{2+} (5, 10, 25 y 50 μM) reportaron que a medida que aumentaba la concentración el contenido de agua en las hojas, la concentración de clorofila a y b y la concentración de carotenoides se mantuvo sin alteraciones. Sin embargo, la conductancia estomática, la transpiración, la tasa neta de fotosíntesis y la concentración intercelular de CO_2 se vieron afectadas significativamente. Por otro lado, observaron que algunas enzimas de la asimilación de CO_2 como la Anhidrasa carbónica y la Rubisco aumentaron su actividad y concentración, respectivamente, a 50 μM de Cd^{2+} . Por otra parte, la actividad de la Rubisco, la NADP gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa y fructosa 1,6- bisfosfatasa no se vio alterada de forma significativa con el aumento de la concentración de Cd^{2+} . También reportaron que aunque el tamaño de la célula del mesófilo se redujo, la ultraestructura del cloroplasto se mantuvo intacta con el tratamiento más alto de Cd^{2+} . De esta forma demostraron que el mantenimiento de la actividad de las principales enzimas de la asimilación de CO_2 y la integridad del cloroplasto contribuye a la tolerancia a estrés por Cd^{2+} .

2.2 Efecto del cadmio sobre el balance hídrico

Se sabe que los metales pesados en general tienen un efecto negativo sobre el estatus hídrico de la planta. En plantas de *Mesembryanthemum crystallinum*, Kholodova y colaboradores (2011), estudiaron las alteraciones del estado hídrico de la planta y las respuestas de tolerancia inducidas por Cu^{2+} y Zn^{2+} . Después de varios días de exposición a los metales pesados observaron una disminución del exudado de savia en la raíz y un déficit de agua en los tejidos foliares. Por otro lado reportaron varios eventos de adaptación primaria que incluían, una disminución rápida de la tasa de transpiración y un descenso progresivo del potencial osmótico de la savia de las células de la hoja. En los tratamientos largos fue evidente la reducción del contenido total y relativo de agua, un aumento en la acumulación de prolina, así como en la capacidad de retención de agua y cambios en la expresión génica de las acuaporinas. En este punto después de 3 horas de tratamiento la expresión del gen *McTIP2;2* de hoja, el cual codifica las acuaporinas del tonoplasto se suprimió varias veces al igual que otros 3 genes a partir de las 9 horas. Lo anterior indico que los metales pesados inducen un reordenamiento crítico de la relación hídrica.

Rascio y colaboradores (2008) estudiaron el efecto de la exposición a concentraciones crecientes de Cd^{2+} (50, 100, y 250 μM) en plántulas de arroz, ellos reportaron la inhibición del crecimiento de la raíz y la alteración de la morfogénesis, que causo una división celular desordenada y un agrandamiento anormal hacia delante de la epidermis y las capas celulares corticales de la región apical.

Nedjimi y Daoud en el 2009, realizaron una investigación detallada sobre la respuesta fisiológica de la planta hiperacumuladora *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii*, aplicando concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 400 μM de cloruro de cadmio (CdCl_2). Reportaron que el crecimiento, la transpiración y la conductividad hidráulica de la raíz (L_0) disminuye con el aumento de la concentración de Cd^{2+} , por lo tanto el flujo de agua tuvo poco efecto sobre la absorción de Cd^{2+} . Por otro lado observaron un aumento significativo en la concentración de prolina, que fue proporcional con el aumento de la concentración de Cd^{2+} .

2.3 Estrés oxidativo y mecanismos de tolerancia a cadmio

En plantas de *Phaseolus vulgaris* L. Smeets y colaboradores (2005) estudiaron la fitotoxicidad de Cd^{2+} ($2\mu\text{M CdSO}_4$) en las reacciones antioxidantes. Observaron que después de 24 horas de exposición el mecanismo de defensa antioxidante se elevó significativamente, tal como la peroxidasa siringaldazina, peroxidasa guayacol, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, así como una enzima importante en la reducción del NADP^+ (isocitrato deshidrogenasa). Así bien, encontraron que el ciclo del ascorbato-glutatión juega un papel muy importante contra el estrés oxidativo inducido por Cd^{2+} . Estos mecanismos de defensa antioxidante tuvieron incrementos significativos en las hojas de las plantas en las primeras 48 horas de exposición a Cd^{2+} . Sin embargo después de un tiempo de exposición prolongado a este ion el sistema de defensa antioxidante descende ocasionando un severo estrés oxidativo, ya que el Cd^{2+} no es un metal redox-activo, es probable que el estrés sea un efecto indirecto.

En el 2005 Ranieri y colaboradores, en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), aplicando distintos niveles de Cd^{2+} , evaluaron la generación de estrés oxidativo en raíz y hojas mediante la acumulación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), la tasa de oxidación de NADPH^+ , contenido de glutatión reducido (GSH) y actividad de las peroxidases (POD). Por otro lado estudiaron cuantitativamente la relación entre tioles peptídicos y fitoquelatinas en raíz y hojas, con el fin de determinar su relación en la limitación del estrés oxidativo. Encontraron que el estrés oxidativo y la acumulación de Cd^{2+} en hojas por la baja translocación de Cd^{2+} a este tejido, fue contrarrestado por la maquinaria antioxidante y la síntesis de fitoquelatinas (PC). Por el contrario en la raíz, a pesar de la elevada concentración de PC's y tioles peptídicos el exceso de Cd^{2+} causa la disminución de la protección antioxidante, con la generación considerable de H_2O_2 .

En otro estudio Mohamed y colaboradores (2012), en plantas de mostaza india (*Brassica juncea* L. Czern.) sometidas a distintos niveles de Cd^{2+} (0, 50 y 200 μM durante 7 días) reportaron un aumento progresivo del ion en raíz y hojas, acompañado de una alteración en la absorción mineral y una disminución de la longitud, peso fresco y seco de la raíz y hojas. Observaron también una alteración en el contenido de clorofila y carotenoides, así como una activación del ciclo de las xantofilas, que sugiere la necesidad del aparato fotosintético de protegerse contra la fotoinhibición. Al parecer las hojas eran menos

eficientes que la raíz para eliminar las ROS, mostrado por la actividad de la peroxidasa y catalasa. Por otro lado reportaron un evidente aumento de glutatión y fitoquelatinas tanto en raíz como en hojas independiente de la concentración de Cd^{2+} aplicado.

La fitotoxicidad causada por Cd^{2+} y la respuesta de tolerancia de *Bacopa monnieri* L. fue investigada por Mishra y colaboradores en 2006, ellos reportaron que el Cd^{2+} como síntoma de toxicidad causó estrés oxidativo, el cual fue comprobado por el aumento de la peroxidación lipídica. Algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa glutaril (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa, mostraron un aumento a excepción de la catalasa (CAT) que disminuyó. Inicialmente observaron un aumento en la concentración de la cisteína, glutatión y tioles no proteicos, sin embargo disminuyeron con el aumento de la concentración de Cd^{2+} y la duración del tratamiento. La síntesis de fitoquelatinas en la raíz aumentó a concentraciones bajas de Cd^{2+} (10 μM) y en hojas a 50 μM , no obstante la concentración de fitoquelatinas en la raíz disminuyó a 50 μM de Cd^{2+} , lo cual se relacionó con la disminución de los niveles y actividad de GSH y GR, respectivamente, ejerciendo así cambios bioquímicos y fenotípicos en la planta, como aumento del estrés oxidativo, oscurecimiento de la raíz y clorosis en las hojas. Pese a esto la raíz fue el órgano de la planta que acumuló más Cd^{2+} seguido del tallo y finalmente las hojas.

3. Hipótesis

El estado fisiológico de *Phaseolus vulgaris* L. se verá afectado por la exposición a Cd^{2+} , perturbando la actividad del aparato fotosintético, principalmente por alteraciones en la fisiología del PSII causando disturbios en los eventos fotoquímicos primarios y por ende deficiencias en el transporte de electrones en la membrana tilacoidal. La presencia de Cd^{2+} también alterará la absorción de agua en la raíz y de algunos iones tales como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , y K^+ , así como su distribución a lo largo de la planta ocasionando un déficit nutricional. Asumiendo que la presencia de Cd^{2+} en la raíz altera la absorción de agua en la planta, se espera que algunos parámetros fisiológicos se alteren, tales como: la conductancia estomática, la transpiración, la concentración interna de CO_2 así como la fijación de CO_2 . De esta manera se inhibirá el crecimiento de la plantas y el desarrollo fenológico.

4. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el efecto del Cd^{2+} , sobre el crecimiento, la concentración de pigmentos fotosintéticos, la actividad fotosintética y la captación y distribución de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Cd^{2+} en raíz, tallo y hojas, en *Phaseolus vulgaris* L. Var Jamapa.

Objetivos particulares

- a. Determinar la tasa de crecimiento de *Phaseolus vulgaris* expuesta a Cd^{2+} .
- b. Cuantificar el contenido de pigmentos fotosintéticos de *Phaseolus vulgaris* L. Var Jamapa.
- c. Determinar la tasa fotosintética por medio de la liberación de oxígeno y fijación de CO_2 .
- d. Caracterizar la eficiencia fotoquímica del PSII por métodos de emisión de fluorescencia.
- e. Determinar conductancia estomática y transpiración.
- f. Determinar la concentración interna de CO_2 (Ci).
- g. Cuantificar el contenido y distribución de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Cd^{2+} en raíz, tallo y hojas.

5. Materiales y método

5.1 Obtención del material vegetal

Se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. Var. Jamapa, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos, luego se lavaron varias veces con agua corriente y se dejaron en imbibición durante 24 horas con agua destilada. Posteriormente, las semillas se sembraron en macetas de plástico conteniendo agrolita como sustrato a capacidad de campo (CC) con solución Hoagland. El cultivo se llevó a cabo en un invernadero bajo condiciones naturales de fotoperiodo, radiación solar, temperatura y humedad relativa. Estas condiciones se mantuvieron desde la germinación de las semillas

hasta el término del tratamiento. Cada tercer día se humedeció el sustrato con agua destilada manteniéndolo a capacidad de campo (CC).

5.2 Tratamiento

Después de 7 días (t_0) de la germinación de las semillas y la aparición de las primeras hojas verdaderas se establecieron 4 lotes con 30 plántulas cada uno y se aplicó solo al inicio del experimento y en conjunto con la solución nutritiva, 3 niveles de Cd^{2+} , (como $CdCl_2$): 10, 20 y 30 mg/L, basando estas concentraciones en algunas fuentes bibliográficas. El tratamiento fue por 14 días (t_1).

Las mediciones de los parámetros evaluados, para el caso de los parámetros de crecimiento, se realizaron al inicio del tratamiento (t_0) y al final (t_1). La cuantificación de Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ y Cd^{2+} en los distintos tejidos vegetales, pigmentos fotosintéticos y los parámetros fotosintéticos se determinaron al final del tratamiento (t_1).

5.3 Evaluación del crecimiento

El área foliar se midió por gravimetría al inicio del tratamiento (t_0) y al final (t_1).

El peso seco de cada órgano vegetal (hoja, tallo y raíz) se obtuvo de un total de 10 plantas al azar de cada lote, se hicieron las mediciones al t_0 y al t_1 , se secaron las muestras durante 72 horas a $70^\circ C$. De estas mediciones se obtuvieron los siguientes parámetros:

- a. Índice de área foliar (IAF)
- b. Tasa media de crecimiento relativo (TCR)
- c. Tasa de asimilación neta (TAN)

5.4 Medición de la concentración de pigmentos fotosintéticos

La cuantificación de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y carotenoides totales, se obtuvo de 10 discos, con un área de 6.5 cm^2 . Los pigmentos se extrajeron utilizando acetona al 80% (v/v) y se midió la absorbancia (Abs) del extracto en tres longitudes de onda: 663, 646 y 470 nm. El cálculo de la concentración de los pigmentos se realizó según lo

reportado por Wellburn en 1994. Las concentraciones de los pigmentos se obtuvieron como $\mu\text{g/ml}$ en la solución de la celda del espectrofotómetro de acuerdo a las siguientes fórmulas:

- [Clorofila a] = $12.21 \text{ Abs}_{663} - 2.86 \text{ Abs}_{646}$
- [Clorofila b] = $20.13 \text{ Abs}_{646} - 2.86 \text{ Abs}_{663}$
- [Carotenoides totales] = $(1000 \text{ Abs}_{470} - 3.27 [\text{Clorofila a}] - 104 [\text{Clorofila b}]) / 198$

5.5 Ensayo de fotosíntesis

Tasa de liberación de oxígeno

La tasa de liberación de oxígeno se determinó en un oxímetro (Oxygraph Hansatech, England) con cámara de fase gaseosa, midiendo la tasa de liberación de oxígeno y el consumo en 5 discos de hoja con área de 6.036 cm^2 , expuestos a una densidad de flujo fotónico de $400 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, esta fue proporcionada por una lámpara de 36 fotodiodos emitiendo luz roja de 660 nm, en intervalos de dos minutos. Los registros se efectuaron a temperatura ambiente, después de adaptar los discos de hoja durante 2 minutos a la oscuridad. En la cámara de disco de hoja se agregó 1 ml de NaHCO_3 1M como fuente de dióxido de carbono.

Actividad fotoquímica por emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII

La actividad fotoquímica se determinó por la emisión de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II por el método denominado análisis OJIP. La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila a en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK). Las hojas fueron previamente adaptadas a la oscuridad durante 15 minutos. Se aplicó un pulso de luz roja (680 nm) con una densidad de flujo fotónico de $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la fluorescencia mínima, F_0 a los 50 μs , la fluorescencia máxima, F_m a los 200 ms y la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, U.K.) y el programa

Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Los parámetros medidos (tabla 1) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (van Heerden *et al.*, 2004).

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	F _o	
Fluorescencia máxima	F _m	
Fluorescencia variable a 2ms	F _v	= F _m -F _o
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	M _o	= (F ₃₀₀ μ s-F _o)/(F _m -F _o)
Fluorescencia variable a 2ms	V _j	= (F _{2ms} -F _o)/(F _m -F _o)
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	= (M _o /V _j)/(1-F _o /F _m)
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TR _o /RC	= M _o /V _j = (ABS/RC) ϕ_{P_o}
Disipación a tiempo 0 por RC	DI _o /RC	= (ABS/RC) - (TR _o /RC)
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ET _o /RC	= (TR _o /RC) ψ_o
Flujos específicos expresados por área (cross section) (CS)		
Absorción por CS	ABS/CS	= F _o o F _m
Atrapamiento a tiempo 0 por CS	TR _o /CS	= (TR _o /ABS)/(ABS/CS)
Disipación a tiempo 0 por CS	DI _o /CS	= (ABS/CS) - (TR _o /CS)
Transporte electrónico a tiempo 0 por CS	ET _o /CS	= (ET _o /RC)(RC/ABS)
Densidad de RC por CS	RC/CS	= (ABS/CS)(RC/ABS)
Eficiencias cuánticas (o relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕ_{P_o}	= TR _o /ABS = (F _m -F _o)/(F _m - (1 - (F _o /F _m) = F _v /F _m)
Producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica	ϕ_{D_o}	= DI _o /ABS = 1 - ϕ_{P_o} = F _o /F _m
Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de QA ⁻	ψ_o	= ET _o /TR _o = 1 - V _j
Probabilidad de un excitón absorbido mueva un electrón después de QA ⁻	ϕ_{E_o}	= $\phi_{P_o} \cdot \psi_o$ = (TR _o /ABS)/(ET _o /TR _o) = ET _o /ABS = (1 - F _o /F _m)(1 - V _j)
Índices vitales		
Índice de funcionamiento	PI _{ABS}	= [RC/ABS][$\phi_{P_o}/(1 - \phi_{P_o})$][$\psi_o/1 - \psi_o$]
Fuerza impulsora de la fotosíntesis	DF _{ABS}	= Log [PI _{ABS}]

Tabla 1. Definición de los parámetros utilizados en el análisis OJIP de la cinética polifásica de la fluorescencia de la clorofila a del PSII.

El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico se realizó por medio de la técnica de pulsos saturantes, se utilizó un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). Las hojas fueron previamente adaptadas a la oscuridad durante 15 minutos. El registro comenzó con la inducción de fluorescencia utilizando pulsos de luz modulada ($0.1 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obtener el valor de fluorescencia mínima (F_o); posteriormente se aplicó un pulso de luz saturante ($3000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obtener el valor de fluorescencia máxima (F_m) y a continuación se encendió la luz actínica ($260 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Transcurridos 240 segundos se registró el valor de fluorescencia como F_s , y se aplicó un nuevo pulso de luz saturante para obtener el valor de fluorescencia máxima a la luz (F_m'), enseguida se apagó la luz actínica y se aplicó luz infrarroja, para registrar el valor de fluorescencia mínima (F_o') bajo una condición lumínica (Figura 1).

Para determinar $\Phi_{\text{PSII}} = F_q'/F_m' = F_m' - F_s / F_m'$ (Rendimiento cuántico operacional del PSII), $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} * \text{PAR}$ (Tasa de transporte electrónico relativo) y $\text{NPQ} = F_m - F_m' / F_m'$ (Actividad no fotoquímica, que refleja la disminución de la fluorescencia por la disipación de energía en forma de calor y por la formación del ΔpH a través de la membrana tilacoidal) (Bolhar *et al.*, 1993; D'Haese *et al.*, 2004; Genty *et al.*, 1989; Bolhar-Nordenkampf y Öquist, 1993; Baker y Oxborough, 2008).

Tasa de fijación de bióxido de carbono, transpiración, conductancia estomática y concentración interna de CO_2

Estos parámetros incluyeron tasa de fijación de CO_2 , conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración y concentración interna de CO_2 (C_i). Los datos se registraron mediante un analizador inflarroyo de gases portátil (IRGA), LICOR Li-6400, el cual presenta un sistema de intercambio de gas abierto, es decir, que tiene un flujo neto de aire a través del sistema. Se manejó una temperatura en la hoja de 25°C y una radicación fotosintética activa (PAR) de $1500 \mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se seleccionaron las primeras hojas verdaderas para hacer el registro y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

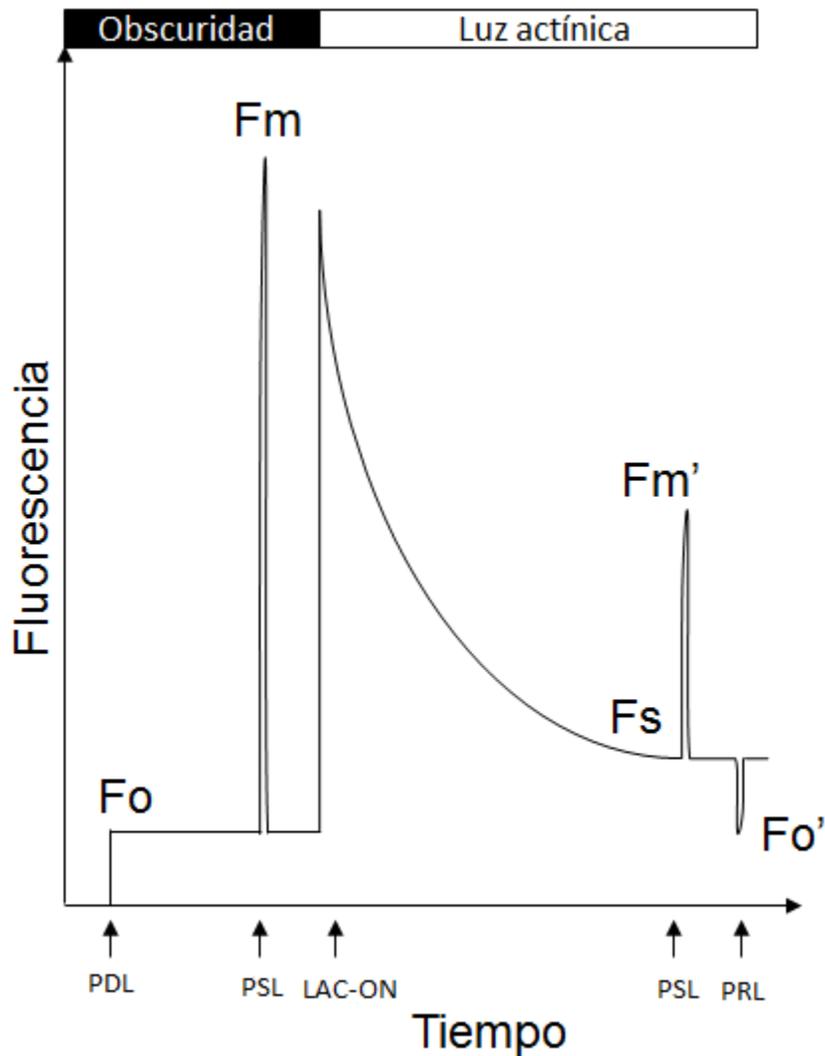


Figura 1. Representación esquemática del protocolo de Genty, 1989, de fluorescencia modulada, para la obtención de qP y NPQ, en hojas previamente acondicionadas a la oscuridad y posteriormente adaptadas a la luz. PDL=pulso débil de luz, PSL=pulso saturante de luz, LAC-ON=luz actínica constante de encendida, LAC-OFF=luz actínica constante apagada, PRL=pulso de luz rojo lejano.

5.6 Respiración

La tasa de consumo de oxígeno se determinó en un oxímetro (Oxygraph Hansatech, England) con cámara de fase gaseosa, midiendo el consumo en 5 discos de hoja con área de 6.036 cm^2 , inmediatamente después de ser expuestos a una densidad de flujo fotónico de $400 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La tasa de respiración se midió durante 2 minutos después del periodo de iluminación.

5.7 Cuantificación de iones

Se colectaron muestras de raíz, tallo y hoja de plantas expuestas a distintas concentraciones de Cd^{2+} durante 14 días. Las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron durante 48 horas a una temperatura de 70°C para posteriormente triturar hasta polvo fino. Se pesó 0.2 g de material seco y se digirió con 4 ml de una mezcla de ácidos (ácido nítrico: ácido perclórico, 2:1) y 2 ml de H_2O_2 (30 %), se calentaron las muestras hasta volverse transparente la mezcla. Las muestras digeridas se diluyeron en agua desionizada y se determinó la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Cd^{2+} mediante un espectrofotómetro de absorción atómica PYE UNICAM modelo SP 192. Para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones.

5.8 Tratamiento estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones llevadas a cabo. Se aplicó un análisis de varianza de un factor (prueba de ANOVA) así como una prueba de Tukey, para lo cual se utilizó el paquete estadístico SAS®

6. Resultados y discusión

I. Efecto del Cd^{2+} sobre el crecimiento

Cuando las plantas están expuestas a un factor estresante, es común que se produzcan alteraciones que pudieran presentar modificaciones estructurales durante el crecimiento. En el presente estudio se observó que el Cd^{2+} a distintas concentraciones (10, 20 y 30 mg/L) en *Phaseolus vulgaris* L. causó como primer signo de toxicidad retardo en el crecimiento y desarrollo fenológico de las plantas durante los 14 días de exposición, se observaron cambios visibles en su morfología, como disminución del tamaño de la raíz, tallo y hojas (Fig. 2). Cabe destacar que la raíz presentó oscurecimiento, este efecto se puede atribuir a la presencia de numerosas inclusiones oscuras dentro de la mayoría de las células de la raíz, en las vacuolas meristémicas (Rascio *et al.*, 2008).

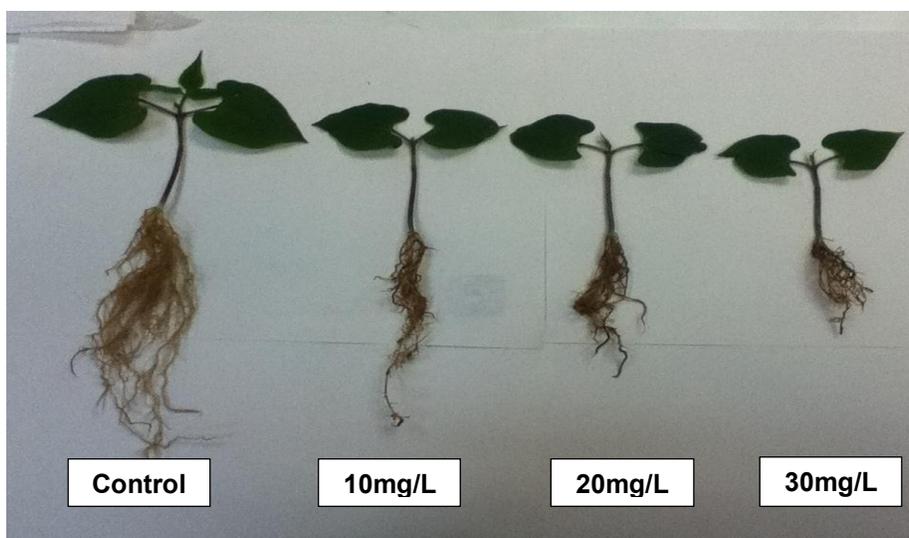


Figura 2. Efecto del Cd^{2+} sobre el crecimiento y desarrollo fenológico de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de exposición. Se muestra una planta tomada al azar de cada tratamiento.

La primera evidencia fenotípica del tratamiento con Cd^{2+} , es la limitación de la producción de biomasa. La inhibición del crecimiento de las plántulas es un efecto común de muchos metales pesados y se puede utilizar como un parámetro para medir la fitotoxicidad (Rascio *et al.*, 2008).

El crecimiento de una planta se establece por la división y expansión celular, que en conjunto con la diferenciación comprenden el desarrollo vegetal (Azcon y Talon, 2008). Como resultado de la exposición a distintos tratamientos con Cd^{2+} las variables de crecimiento evaluadas, relacionadas con el peso seco y el área foliar, se ven afectadas mostrando una tendencia descendente, que fue gradual conforme aumentó la concentración de Cd^{2+} .

La Tasa Media de Crecimiento Relativo (TCR), permite observar el efecto del Cd^{2+} sobre la producción de materia seca después de 14 días de tratamiento, este parámetro mostró una evidente disminución desde el primer tratamiento de Cd^{2+} (10mg/L), con 39.80% y se acentúa con la concentración de Cd^{2+} más alta (30mg/L) evaluada con 59.03%, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tres tratamientos con respecto al control (Fig. 3a).

El índice de área foliar que indica la superficie disponible para la absorción de luz y el potencial fotosintético, se redujo de forma significativa ($p < 0.05$) en todos los tratamientos, pero la mayor disminución se dio cuando la concentración de Cd^{2+} en el medio fue más elevada, de modo que después de 14 días de tratamiento, esta variable bajo la concentración de 30mg/L de Cd^{2+} representó el 56.63% de lo obtenido en el control (Fig. 3b).

La Tasa de Asimilación Neta (TAN), que determina la asimilación de CO_2 en función de la ganancia de masa y área foliar en plantas tratadas con Cd^{2+} durante 14 días, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto al control. El crecimiento en masa de las plantas sometidas a estrés mantiene una relación inversa a la concentración de Cd^{2+} en el medio de crecimiento. Bajo la concentración más baja de Cd^{2+} (10mg/L) la obtención de masa fue menor apenas 23.24% con respecto al control, sin embargo con el tratamiento más alto (30mg/L de Cd^{2+}) representó 53.58% (Fig. 3c).

Los resultados obtenidos en las variables de crecimiento dependieron de la concentración de este metal en el medio de cultivo. Resultados similares se obtuvieron en plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con distintas concentraciones de Cd^{2+} (Skórzynska *et al.*, 1997; Smeets *et al.*, 2005). También se observó este comportamiento en plantas de *Lepidium sativum*, efecto que fue directamente proporcional al incremento de la concentración de Cd^{2+} (Singh *et al.*, 2012).

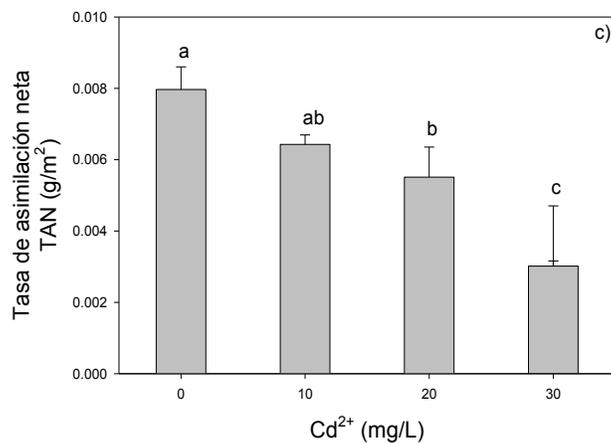
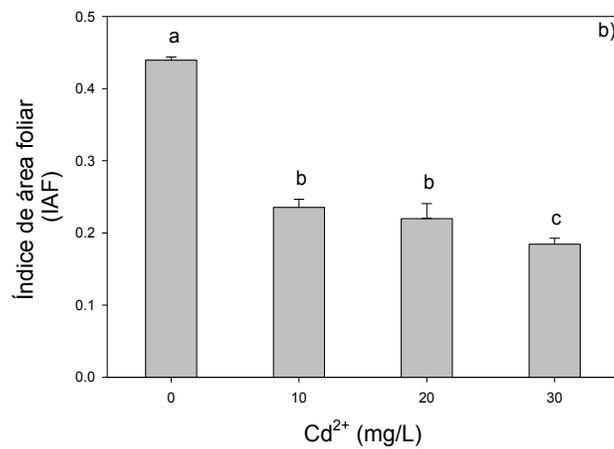
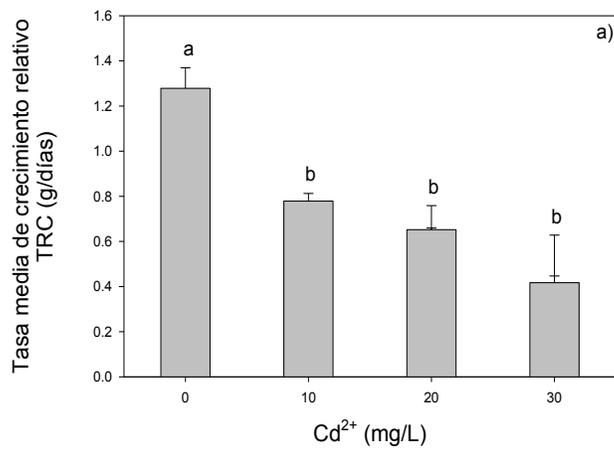


Figura 3. Efecto del Cd²⁺ sobre: a) Tasa media de Crecimiento Relativo (TCR), b) Índice de Área Foliar (IAF) y c) Tasa de asimilación neta (TAN), entre el inicio del tratamiento y transcurridos 14 días en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. n=6 ±. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

La reducción del crecimiento observado a menudo es el resultado de efectos directos por acumulación de Cd^{2+} en los tejidos provocando la alteración de algunos procesos metabólicos o indirectos, limitando la absorción mineral y de agua (Nedjimi y Daoud, 2009).

En las plantas superiores la raíz es el primer órgano que entra en contacto con los iones metálicos, por lo tanto el primer efecto del Cd^{2+} se da en este órgano, puede causar diversos síntomas como oscurecimiento de las puntas, inhibición de la elongación y reducción de la biomasa (Ekmekci *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2012).

La restricción en la producción de biomasa en la raíz de plántulas de frijol tratadas con Cd^{2+} se puede deber a efectos genotóxicos en las células meristémicas, lo que trae como consecuencia la perturbación del patrón de diferenciación celular (Rascio *et al.*, 2008). La presencia de Cd^{2+} en las células de la raíz puede generar ROS tal como superóxido (O_2^{-1}), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) e hidroxilo (OH^{\cdot}) que pueden dar inicio a la peroxidación de fosfolípidos. La peroxidación de la membrana celular afecta su funcionalidad e integridad y puede producir daños irreversibles en la funcionalidad de la célula (Qui *et al.*, 2008). Por otro lado, es posible que una vez dentro de los tejidos el Cd^{2+} interactúe con la calmodulina y evite la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina que actúa como segundo mensajero en eventos de crecimiento y desarrollo de la planta (Clemens *et al.*, 1998).

Probablemente la limitación del crecimiento de las hojas de las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. expuestas a distintas concentraciones de Cd^{2+} se deba a una inhibición en el alargamiento de las células del mesófilo y una disminución en el espesor de la lámina foliar (Rivetta *et al.*, 1997). Dalla Vecchia y colaboradores (2005) en plantas de *Elodea canadensis* tratadas con distintas concentraciones de Cd^{2+} observaron la inhibición de la división celular, pero al mismo tiempo se induce la ampliación de las capas celulares. Una evidencia que apoya estas observaciones, aunque no se evaluó a detalle, es que el tratamiento con Cd^{2+} , parece haber modificado el desarrollo vegetal por una ralentización en la división celular, teniendo como consecuencia el retraso ontogénico, esto se puede ver en la dilación de la aparición de las primeras hojas trifoliadas, mismo que podría relacionarse con la disminución en el Índice de Área Foliar y a la vez la absorción de luz y el potencial fotosintético, de ese modo limitando el crecimiento de las plantas de frijol (Fig. 3b). Aunado a este efecto la disminución en el tamaño de las hojas se puede deber a

un aumento de la producción de ROS, que se incrementan más en la zona de expansión de la lámina de las hojas, pero son casi ausentes en las regiones maduras, aun cuando determinadas concentraciones de ROS son necesarios para la extensión de la hoja (Rodríguez *et al.*, 2002). Por otra parte, el crecimiento celular es controlado por la absorción de agua y las propiedades reológicas de las paredes celulares. La expansión celular cesa debido a que éstas se vuelven menos extensibles, mediante la incorporación de compuestos fenólicos en la pared celular que se acumula en las plantas tratadas con Cd^{2+} (Rodríguez *et al.*, 2002; Drazkiewicz *et al.*, 2005).

Varios autores han sugerido que la disminución del tamaño de las plantas se presenta cuando algunos metales como el Cd^{2+} causan la inhibición de la translocación de fotoasimilados, esto probablemente se deba a que las plantas llevan a cabo mecanismos de aclimatación en el cual la acumulación de azúcares reductores sea para asegurar su sobrevivencia y no para el crecimiento inmediato; con el propósito de restituir el crecimiento cuando el factor estresante se elimine y así las plantas tengan recursos necesarios para mantener el funcionamiento de cada uno de sus tejidos; sin embargo si las condiciones adversas persisten, la poca translocación de fotoasimilados de las hojas a otros órganos de las plantas disminuirá la producción de moléculas necesarias para su óptimo desarrollo (Moya, 1995; Hediji *et al.*, 2010).

Por otro lado la limitación en la producción de biomasa se puede asociar a perturbaciones en la absorción de nutrientes, como ciertos cationes divalentes (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, y Mn) que son cofactores enzimáticos o componentes estructurales de compuestos que tienen carbono y a cambios en la proporción de algunos nutrientes (Leita *et al.*, 1991).

La perturbación de la relación planta-agua es uno de los principales efectos indirectos de la toxicidad de Cd^{2+} y se ha interpretado a través del efecto sobre la función estomática (Gouia *et al.*, 2000). Este efecto trae como consecuencia la reducción de la conductancia estomática y un decrecimiento paralelo de la concentración intercelular de CO_2 (datos mostrados más adelante). Por otro lado la reducción del crecimiento también puede ser causado por la inhibición de la fijación de CO_2 por medio de alteraciones en la actividad de enzimas involucradas en el ciclo de Calvin-Benson (Singh *et al.*, 2012). Esto se puede reflejar en los resultados obtenidos en la Tasa de Asimilación Neta, que muestra una reducción proporcional al aumento de la concentración de Cd^{2+} en el medio y cuyo

parámetro indica la asimilación de CO₂ por área foliar a través de la ganancia de biomasa seca (Fig. 3c).

II. Acumulación y distribución de Cd²⁺

El Cd²⁺ es uno de los metales pesados más tóxico para la mayoría de los seres vivos y no tiene ninguna función biológica descrita. Aunque no es esencial para el crecimiento de las plantas, es fácilmente absorbido por las raíces (Pagliano *et al.*, 2006).

Al ser un metal no esencial se asume que no existen transportadores específicos de entrada en la raíz para el Cd²⁺. Se cree que entre las proteínas responsables de la entrada de Cd²⁺ a la célula se encuentran las proteínas IRT1 y ZIP, que pertenecen a la familia de transportadores de Zn, Fe y otros cationes divalentes (Flores *et al.*, 2009). También se ha descrito que la proteína LCT1, que transporta Ca²⁺ está implicada en la absorción de Cd²⁺ (Rodríguez *et al.*, 2008).

El contenido total de Cd²⁺ en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. se evaluó al final del tratamiento de 14 días. La concentración de Cd²⁺ incremento en todos los tejidos a partir del primer tratamiento de 10 mg/L. De acuerdo al análisis realizado para todos los tratamientos, el Cd²⁺ se acumuló en mayor proporción en el tejido radicular. En el tratamiento de 10 mg/L, el contenido de Cd²⁺ acumulado en la raíz representó el 84% y el 66% para el caso de las plantas expuestas a 30 mg/L del metal. Estos resultados confirman que la raíz es el principal sitio de acumulación de este ion (Fig. 4a).

El contenido de Cd²⁺ en las muestras de tallo mostró un patrón similar al encontrado en la raíz, es decir se incrementó conforme aumentó el metal en el medio de cultivo, sin embargo, la concentración fue menor a lo encontrado en la raíz. Para el tratamiento con 10 mg/L, la concentración de este ion fue de 11% del contenido total acumulado en la planta y este aumentó conforme se incrementó la concentración de Cd²⁺ en el medio de cultivo, alcanzando una concentración de 23% en el tratamiento de 30 mg/L (Fig. 4b).

Como parte del análisis del contenido y distribución de Cd²⁺ en las plantas de frijol tratadas, se determinó la concentración total de este ion en el tejido foliar después de 14 días de exposición al metal.

El contenido de Cd^{2+} en las hojas, mostró un comportamiento similar a los demás órganos evaluados (Fig. 4c). A pesar de que la cantidad de Cd^{2+} foliar fue menor a la encontrada en la raíz y tallo, se observó que éste se incrementó conforme aumentó el contenido del ion en el medio de cultivo. En el tratamiento más bajo (10 mg/L) el ion representó solamente el 4% del contenido total, y en plantas tratadas con 30 mg/L el 9% del total acumulado en la planta. Cabe destacar que aunque la cantidad más alta de Cd^{2+} en los tres tratamientos se encontró en la raíz, el contenido de metal disminuye en este órgano y aumenta de forma proporcional en tallos y hojas (Fig. 4).

Numerosos estudios indican que la mayor concentración de Cd^{2+} absorbido es retenido en la raíz (Hediji *et al.*, 2010; Gouia *et al.*, 2003; Leita *et al.*, 2004), así mismo Singh y colaboradores (2012) al trabajar con plantas de *Lepidium sativa* L. encontraron que alrededor del 75 % de Cd^{2+} es retenido en la raíz. Por otro lado Mishra y colaboradores en el 2006 reportaron que la acumulación de Cd^{2+} en los distintos órganos depende de la concentración del ion metálico en el medio y la duración del tratamiento siendo las raíces el órgano que más acumula este ion con 80.6% seguido del tallo con 11.9% y solo 7.4% fue translocado a las hojas.

En la presente investigación, la cantidad de Cd^{2+} translocado a la parte aérea, tallo y hojas (Fig. 4c) fue de 21 a 7 veces (en el tratamiento de 10 y 30 mg/L respectivamente) menor que lo encontrado en la raíz. Estos resultados coinciden con lo reportado en plantas de arroz por Rascio y colaboradores (2008), quienes mencionan que la concentración de Cd^{2+} encontrada en las hojas representaba menos del 10% del contenido total de la planta. Leita y colaboradores (1991) sugirieron que el tallo parece tener la capacidad de acumular progresivamente Cd^{2+} como una función de la concentración de Cd^{2+} en la raíz, con una tendencia que muestra una sucesiva saturación de sitios intercambiables a lo largo de la vía de translocación, de esta manera la acumulación excesiva del ion en las hojas se evita de tal manera que parece existir una barrera fisiológica eficiente.

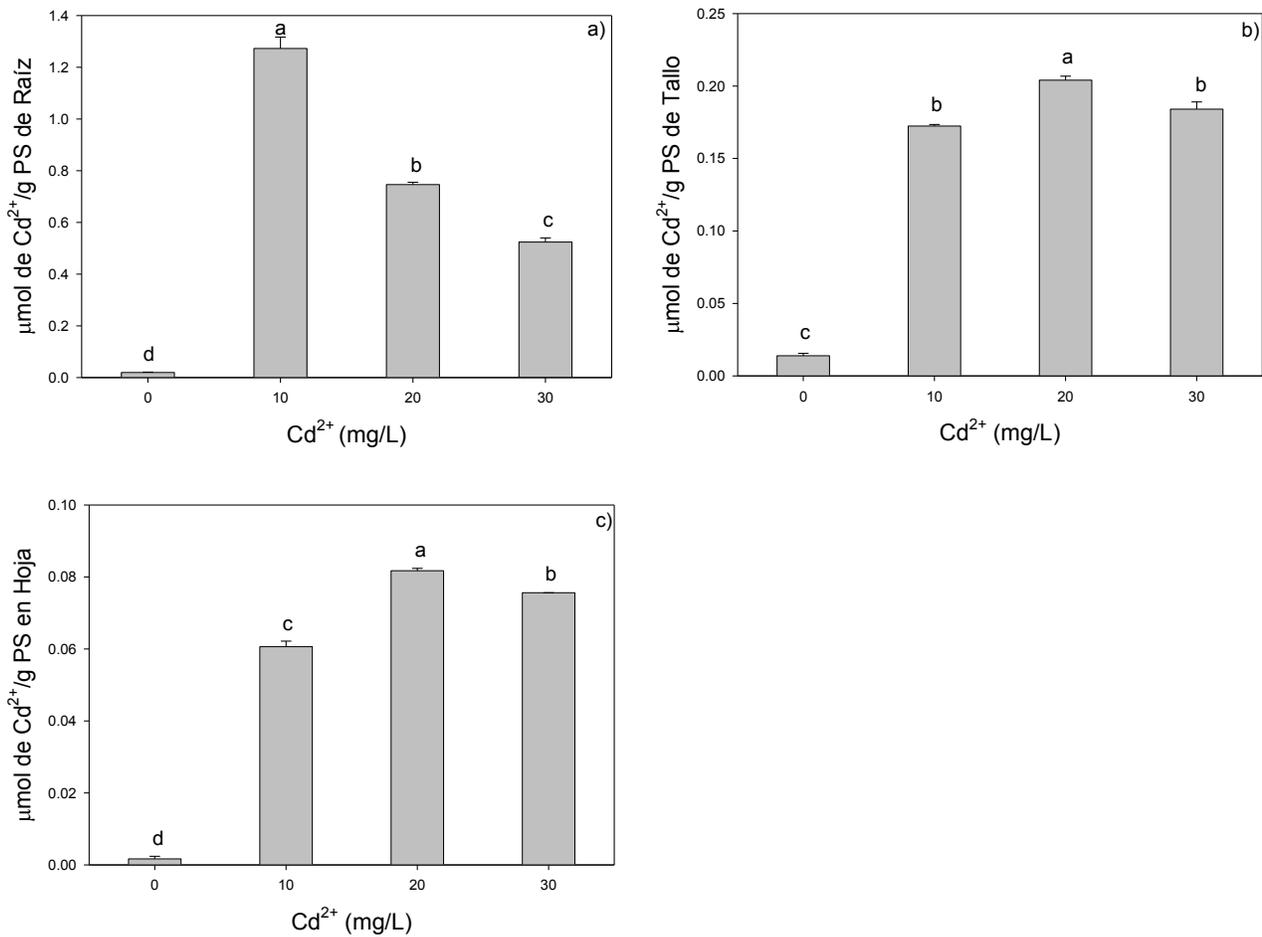


Figura 4. Concentración de Cd²⁺ (μmol/g de peso seco (PS)) en: a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. Para raíz y tallo n=2 y para hojas n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

La acumulación de Cd²⁺ en la raíz indica que este órgano funge como una barrera muy eficaz que evita hasta cierto punto la translocación del ion al resto de la planta. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la retención de Cd²⁺ en la raíz, como: la inmovilización en la pared celular, en los carbohidratos extracelulares como las pectinas y ácidos orgánicos como el oxalato y malato; sin embargo una vez que el Cd²⁺ entra a la célula puede ser capturado por la acción de glutatión (GSH), fitoquelatinas (PCs) o metalotioneínas en el citosol y es transportado a compartimentos como las vacuolas, que son más numerosas y grandes en plantas sometidas a concentraciones altas con metales pesados (Nedjimi y Daoud, 2009; Mishra *et al.*, 2006; Leita *et al.*, 1991). Asociado a estos sistemas de quelación y desintoxicación, Hediji y colaboradores (2010) reportaron la

función quelante de algunos aminoácidos tales como el aspartato y la aspargina que además son precursores de algunos péptidos quelantes.

Las PC son los principales péptidos que forman complejos con los metales pesados en plantas. Estas se sintetizan por la acción de la enzima γ -glutamylcisteína transpeptidasa dipeptidil, también llamada fitoquelatina sintasa (PCS). La enzima se expresa constitutivamente, pero puede ser regulada a nivel transcripcional y traduccional por la presencia de metales y metaloides (Mishra *et al.*, 2006). Las PCs reducen la concentración del metal libre en el citosol mediante la unión y transporte a la vacuola y la pared celular (Mohamed *et al.*, 2012). La capacidad quelante de las PCs reside en el alto porcentaje de residuos sulfhidrilo presentes en la cisteína que se unen a los iones metálicos formando complejos estables (Srivastava *et al.*, 2004; Iannelli *et al.*, 2002). Las PCs pueden transportar los iones metálicos de la raíz a otros sitios y por lo tanto la cuantificación del metal en diferentes partes de la planta puede correlacionar la producción de PC con la acumulación de metales y su transporte (Mishra *et al.*, 2006).

La exclusión, retención e inmovilización de metales pesados en el sistema radicular, es característico de muchas especies y puede ser considerado como un mecanismo importante de protección contra la difusión al resto de la planta. Sin embargo la propensión de las plantas a transportar y acumular Cd^{2+} en los tallos, hojas y frutos depende de varios factores como el tipo de suelo, factores climáticos y el genotipo de la planta (Ranieri *et al.*, 2005).

A pesar de las distintas estrategias desarrolladas por las plantas para retener el Cd^{2+} en la raíz, en este experimento se observó que una pequeña cantidad del ion fue transportado hacia los tallos y hojas (de 11 a 23 % y de 4 a 9 %, respectivamente) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento (Fig. 4 b y c). López y colaboradores (2009) atribuyen la movilización del Cd^{2+} del sitio de absorción a la parte aérea, en plantas de tomate, a una sobrecarga del ion en la raíz, es decir, los mecanismos de desintoxicación presentes en este órgano se ven superados por el aumento del contenido de Cd^{2+} en el medio. Otra hipótesis establecida para la movilización del ion es el daño inmediato de la membrana celular de la raíz, permitiendo la entrada del ion y su difusión en la planta (Vassilev *et al.*, 2002).

El transporte de Cd^{2+} desde la zona de absorción hacia los tallos y hojas parece estar controlado por la transpiración y por la conductancia estomática. El proceso de transpiración se encarga de controlar el flujo de agua e iones a través del xilema de la planta (Iannelli *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2012; Mobin *et al.*, 2007, Salt *et al.*, 1995). Liu y colaboradores (2010) en plantas de *P. americana* tratadas previamente con ABA reportaron que la transpiración podría estar implicada en el transporte de Cd^{2+} a través del xilema, ya que el tratamiento con ABA causó el cierre de los estomas y por ende la disminución de la tasa de transpiración, lo que ocasionó la reducción de la translocación de Cd^{2+} a través de la planta. De acuerdo con Ingwersen y Streck, (2005) en zonas de riego con aguas residuales, la transpiración de los cultivos juega un papel importante en la absorción de Cd^{2+} .

En este estudio se observó que a pesar de que hubo una disminución no significativa de la tasa de transpiración (datos mostrados más adelante), la cantidad de Cd^{2+} aumentó constantemente con el incremento de la concentración del catión en el medio de cultivo. En los tallos el aumento fue de 11 a 23% y en hojas de 4 a 9% en el tratamiento de 10 y 30 mg/L, respectivamente, por lo tanto el xilema pareciera no ser la única vía de transporte de este catión. Se ha sugerido en diversos estudios que el transporte de metales pasados se puede llevar a cabo a través del floema y puede ser facilitado también por el transporte a través de los transportadores de membrana (Haag-Kerwer *et al.*, 1999; Nedjimi y Daoud, 2009; Mohamed *et al.*, 2012).

III. Efecto del Cd^{2+} sobre el contenido iónico

La distribución de nutrientes inorgánicos en las plantas se puede explicar por la ruta de transporte que toma dicho elemento a través de la planta y a partir de las propiedades de almacenaje de las células que se encuentran en contacto con dicho elemento, durante su transporte (Conn y Gilliam, 2010).

En presencia de factores de estrés, el desequilibrio iónico en la planta resulta frecuentemente en desordenes nutrimentales que se pueden deber a la disponibilidad de cada uno de ellos, a la competencia en el consumo, transporte o distribución dentro de la planta o a alteraciones fisiológicas para la utilización de un nutriente determinado (Grattan y Grieve, 1999).

a. Contenido de Ca^{2+}

El contenido total de Ca^{2+} en raíz, tallo y hojas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd^{2+} (10, 20 y 30 mg/L) se evaluó después de 14 días de tratamiento.

La concentración de Ca^{2+} presente en las raíces se incrementó conforme aumentó el contenido de Cd^{2+} en el medio de cultivo, el aumento representó el 8% en el tratamiento de 10 mg/L, 52% y 55% para 20 y 30 mg/L de Cd^{2+} , sin embargo no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control para los tres tratamientos (Fig. 5a).

Por otro lado el contenido de Ca^{2+} en el tallo disminuyó conforme aumentó la concentración de Cd^{2+} en el medio (Fig. 5b). El decremento se hizo evidente con el tratamiento más bajo (10 mg/L) con 72% de lo obtenido en las plantas del grupo control, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tres tratamientos con respecto a las plantas no tratadas.

En el caso de las hojas, el contenido de Ca^{2+} mostró una patrón similar a lo observado en el tallo, con un decremento del 43% en el tratamiento de 10 mg/L y 47% para 20 y 30 mg/L de Cd^{2+} , de lo obtenido en las hojas de *Phaseolus vulgaris* L. sin tratar, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tres tratamientos con respecto al control (Fig. 5c).

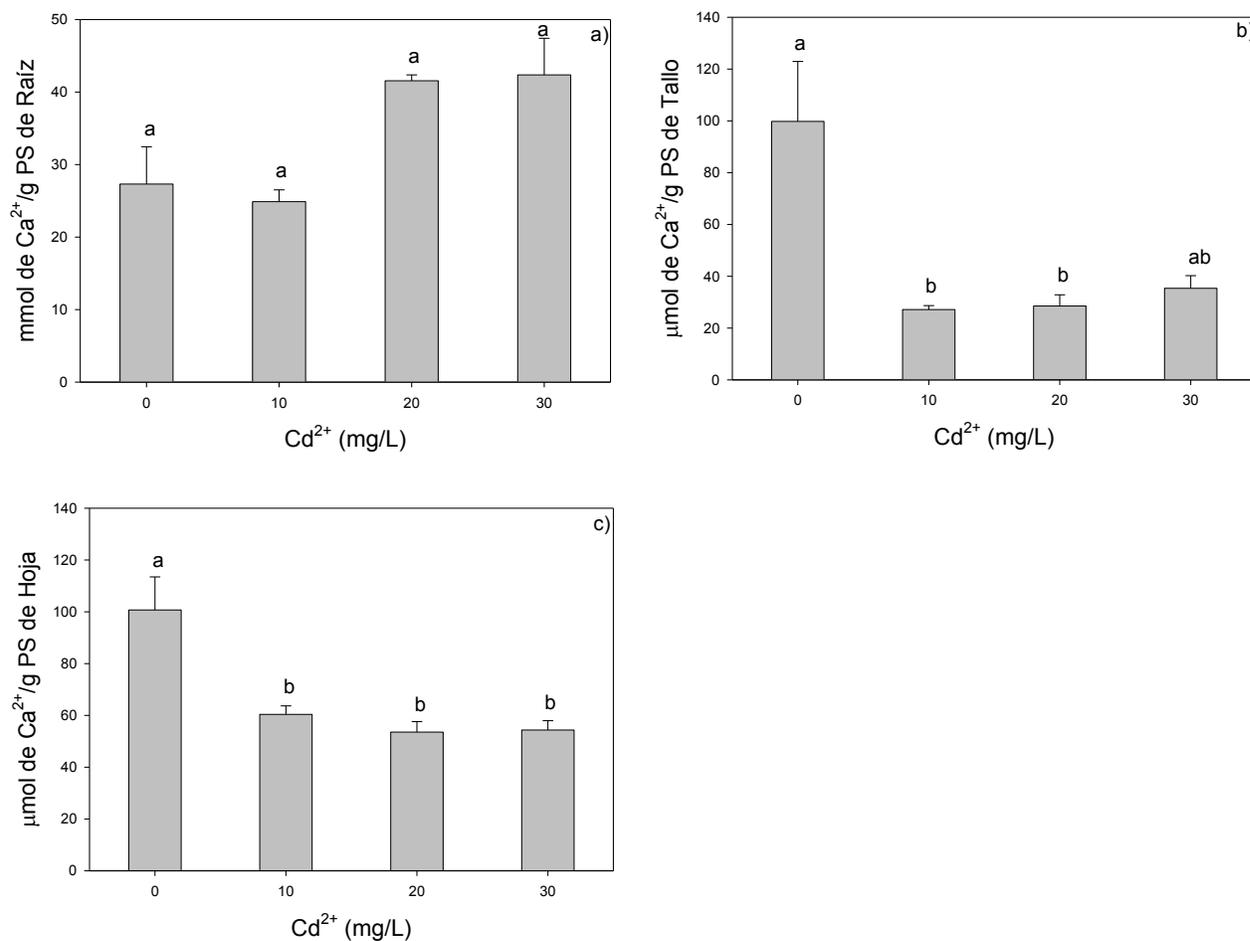


Figura 5. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de Cd²⁺ sobre la distribución de Ca²⁺ (μmol/g de peso seco (PS) en los distintos órganos: a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. Para raíz y tallo n=2 y para hojas n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

b. Contenido de Mg²⁺

El contenido de Mg²⁺ en la masa seca de raíces tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺ no mostró un comportamiento definido, ya que se mantiene sin cambios significativos (p<0.05) en los tres tratamientos con respecto a las plantas del grupo control (Fig. 6a).

De acuerdo al análisis realizado el contenido de Mg²⁺ en tallos de plantas tratadas de frijol muestra una tendencia atenuante (Fig. 6b), de apenas 24% para el tratamiento de Cd²⁺ más alto (30 mg/L), sin cambios significativos (p<0.05) con respecto a las plantas del grupo control.

En hojas de *Phaseolus vulgaris* L. el contenido de Mg^{2+} , no se vio afectado de manera significativa ($p < 0.05$), sin embargo se observa una tendencia ascendente en el contenido de este ion de 30% para el tratamiento de 30 mg/L de Cd^{2+} de lo obtenido en las plantas sin tratar (Fig. 6c).

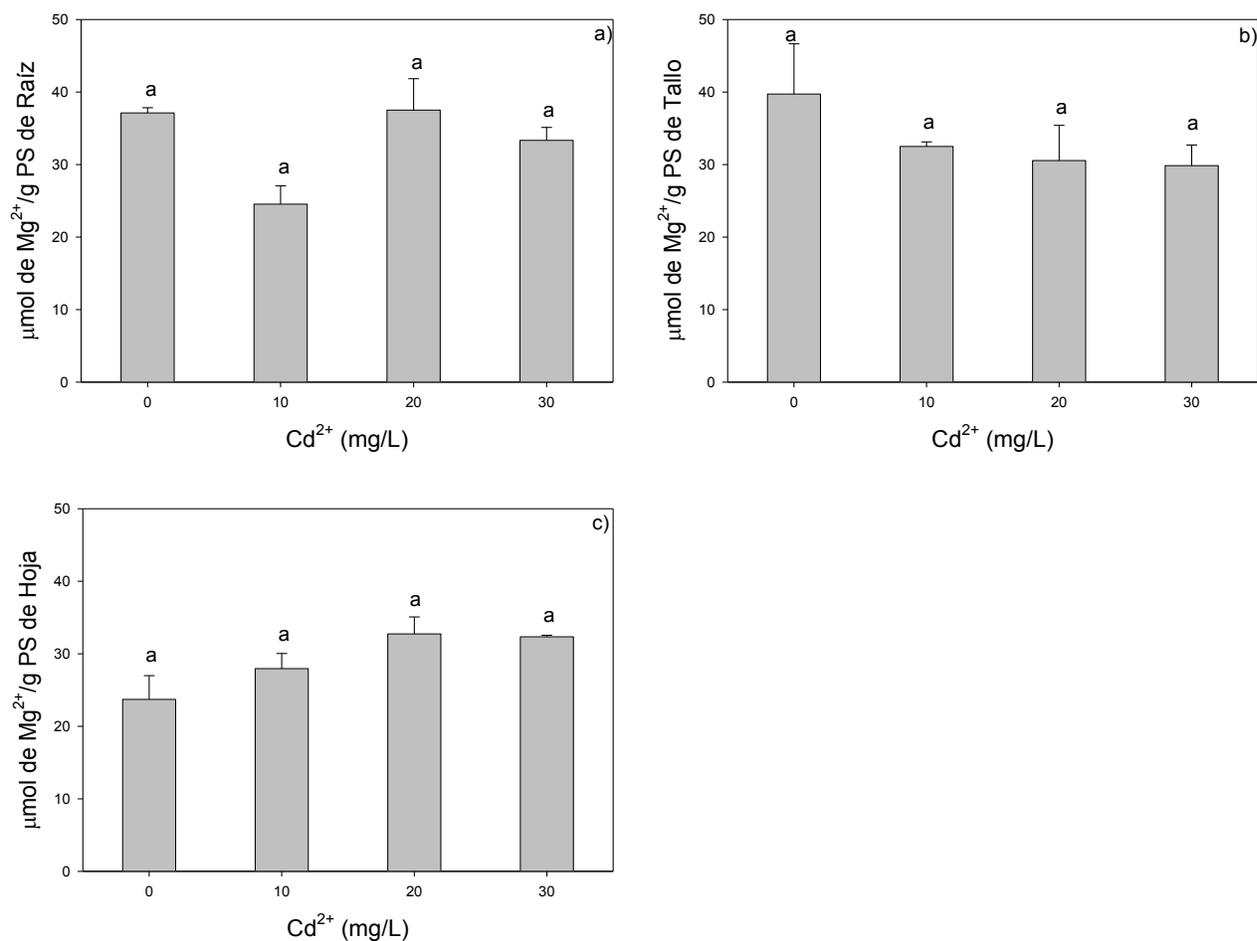


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de Cd^{2+} sobre la distribución de Mg^{2+} ($\mu\text{mol/g}$ de peso seco (PS)) en los distintos órganos: a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días. Para raíz y tallo $n=2$ y para hojas $n=4$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$.

c. Contenido de K^+

Como parte del análisis de distribución de iones en las plantas, se determinó la concentración de K^+ en raíces, tallos y hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. bajo estrés por Cd^{2+} después de 14 días de tratamiento.

Los iones de K^+ en raíz, mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$), con respecto al grupo control para los tres tratamientos, que se relacionó con el incremento del contenido de Cd^{2+} en el medio. El aumento más evidente se observó en plantas tratadas con 10 mg/L de Cd^{2+} con 21% de lo encontrado en las plantas sin tratar (Fig. 7a).

La cantidad de iones K^+ encontrada en la biomasa de los tallos, no mostró cambios significativos ($p < 0.05$) en los distintos tratamientos (10, 20 y 30 mg/L de Cd^{2+}) con respecto al control (Fig. 7b).

Es interesante notar que el ion K^+ en hojas tiende a acumularse de la misma forma que en la raíz. El aumento de K^+ en este órgano se correlaciona con el incremento de Cd^{2+} en el medio encontrando una acumulación que va de 7 a 18% de lo obtenido en plantas sin tratar. El incremento observado fue significativo ($p < 0.05$) para los tres tratamientos con respecto al grupo control (Fig. 7c).

Se sabe que muchos metales pesados actúan como antagonistas para la absorción de otras especies catiónicas. En particular, el Cd^{2+} tiene una influencia antagonista sobre la absorción y distribución a través de la planta de algunos cationes divalentes como Zn, Cu, Ni, Fe, Mg, Ca y Mn (Maleva *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el Cd^{2+} ocasiona la acumulación del Ca^{2+} en la raíz (Fig. 5a), en el caso del contenido de Mg^{2+} se observa una disminución que no fue significativa con respecto al control (Fig. 6a). Esta influencia se puede deber a la competencia que se lleva a cabo entre los iones a nivel de transportadores de membrana como las proteínas IRT1, ZIP y LCT1, y a la concentración de cada catión en el medio (Flores *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2008).

Clemens y colaboradores en 1998 observaron que el Cd^{2+} compite con el Ca^{2+} y otros cationes en el tonoplasto celular. Esta competencia afecta principalmente el transporte en las células de la raíz (Kim *et al.*, 2002).

Con respecto a lo anterior Suzuki (2005), así como Ghnaya y colaboradores (2007) encontraron que la adición de Ca^{2+} al medio puede disminuir la toxicidad de Cd^{2+} en

algunas plantas como *Sesuvium portulacastrum* y *Mesembryanthemum crystallinum*, lo que confirma la hipótesis de la competencia entre los cationes.

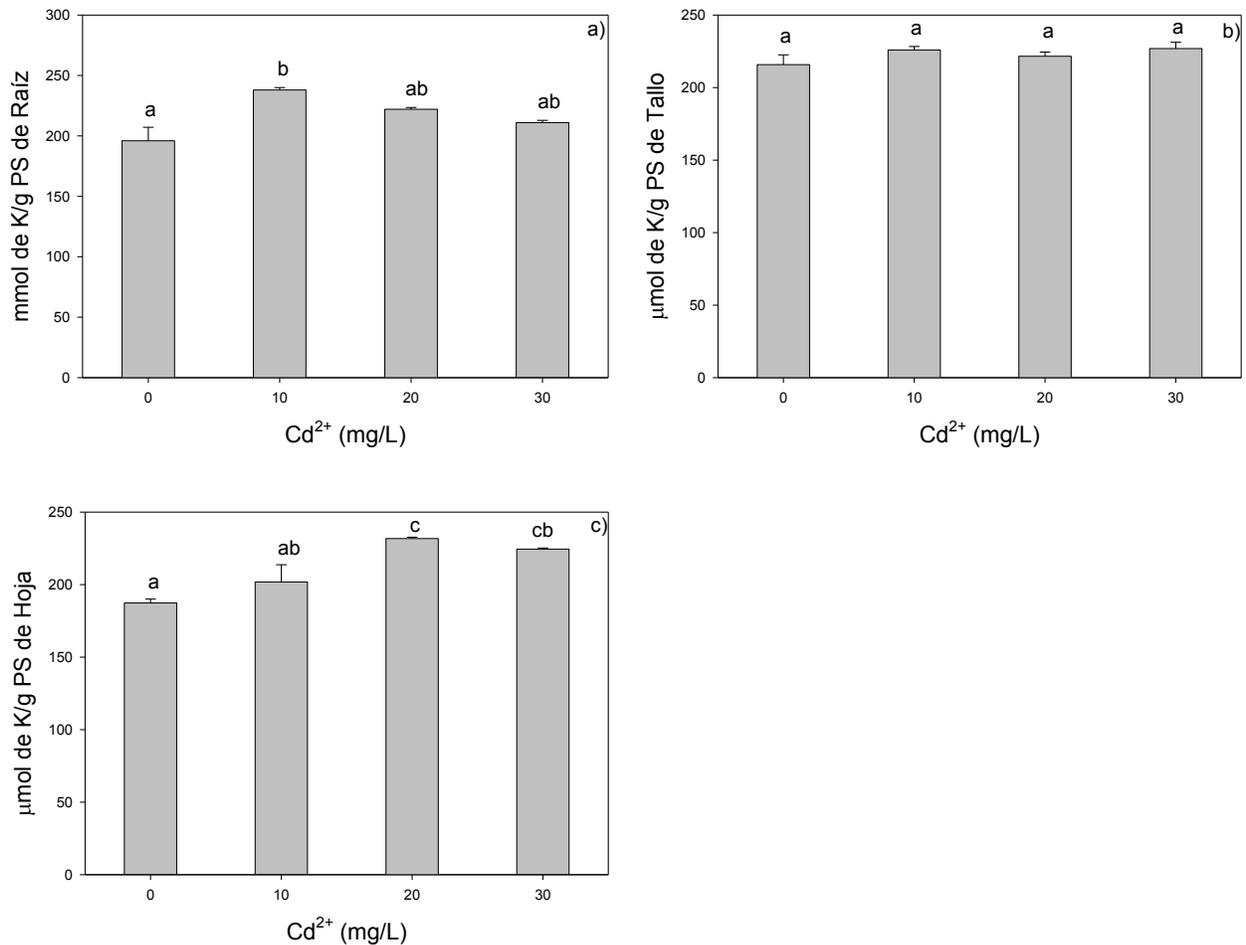


Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de Cd²⁺ sobre la distribución de K⁺ (μmol/g de peso seco (PS)) en a) Raíz, b) Tallo y c) Hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. Para raíz y tallo n=2 ± y para hojas n=4 ±. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

La restricción en la translocación de Ca²⁺ a través de los tallos hacia las hojas en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días se puede deber a la retención del ion por la formación de cristales de oxalato en los vasos del xilema (Barceló y Poschenrieder, 1990; Nedjimi y Daoud, 2009). Se ha observado en varias especies de plantas que la restricción en el crecimiento se relaciona con la perturbación en la absorción de Ca²⁺ (Ghnaya *et al.*, 2007). El contenido de Mg²⁺ en tallos y hojas de plantas de frijol no mostró

cambios significativos, sin embargo, en hojas se observó un aumento exiguo que podría estar relacionado de algún modo con la acumulación de pigmentos fotosintéticos (datos mostrados más adelante). La perturbación en el contenido de ambos cationes divalentes podría provocar alteraciones en el metabolismo de las plantas tratadas con Cd^{2+} ; principalmente en lo que respecta a la actividad fotosintética, ya que por un lado el Ca^{2+} es un componente fundamental del clúster $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ del complejo emisor de oxígeno (CLO) del PSII y por otro lado el Mg^{2+} es el centro activo de la clorofila, presente en el complejo antena (LHC) del PSII y PSI así como en el centro de reacción (RC) de ambos fotosistemas.

Por otro lado el contenido de K^+ en la raíz y hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tiende a incrementarse (Fig. 7 b y c). Si bien el Cd^{2+} no tiene ninguna similitud química con el K^+ se ha sugerido que este metal pesado ejerce un efecto indirecto sobre su absorción (Asp *et al.*, 1994; citado por Nedjimi y Daoud, 2009) probablemente por la unión de los iones de Cd^{2+} a los grupos sulfhidrilo y la peroxidación lipídica de la membrana de la raíz lo que conduce a cambios en la permeabilidad de la membrana, facilitando de esta forma la difusión del K^+ a través de la planta (Vassilev *et al.*, 2002). El K^+ es un macro nutriente que tiene un papel importante en la regulación de la turgencia, en el balance de carga, movimiento de la hojas, y en la apertura estomática (antiporte entre K^+ y Cl^-) entre otros (Sanders *et al.*, 1996). La movilización y acumulación de K^+ en las hojas se puede deber también a estrategias de tolerancia debido al estrés hídrico causado por el Cd^{2+} , ya que el K^+ es responsable de modificar alternativamente el potencial osmótico de las células guarda y circundantes para el cierre de los estomas (datos mostrados más adelante) y reduciendo de esta manera la pérdida de agua.

El patrón de la disminución o acumulación y translocación de K^+ , Ca^{2+} , y Mg^{2+} puede explicarse en parte por el hecho de que las plantas absorben iones como equivalentes químicos y el efecto sobre cualquiera puede influir en las concentraciones de los otros lo que ocasiona, probablemente, cambios muy serios en el estado mineral de la planta, alterando sus funciones reguladoras (Mohamed *et al.*, 2012; Vassilev *et al.*, 2002).

IV. Efecto del Cd²⁺ sobre la conductancia estomática, la tasa de transpiración, la concentración interna de CO₂ y la tasa de fijación de CO₂

El estrés inducido por los metales pesados ocasiona perturbaciones en el estatus hídrico de las plantas, sin embargo la mayoría de los estudios se centra en sus efectos a largo plazo (Barceló y Poschenrieder, 1990). Estos efectos negativos probablemente solo sean algunas de las primeras manifestaciones de la toxicidad de los metales pesados (Kholodova *et al*, 2011).

En plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días con distintas concentraciones de Cd²⁺ (10, 20 y 30 mg/L) se observó que la conductancia estomática disminuye gradualmente conforme aumenta la concentración del ion en el medio (Fig. 8a). Esta disminución se acentuó con el tratamiento más alto (30mg/L), representando el 41% de lo obtenido en las plantas del grupo control, se encontraron diferencias significativas (p<0.05). La tasa de transpiración tiende a disminuir gradualmente (Fig. 8b), siendo la disminución más representativa con 33% la del tratamiento de 20 mg/L de Cd²⁺, sin embargo no hay diferencias significativas (p<0.05) con respecto a las plantas del grupo control.

La concentración interna de CO₂ (C_i) tiende a aumentar de forma proporcional al aumento de Cd²⁺ en el medio (Fig. 8C), sin embargo no hay diferencias significativas (p<0.05) entre los tratamientos y el grupo control. El aumento observado fue del 23% de lo obtenido en las plantas sin tratar cuando son expuestas a 30 mg/L de Cd²⁺.

La tasa de asimilación de CO₂ tiene un comportamiento similar al observado en la conductancia estomática, ya que disminuye de forma proporcional al aumento de la concentración de Cd²⁺ en el medio (Fig. 8d); la disminución se hizo evidente en este parámetro a partir del primer tratamiento de Cd²⁺ (10 mg/L) con 32 % y con el tratamiento más elevado (30 mg/L) 48 % de lo obtenido en las plantas de frijol sin tratar, se observaron diferencias significativas (p<0.05) con respecto a las plantas del grupo control.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con distintas concentraciones de Cd²⁺ generó una condición de estrés en las plantas a los 14 días de tratamiento. Estudios similares en otras especies de plantas han demostrado que después de la aplicación de

Cd^{2+} al medio se observa el cierre de los estomas y la disminución de la tasa de transpiración (Gouia *et al.*, 2003; Kholodova *et al.*, 2011; Rascio *et al.*, 2008). Así mismo Liu y colaboradores (2010) en plantas de *P. americana* reportaron que después de la aplicación de 10 y 100 μM de Cd^{2+} la conductancia estomática y la transpiración disminuyen significativamente.

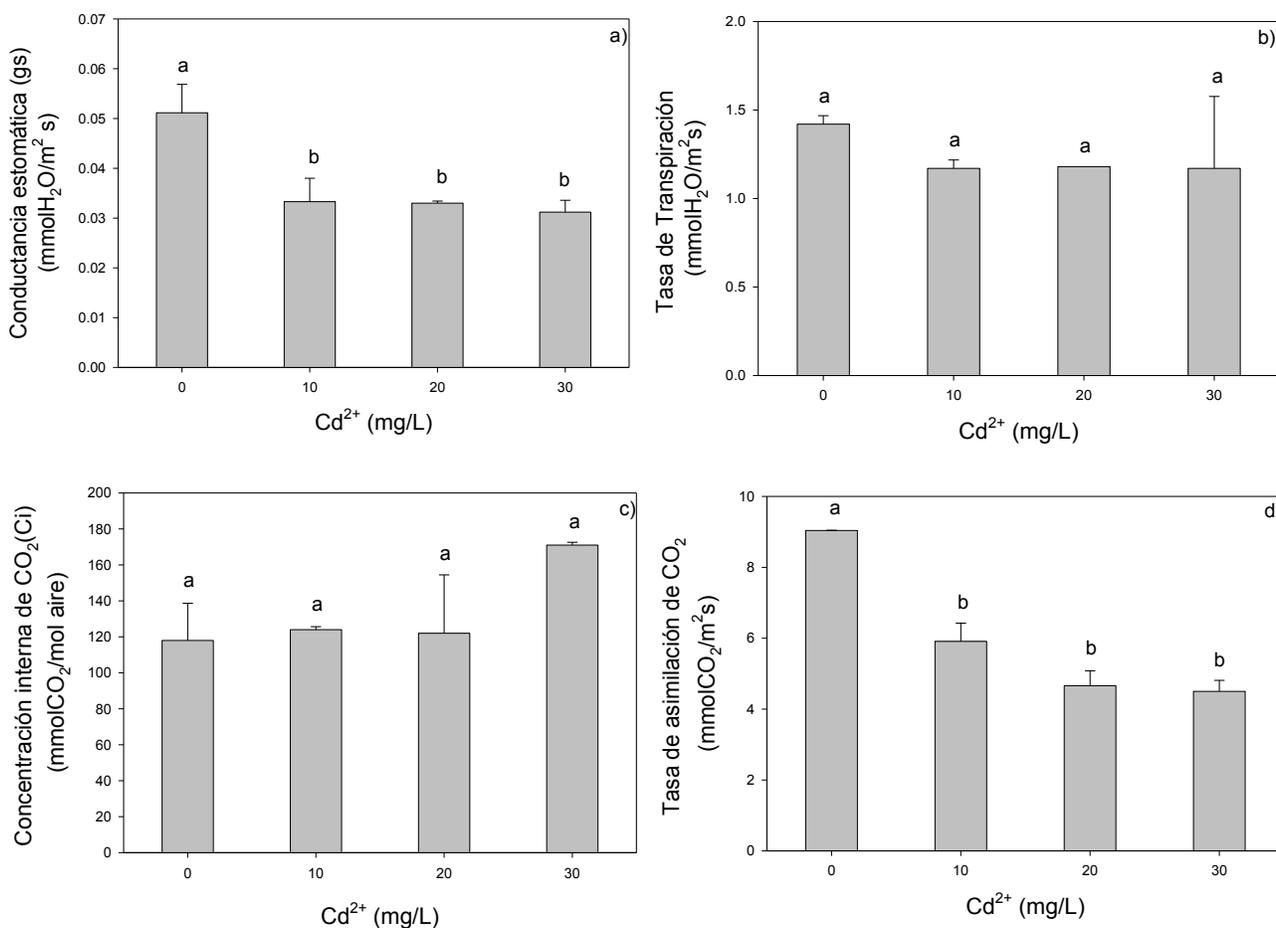


Figura 8. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de Cd^{2+} (10, 20 y 30 mg/L) sobre: a) Conductancia estomática (gs), b) Tasa de Transpiración, c) Concentración interna de CO_2 (Ci) y d) Tasa de asimilación de CO_2 en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. $n=3$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$.

En las plantas, los estomas se pueden considerar como una puerta vital entre la planta y la atmósfera y pueden desempeñar un papel central en la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales. Por ejemplo, una disminución de la conductancia estomática (gs) causada por diversas alteraciones estomáticas (por ejemplo, en la densidad y/o

estructura) es una característica común de la respuesta de la hoja a muchos factores de estrés tales como la deficiencia de agua, estrés salino y la toxicidad de metales pesados (Ying *et al.*, 2010; Flexas *et al.*, 2008).

El cierre rápido de los estomas por perturbaciones directas sobre su funcionamiento o por cambios en el estado hídrico de las plantas, generalmente va acompañado de una acumulación de CO₂ intracelular (Ci) y un descenso en la fijación de CO₂ (Kholodova *et al.*, 2011; Ying *et al.*, 2010). Esto coincide con lo encontrado en este estudio ya que el tratamiento con Cd²⁺ en plantas de frijol provocó un ligero aumento de Ci (sin diferencias significativas con respecto al grupo control) y la disminución de la fijación de CO₂ (Fig. 8 c y d). Así mismo Gouia y colaboradores (2003) en plantas de frijol tratadas con distintas concentraciones de CdCl₂ reportaron cambios en la absorción de CO₂, que fue acompañada por la disminución de la tasa de transpiración, indicando un cierre parcial de los estomas.

La alteración de los parámetros de intercambio gaseoso, podría ser atribuido a una anomalía en los estomas, como disminución de la densidad estomática por unidad de área foliar, un aumento en la resistencia estomática y cierre de los estomas (Ying *et al.*, 2010; López *et al.*, 2009). Estas alteraciones se pueden explicar en parte por la posibilidad de que el Cd²⁺ puede interferir directamente con la señalización del Ca²⁺ y la regulación de la calmodulina (Perfus *et al.*, 2002) o puede inhibir concisamente la división celular (Zhu *et al.*, 2005). También se puede deber al estrés hídrico inducido por alteraciones en la estructura de las acuaporinas, por unión del Cd²⁺ a los grupos sulfhidrilo presentes en estos transportadores de membrana en cargados de transportar el agua a través de la célula, la llamada ruta simplástica.

Aunado a este posible efecto sobre los estomas, se ha reportado que el Cd²⁺ altera el grosor del mesófilo (Tang *et al.*, 2013), estos cambios morfológicos en las hojas pueden ser responsables de la limitación del intercambio gaseoso. Se ha observado que la limitación de la difusión de CO₂ en las hojas de muchas especies de plantas tratadas con Cd²⁺ es la principal causa de la inhibición de la fotosíntesis y del crecimiento. El CO₂ se difunde desde la cavidad subestomática a través de los espacios intercelulares vacíos hacia las paredes de las células del mesófilo, cruza las paredes de las células y el citosol, llega al cloroplasto, donde se combina con la RuBP (ribulosa -1-5-bifosfato) y entra al ciclo

de Calvin-Benson (Taiz y Zeiger, 2006). La ruta tomada por el CO₂, desde la atmósfera al sitio de la carboxilación hacen que los estomas y el mesófilo sean estructuras claves que determinan la velocidad de difusión de CO₂ en la hoja (Zhu *et al.*, 2005; Singaas *et al.*, 2004).

La eficiencia de la difusión de CO₂ en el mesófilo puede verse afectada por una amplia variedad de factores asociados con el estado de crecimiento y desarrollo de las hojas, así como en la disposición del mesófilo con respecto a la membrana plasmática (Singaas *et al.*, 2004). Con respecto a lo anterior Tang y colaboradores (2013) reportaron una disminución del espesor de la hoja en plantas tratadas con altas concentraciones de Cd²⁺ y por ende una disminución en la capacidad del mesófilo.

Sin embargo, Chugh y Sawhney (1999) señalaron que el efecto tóxico del Cd²⁺ sobre la fijación de CO₂ en plantas de frijol podría deberse a una interferencia más directa del metal, sobre diferentes etapas de las reacciones del ciclo Calvin-Benson. Se ha reportado en numerosos estudios que la presencia de Cd²⁺ en el estroma de los cloroplastos ocasiona la reducción de la actividad de algunas enzimas presentes en este ciclo, principalmente la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxidasas (RUBISCO), responsable de la carboxilación del CO₂; NADP⁺-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, presente en la fase de reducción del 3-fosfoglicerato; la aldolasa y la fructosa-1,6-bisfosfatasa, enzimas presentes en la fase de regeneración del aceptor de CO₂ y la ribulosa-1,5-bisfosfato (RUBP) (Ying *et al.*, 2010 ; Ci *et al.*, 2010).

Estas enzimas contienen uno o más puentes disulfuro (-S-S-). La luz controla la actividad de estas enzimas a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina, un mecanismo basado en la oxidación-reducción de un grupo tiol covalente, en oscuridad, estos residuos se encuentran en la forma oxidada (-S-S-), estando inactivas o subactivas. En presencia de luz, los grupos -S-S- son reducidos al estado sulfhidrilo (-SH-SH-). Este cambio redox conduce a la activación de estas enzimas (Taiz y Zeiger, 2006). Es posible que la interacción del Cd²⁺ con los grupos sulfhidrilos (-SH) funcionales presentes en estas enzimas sea el mecanismo de acción responsable de su inactivación (Franco *et al.*, 1999), lo que podría contribuir a la disminución de la asimilación de CO₂ observada en este trabajo.

V. Efecto del Cd²⁺ sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos

La concentración de pigmentos fotosintéticos de hojas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺ (10, 20 y 30 mg/L) durante 14 días se muestra en la Figura 9. La tendencia general de los tres pigmentos fue de aumentar en todos los tratamientos de Cd²⁺ (32.77, 29.97 y 44.06% para clorofila a, b y carotenoides, respectivamente, en el tratamiento de 30mg/L). El análisis estadístico determinó que solo existen diferencias significativas (p<0.05) en el contenido de clorofila b para los tres tratamientos con respecto al grupo control.

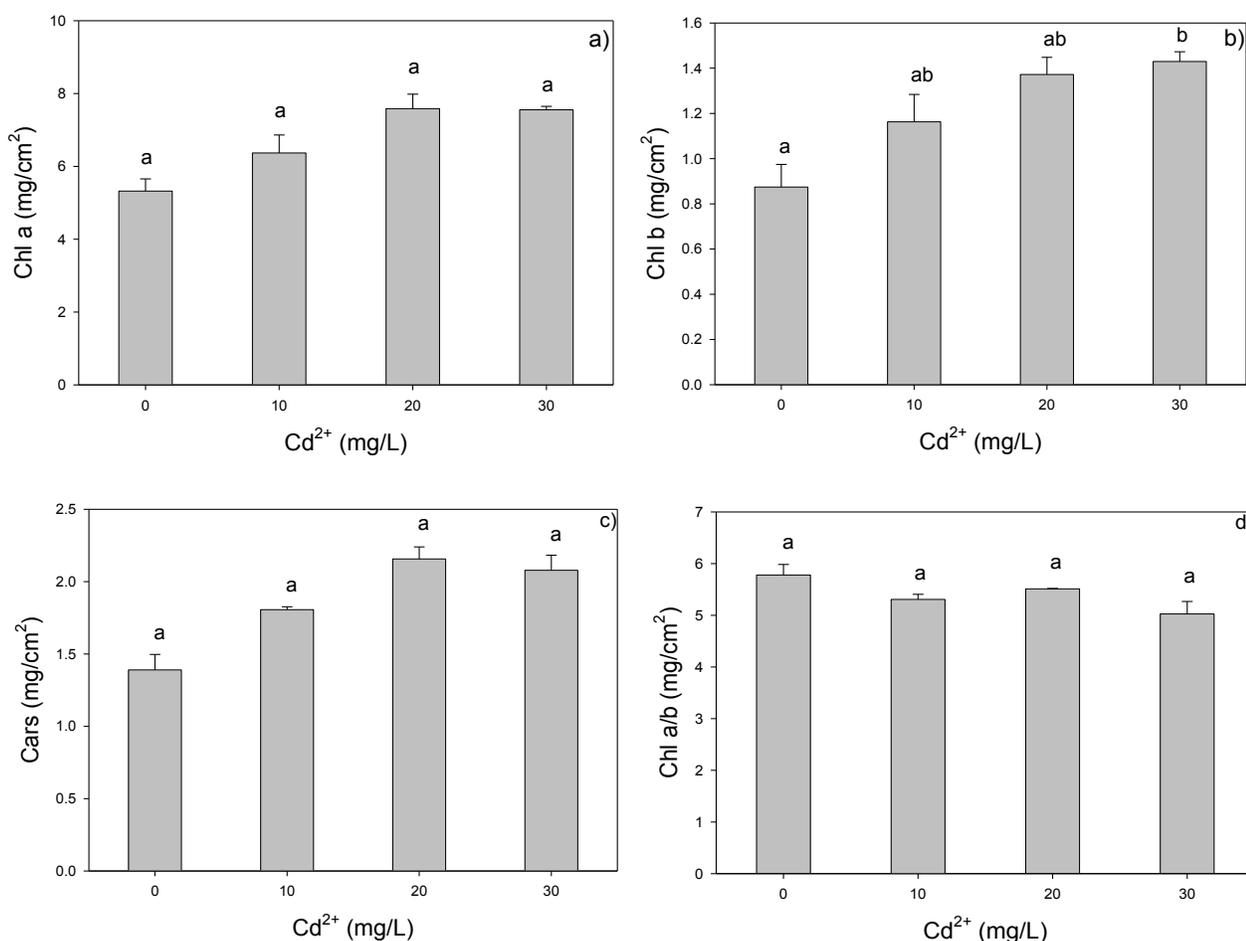


Figura 9. Concentración de pigmentos fotosintéticos, a) Clorofila a (Chl a), b) Clorofila b (Chl b), c) Carotenoides totales (Cars) y d) Relación clorofila a y b (Chl a/b), en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺ después de 14 días de tratamiento. n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey p<0.05.

El efecto del Cd^{2+} sobre la relación clorofila *a* y *b* (Fig. 9d), muestra una tendencia decreciente conforme aumenta la concentración del ion en el medio, sin embargo, la reducción es sólo del 4% con respecto al control en presencia de 10mg/L de Cd^{2+} y disminuye 7.57% al exponerse a 30 mg/L de Cd^{2+} durante 14 días. Este cambio podría estar relacionado con modificaciones en la cantidad de pigmentos estructurales presentes en los complejos del fotosistema I y II. La concentración de pigmentos fotosintéticos en el complejo antena y en el centro de reacción, están relacionados con la absorción de energía y la cantidad de energía utilizada para llevar a cabo las reacciones de la fotoquímica primaria.

En *Phaseolus vulgaris* el contenido de clorofila *a*, *b*, y carotenoides aumentó (Fig. 9), resultados similares fueron observados en plantas de *Phaseolus coccineus* por Skórzynska *et al.*, (1997), observando una fuerte reducción del área foliar, relacionada con la acumulación de los pigmentos del cloroplasto. Maleva *et al.*, (2011), observaron que la adición de Cd^{2+} al medio de crecimiento estimuló significativamente la síntesis de clorofila y carotenoides en plantas de Elodea.

El casi nulo efecto del Cd^{2+} sobre el contenido de clorofilas en esta investigación puede deberse a que el metal no tuvo una influencia sobre la organización de la clorofila en los complejos antena, así como en el centro de reacción, necesarios para la actividad normal del PS II (Kumar y Kumar, 1999) o sobre la ruta de biosíntesis de estos pigmentos fotosintéticos, más específicamente, sobre la actividad de algunas enzimas que participan en la síntesis de la clorofila como la δ -aminolevulinico sintetasa o la ácido 5-aminolevulinico deshidratasa (Bhattacharjee, 2005), ya que el Cd^{2+} a altas concentraciones es un antagonista de algunos cationes divalentes como el Fe, Cu, Mn y Mg (Krupa, 2004).

Por otro lado, se sabe que en condiciones no estresantes para un organismo con fotosíntesis oxigénica, los carotenoides ayudan a ampliar el espectro de absorción de energía electromagnética (Cuttris *et al.*, 2007). Sin embargo además de funcionar como pigmentos accesorios de recolección de luz, los carotenoides desempeñan un papel importante en la fotoprotección de la clorofila contra daño foto-oxidativo (Behera *et al.*, 2002; Drazkiewicz *et al.*, 2005), siendo antioxidantes lipofílicos altamente eficaces en la eliminación del estado triplete de la clorofila y singlete del oxígeno (Mohamed *et al.*,

2012). El aumento estadísticamente no significativo ($p < 0.05$) en el contenido de carotenoides encontrado en este trabajo (Fig. 9c) podría indicar el inicio de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el cloroplasto por interacción del Cd^{2+} con los distintos componentes de este organelo celular, más específicamente en la cadena transportadora de electrones. De este modo, el aumento del contenido de este pigmento podría facilitar la desintoxicación ocasionada por la posible producción de radicales formados por la presencia de Cd^{2+} (Ekmekci *et al.*, 2008).

El contenido de carotenoides y la relación de clorofila *a* y *b* (*a/b*) son indicadores significativos de la resistencia de los complejos presentes en el aparato fotosintético (Nesterenko *et al.*, 2007; Maleva *et al.*, 2012). Estas relaciones son normalmente estables, pero cambian rápidamente con la acción de factores de estrés. Los cambios en la proporción de los pigmentos fotosintéticos se reflejan en la actividad del aparato fotosintético, lo que afecta la tasa de asimilación, así como el crecimiento de la planta y la productividad (Nesterenko *et al.*, 2007). Se sabe que el PSII es el que contiene la mayor proporción de clorofila *b*, de manera que existe una relación estequiométrica entre la concentración molar de clorofila *b* y la concentración molar de unidades de PSII con sus moléculas de clorofila *b* asociadas (Anderson, 1986). De la misma forma, el total de clorofila *a* medida se encuentra en las inmediaciones proteicas del PSII y PSI. También se ha determinado de la estructura tridimensional del PSII, que contiene 162 moléculas de clorofila *a* y 54 moléculas de clorofila *b* por unidad de PSII (Govindjee *et al.*, 2010), mientras que el PSI contiene 161 moléculas de clorofila *a* (Busch y Hippler, 2011).

La exigua disminución en la relación clorofila *a/b* encontrada en esta investigación se debe a un mayor aumento en la concentración de clorofila *b*. Los cambios en la relación entre la clorofila *a/b*, están asociados a un cambio en la relación de membranas tilacoidales apiladas y las no apiladas dentro del cloroplasto. Los cambios de apilamiento están directamente ligados a un cambio en la cantidad de cada fotosistema ya que se reconoce que el PSII está distribuido en las zonas apiladas y el PSI se distribuye en las zonas no apiladas (Anderson, 1986). Estas adaptaciones se encuentran en la naturaleza ya que algunas plantas de sombra muestran una relación de 3:1 de los centros de reacción del PSII respecto a los del PSI, comparando con la relación 2:1 encontrada en plantas de sol. De esta forma se ha observado que el aparato fotosintético mantiene cierta flexibilidad que le permite ajustar la relación estequiométrica de los fotosistemas

(PSII/PSI) frente a las distintas calidades de luz y esto contribuye a mejorar la eficiencia cuántica de la fotosíntesis (Chow *et al.*, 1990).

Por lo tanto la disminución en la relación clorofila a/b encontrados en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺ podría indicar un cambio en la relación PSII/PSI y/o modificaciones en la composición de los complejos antena (LHC), además, indica una mayor sensibilidad de la clorofila a que de la clorofila b en presencia de Cd²⁺. Estos resultados coinciden con lo encontrado Drazkiewicz y colaboradores (2005) en segmentos de hojas maduras de maíz tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺, que además reportaron una mayor sensibilidad de clorofila a que clorofila b hacia el Cd²⁺.

VI. Efecto del Cd²⁺ sobre la respiración en hojas

La respiración vegetal es el conjunto de reacciones celulares mediante las cuales los carbohidratos sintetizados mediante la fotosíntesis son oxidados a CO₂ y H₂O, y la energía liberada es transformada mayoritariamente en ATP. La respiración, junto con el metabolismo del carbono, libera la energía almacenada en dichos compuestos orgánicos de una forma controlada para ser utilizada a nivel celular. Al mismo tiempo produce muchos precursores para procesos de biosíntesis. Durante la respiración, la energía liberada y almacenada en un compuesto, el ATP, puede ser rápidamente utilizado para el mantenimiento y desarrollo de la planta (Azcon y Talon, 2008; Taiz y Zeiger, 2006).

Se sabe que el consumo de oxígeno por la mitocondria de células fotosintéticas se modifica bajo condiciones metabólicas específicas y dichas variaciones son el reflejo del suministro de carbono por parte de la fotosíntesis, del grado al cual el NADH fotorrespiratorio es consumido en la mitocondria, y del grado en el que el exceso de equivalentes redox fotosintéticos son exportados del cloroplasto, lo que revela su importancia durante la fotoinhibición (Atkin *et al.*, 2000).

La figura 10 muestra la tasa de consumo de oxígeno inmediatamente después de un periodo de iluminación en discos de hoja de *Phaseolus vulgaris*. Se puede observar que se presentó un incremento no significativo ($p < 0.05$) del consumo de oxígeno como

resultado de la exposición a distintas concentraciones de Cd^{2+} . El aumento observado representó cerca del 30% en los tres tratamientos con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Nalewajko y Olaveson (1995), en *S. acutus* sometidas a estrés por Cu^{2+} , encontraron que a dosis bajas de Cu^{2+} el consumo de oxígeno respiratorio aumenta de forma hiperbólica. En otro trabajo similar Pasichnaya (2002) señala que el aumento en el consumo de O_2 como resultado del aumento de la concentración en el medio de metales pesados, se debe a una necesidad de compensar posibles deficiencias de recursos energéticos, debido a afecciones en la fotosíntesis. Por otro lado cualquier compuesto que genere estrés (como metales pesados) que afecte la fotosíntesis, alteran el contenido de ATP. Es importante tener en cuenta que a pesar de que el cloroplasto exporta moléculas de alta energía al citoplasma, la mitocondria exporta todo el ATP necesario para las actividades metabólicas que se desarrollan en el citoplasma (Heldt, 2002).

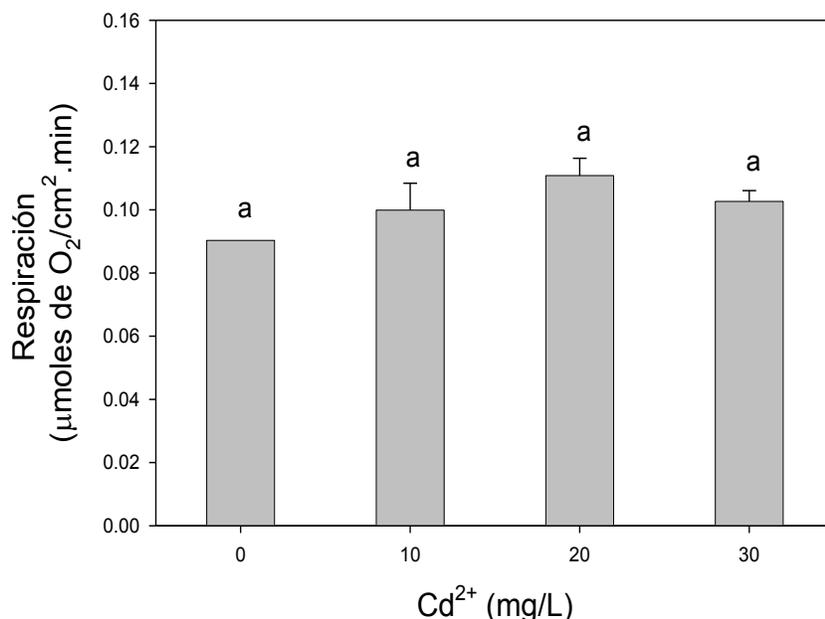


Figura 10. Efecto del Cd^{2+} sobre el consumo de O_2 (respiración) en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. $n=10$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$.

Desde este punto de vista y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el aumento detectado en la tasa de respiración puede ser el inicio de un incremento en la demanda de energía para el transporte activo, la producción de polipéptidos específicos

de unión a metales, el transporte del complejo metal-fitoquelatina desde el citoplasma a las vacuolas, la producción de compuestos extracelulares y la síntesis de enzimas y compuestos relacionados con el estrés oxidativo (Meharg, 1993; Lombardi *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2006). Además la reducción de la fotofosforilación en el cloroplasto, puede aumentar la exigencia de ATP procedente de la mitocondria (Losch y Kohl, 1999). Con respecto a esto, López y colaboradores (2009) en hojas de tomate tratadas con Cd^{2+} , reportaron un aumento significativo en la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs como la citrato sintasa, la malato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, concluyendo que la actividad de la mitocondria podría verse afectada por la presencia de Cd^{2+} y el aumento en la actividad de estas enzimas puede reflejar cambios en el citoplasma que trata de hacer frente al estrés producido por la presencia del ion. El aumento en la actividad de estas enzimas puede generar poder reductor, que puede jugar un papel importante en los mecanismos redox en las células.

VII. Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad fotoquímica y la liberación fotosintética de oxígeno.

a. Efecto del Cd^{2+} sobre la tasa de liberación de oxígeno

Los datos de la liberación de oxígeno obtenidos en este trabajo se muestran en la Figura 11 como la producción de oxígeno por unidad de área y de tiempo. Estas velocidades consideran la velocidad de producción de oxígeno a la luz por parte de la hoja, como el balance entre la producción neta de oxígeno durante la fotosíntesis y la fracción consumida por parte de la respiración durante la iluminación.

La actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno en tejido de hojas de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd^{2+} mostró un descenso proporcional al aumento de la concentración del ion en el medio, sin embargo, el descenso en la liberación de oxígeno solo se hizo evidente a partir del tratamiento de 20mg/L de Cd^{2+} y se acentuó con el tratamiento más alto (30mg/L de Cd^{2+}), mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a lo obtenido en el grupo control.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo diversos estudios han reportado una disminución en la liberación de oxígeno en varias especies de plantas expuestas a

Cd^{2+} (Kumar y Kumar, 1999; Pagliano *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 1999; Skórzynska *et al.*, 1997). Estudios en cloroplastos aislados mostraron que la inhibición de la fotosíntesis ocasionada por la presencia de Cd^{2+} en el tilacoide, se realiza del lado donador del PSII, alrededor del complejo liberador de oxígeno (CLO) (Vrettos *et al.*, 2001).

Durante el ensamble del PSII a su estado funcional, este centro catalítico es la última unidad que se une. A este paso se le conoce como foto-activación, porque aparte de los cofactores Mn^{2+} y Ca^{2+} la luz es necesaria para llevar a cabo este proceso. La foto-activación es un proceso común y frecuente debido al alto recambio de la proteína D1, su síntesis se produce en las membranas expuestas del estroma. Al parecer, la proteína D1 se incorpora inmediatamente en el complejo PSII. La expresión del gen que codifica la proteína D1 parece estar regulada por la luz, tanto la traducción y los niveles post-traduccionales (Franco *et al.*, 1999).

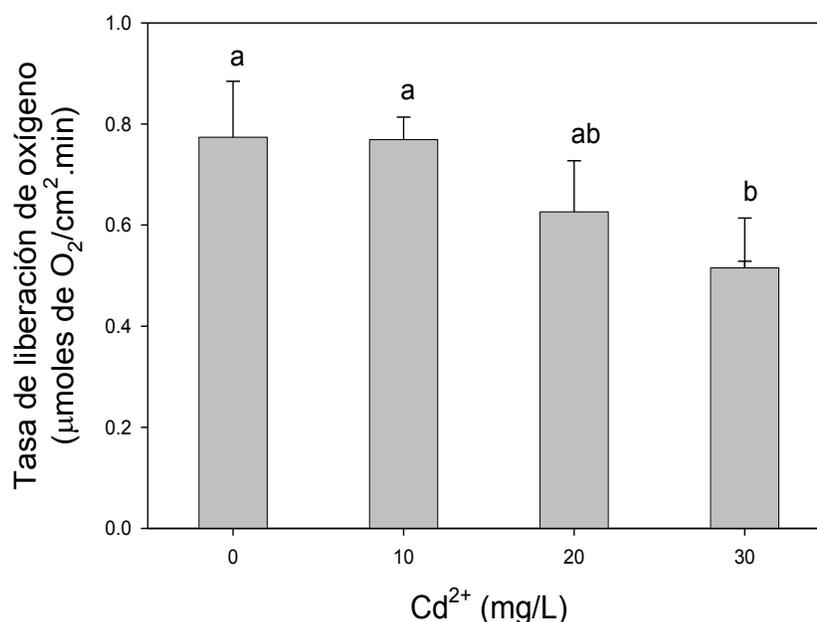


Figura 11. Efecto del Cd^{2+} sobre la velocidad de producción de oxígeno, medido en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. $n=10$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$.

Sigfridsson y colaboradores en el 2004 establecieron diversos sitios del aparato fotosintético que parecen ser afectados por el Cd^{2+} . Uno de estos sitios es el clúster $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$, donde el Cd^{2+} sustituye al Ca^{2+} , por un intercambio de iones en el sitio de unión

del Ca^{2+} o por competencia, dando como resultado la inhibición de la liberación de oxígeno y por consiguiente la pérdida de la fase S2. Así mismo Faller y colaboradores (2005) sugieren que el Cd^{2+} inhibe la foto-activación por su unión a un sitio esencial del Ca^{2+} ya que durante el ensamblado del PSII, existe una menor selectividad del sitio de unión para el metal nativo y por lo tanto la proteína es ocupada por otros iones de características químicas similares. Estos iones no nativos pueden dar lugar a la pérdida de la actividad catalítica del complejo liberador de oxígeno (CLO), y por consecuencia dar lugar a efectos tóxicos. Estas observaciones, realizadas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, apoyan la idea de que en ambientes contaminados con Cd^{2+} , uno de los principales efectos adversos de este metal pesado es la fotoinhibición del PSII, producto de la inactivación del CLO (Pagliano *et al.*, 2006).

Aunado a lo anterior se puede observar que la disminución en el contenido de Ca^{2+} (Fig. 5c) y el aumento simultáneo de Cd^{2+} (Fig. 4c) en hojas de *Phaseolus vulgaris* L., puede contribuir a la competencia en el sitio de unión del Ca^{2+} en el CLO entre estos iones al disminuir la cantidad de Ca^{2+} disponible, alterando la liberación de oxígeno y la foto-activación.

Por otro lado Pietrini y colaboradores (2003) encontraron que cuando *Phragmites australis* se expone a $50\mu\text{M}$ de Cd^{2+} , los tilacoides acumulan aproximadamente un átomo de metal por centro de reacción del PSII. Este nivel de metal no parece ser lo suficientemente alta como para dañar el PSII, a fin de observar el 50% de inactivación de PSII en plantas de arroz, eran necesarios 500 átomos de cadmio por centro de reacción del PSII. Esta observación proporciona evidencia de la posibilidad de que, *in vitro* así como *in vivo*, el Cd^{2+} afecta el lado donador del PSII.

b. Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad fotoquímica máxima potencial (F_v/F_m) y la operacional (ΦPSII) del fotosistema II.

Se sabe que la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* está relacionada principalmente con el estado fisiológico del PSII (Kautsky y Zedlitch., 1941 cit. en Baker y Oxborough, 2008) y recientemente con el PSI (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008), con este medio de análisis se puede estimar rápidamente y de manera no invasiva la eficiencia operacional del PSII en hojas, que también se relaciona con la fijación de CO_2 .

Cualquier proceso que afecte la eficiencia de captura de energía de excitación por los centros de reacción, como la fotoinhibición y procesos de disipación energética no fotoquímica, modifica la velocidad de transporte electrónico a través de los centros del PSII, lo cual también se ve reflejado en el valor de F_v/F_m (Genty *et al.*, 1989).

Las células pueden acumular pigmentos no fotosintéticos o modificar la relación entre el PSII y el PSI, esto a su vez modifica la absorción de luz necesaria para el transporte de electrones. La relación de la producción de ATP y electrones para fijar CO_2 , está condicionado de algún modo por el transporte lineal de electrones bajo situaciones óptimas (Baker y Oxborough, 2008).

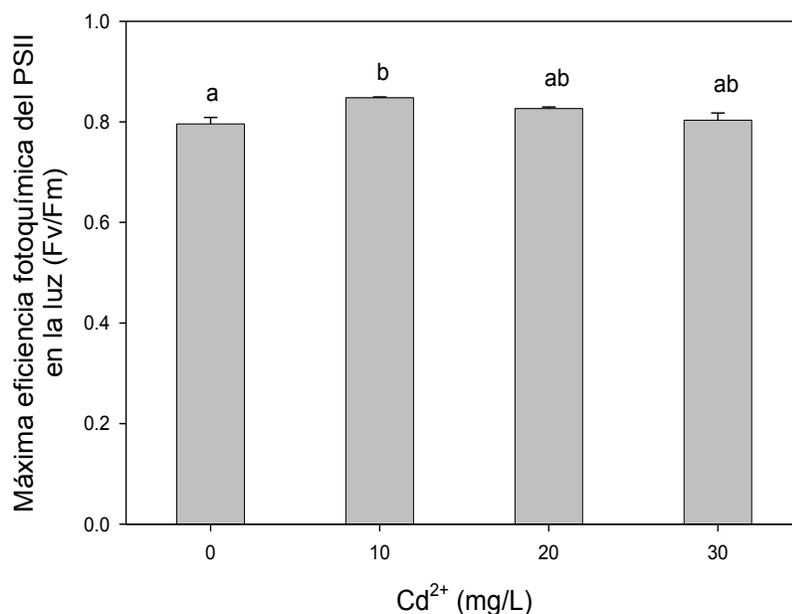


Figura 12. Efecto de las concentraciones de Cd^{2+} sobre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria del PSII en la luz (F_v/F_m), en hojas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con distintas concentraciones de Cd^{2+} . $n=6 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$.

La eficiencia fotoquímica primaria del PSII a la luz (F_v/F_m) aumenta de manera significativa ($p<0.05$) en todos los tratamientos, sin embargo, este incremento representó sólo el 7.53% en el tratamiento con 10mg/L de Cd^{2+} y el 1.62% en el tratamiento más alto con Cd^{2+} (30mg/L), con respecto al grupo control (Fig. 12). La disminución o aumento del

de la eficiencia fotoquímica potencial del PSII (F_v/F_m) está relacionada con procesos de regulación de la energía de excitación, cambios en la eficiencia de PSII, modificaciones estructurales de PSII o a procesos de fotoinhibición (Pagliano *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos muestran que el proceso prácticamente permaneció sin cambios en todas las concentraciones probadas.

La eficiencia cuántica operacional (Φ_{PSII}) (Fig.13), mide la proporción de energía absorbida que es usada para impulsar el proceso fotoquímico en una condición lumínica dada, es decir, representa el transporte fotosintético *in vivo*. Este parámetro se relaciona con la eficiencia del PSII cuando el flujo de electrones entre el PSII y PSI está en equilibrio con la fijación de CO_2 . También proporciona una imagen más exacta del funcionamiento del transporte electrónico, ya que refleja la capacidad fotosintética del sistema para mantener abiertos los centros de reacción en la luz. Cualquier evento que modifique el transporte o equilibrio de electrones en toda la cadena fotosintética, modifica este parámetro de manera directa.

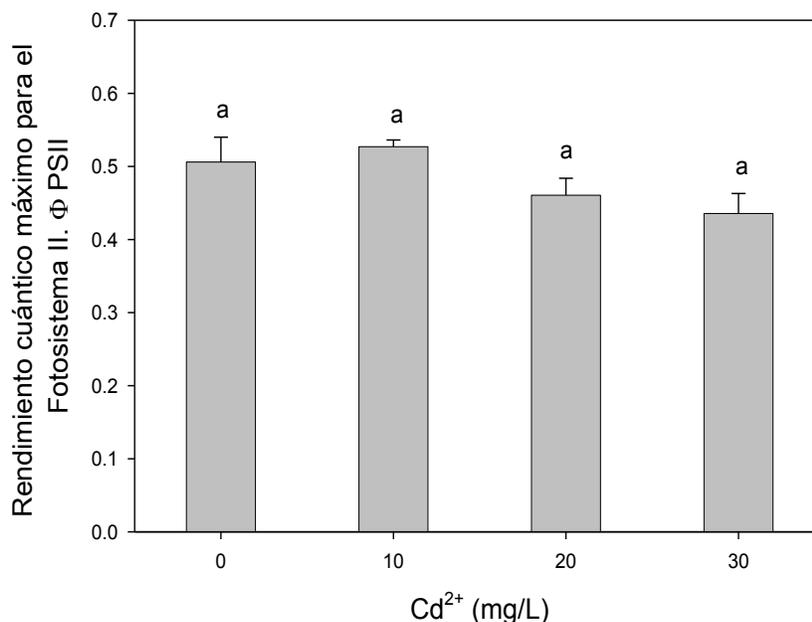


Figura 13. Efecto de las concentraciones de Cd^{2+} sobre el Rendimiento cuantico máximo para el fotosistema II (PSII), obtenido a partir del análisis del decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila a en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. $n=6 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0.05$.

La Figura 13 muestra que la eficiencia cuántica operacional (Φ_{PSII}) no se modifica por la exposición al metal en las concentraciones probadas.

Utilizando los valores de la Figura 13, se calculó (Fig. 14) el transporte electrónico relativo (rETR) (Enríquez y Borowitzka, 2011). Los resultados muestran que el rendimiento cuántico operacional para el PSII (Φ_{PSII}) (Fig. 13), así como la tasa de transporte de electrones relativa (rETR) (Fig. 14) tienden a disminuir en presencia de Cd^{2+} en el medio sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a lo encontrado en el grupo control.

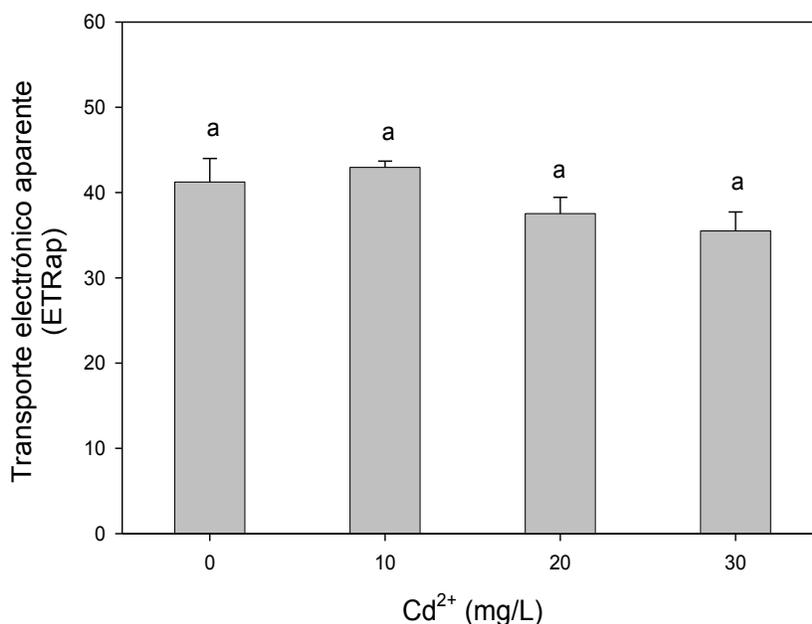


Figura 14. Efecto de las concentraciones de Cd^{2+} sobre el Transporte electrónico aparente, obtenido a partir del análisis del decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila a en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. $n=6 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Los organismos fotosintéticos poseen procesos de fotoprotección, para reducir al mínimo las condiciones de estrés que se pudieran presentar, estos procesos están vinculados a la disipación del exceso de energía absorbida que no está siendo utilizada para el proceso fotoquímico, es decir, se debe balancear la energía usada para el transporte electrónico, la síntesis de ATP-NADPH y la fijación de CO_2 a fin de minimizar un daño potencial del

PSII por un exceso de energía. El decaimiento no fotoquímico (NPQ) es uno de los mecanismos más importantes para la regulación rápida de la fotosíntesis en plantas y algas, que ayuda a la protección del PSII de un probable daño foto-oxidativo (Lavaud *et al.*, 2007). NPQ, es la suma de diferentes mecanismos que contribuyen a la disipación total de calor. Debido a que NPQ indica la disipación de energía en forma de calor, involucra al llamado “ciclo de las xantofilas” que es básicamente la inter-conversión dependiente de luz de tres xantofilas (carotenoides oxigenados): violaxantina, anteraxantina y zeaxantina (sin grupo epóxidos), reacciones que son catalizadas por dos enzimas tilacoidales denominadas violaxantina epóxidasa (VDE) y zeaxantina epóxidasa. El ciclo está regulado por la luz, ya que la violaxantina se de epóxida a anteraxantina y a zeaxantina a altas densidades de flujo fotónico (o en situaciones de disminución de la fotosíntesis, producidas por estrés). El proceso es regulado por el gradiente transtilacoidal de pH (ΔpH) (Krause y Weis, 1991) y la presencia de la proteína PSbS (Li *et al.*, 2002). Un pH ácido en el lumen tilacoidal promueve la depooxidación de la violaxantina a zeaxantina. Existe una estrecha correlación positiva entre los niveles de zaxantina y el parámetro NPQ (Wentworth *et al.*, 2004).

En este trabajo, en plantas de frijol sometidas a distintas concentraciones de Cd^{2+} , la disipación energética no fotoquímica (NPQ) (Fig. 15) se mantuvo sin cambios aparentes en los tres tratamientos con Cd^{2+} con respecto al control.

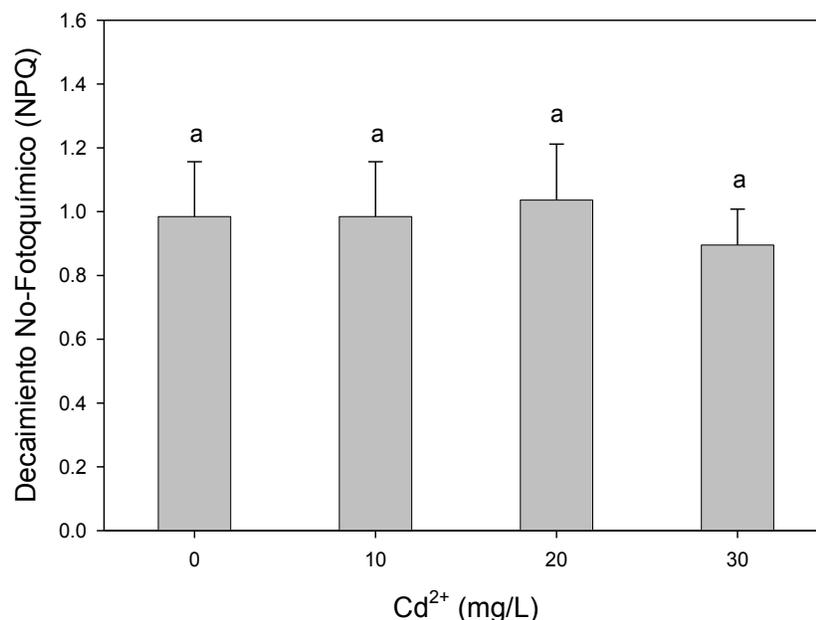


Figura 15. Decaimiento No-Fotoquímico (NPQ) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. sometidas a tratamiento con Cd²⁺ durante 14 días. N=6 ±. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

Con respecto a lo anterior se observó que Fv/Fm (Fig. 12) fue estimulado de forma positiva en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con Cd²⁺. Por lo tanto se asume que la luz absorbida es utilizada de manera eficiente para reducir al primer aceptor estable del PSII, Q_A (Rod *et al.*, 2012). Así mismo el Cd²⁺ no alteró de forma significativa (p<0.05) la eficiencia cuántica operacional ΦPSII, es decir, la eficiencia del PSII cuando el flujo de electrones entre el PSII y PSI con respecto a la fijación de CO₂ se mantuvo en equilibrio (Fig. 13). Del mismo modo no alteró de forma significativa (p<0.05) la velocidad del transporte de electrones (rETR) a través del aparato fotosintético (Fig. 14), lo que indica que no hay un efecto aparente sobre los componentes intermediarios entre el PSII y PSI (Segura, 2010). El parámetro de decaimiento no fotoquímico (NPQ) que representa la proporción de energía disipada térmicamente, que involucra al llamado “ciclo de las xantofilas”, no se vio alterado por la presencia de Cd²⁺ (Fig. 15), por lo tanto se asume que la energía de excitación que entra al PSII a través de LHCII es utilizada de forma eficiente para llevar a cabo los procesos redox. Resultados similares se obtuvieron en distintas especies de plantas (*Pisum sativum* y *Elodea densa*) tratadas con distintas concentraciones de Cd²⁺ (Maleva *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 1999;). Aunado a esto Tang y colaboradores (2013) en plantas de *Picris divaricata* tratadas con 5, 10, 25, 50 y 75 M de

Cd^{2+} reportaron que F_v/F_m , ΦPSII , NPQ y ETR se mantienen estables, ellos sugirieron que los centros de reacción del PSII no son el objetivo principal de posibles inhibiciones del Cd^{2+} en la fotosíntesis. Nuestros resultados coinciden también con lo encontrado por Zhou y Qui (2005) en plantas de *S. alfredii*, demostraron que el contenido de clorofila y algunos parámetros de fluorescencia de la clorofila a tales como F_v/F_m , ΦPSII y NPQ, no se vieron afectados por la presencia de Cd^{2+} . Sugieren que algunos mecanismos de protección como la síntesis de glutatión y fitoquelatinas pueden mitigar el estrés producido por el Cd^{2+} en el aparato fotosintético.

**c. Efecto del Cd^{2+} sobre el flujo electrónico en el fotosistema II (PSII):
Análisis de la emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila a del PSII.**

Es importante señalar que cuando una muestra pre acondicionada a la oscuridad se ilumina, el incremento de la fluorescencia de la clorofila a es un reflejo del cierre (reducción) de los centros de reacción del PSII y por lo tanto provee información de la actividad fotoquímica del PSII y la reducción de la poza de plastoquinonas (Mallick y Mohn, 2003).

La cinética de la fluorescencia de la clorofila a (conocida como “cinética de Kautsky en honor a su descriptor) es una curva que se puede dividir en dos fases principales: una fase rápida (hasta 1 segundo) seguida de una fase lenta (varios minutos). La fase rápida tiene una figura compuesta de cuatro inflexiones nombradas O, J, I y P, por ende se le conoce como “curva OJIP” (Fig. 16) aunque pueden aparecer otras inflexiones bajo ciertas condiciones experimentales (Stirbet y Govindjee, 2011).

La primera inflexión de la curva de la inducción de fluorescencia, denominada “O”, por ser el origen, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_o), aparece alrededor de los 10 a los 50 μs y es la fluorescencia emitida desde las moléculas excitadas de la clorofila a en el complejo antena, antes que los excitones hayan migrado al centro de reacción, es decir, en ese momento todos los centros de reacción están abiertos (oxidados). La inflexión “J” se desarrolla a los 2 ms (F_j) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A . La inflexión “I”, se desarrolla a los 20 ms (F_i) después de la iluminación, está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . La inflexión “P”, es el valor máximo de la fluorescencia

(F_M), el tiempo en que se alcanza depende del protocolo experimental, sin embargo, en este momento todos los centro de reacción están cerrados (reducidos) (Strasser y Strasser, 1995). P es el punto de fluorescencia máxima debido a que el flujo de electrones desde PQ a través del complejo b/f es el paso más lento de la cadena. El rápido aumento O-J en la fluorescencia representa la fase fotoquímica, esta fase es conocida como “fase luminosa” ya que es modificada con la intensidad lumínica. El aumento restante en el rendimiento de fluorescencia desde J a P representa la fase térmica, ya que se ve afectado por la temperatura (Lazar, 2006).

La prueba OJIP considera todas las inflexiones de la curva, los valores extremos (F_0 y F_m), así como la pendiente inicial de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del PSII (M_0). Cada inflexión de la curva nos permite determinar el movimiento de los electrones a través de los acarreadores, hasta que PQ está completamente reducido. Utilizando estos valores se pueden calcular los parámetros descritos en la tabla 1 (Van Heerden *et al.*, 2003; Strasser y Strasser, 1995).

En la Figura 16 se muestran los promedios de los trazos en escala de tiempo logarítmico frente a las unidades relativas de fluorescencia registradas, en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días con distintas concentraciones de Cd^{2+} (10, 20 y 30 mg/L).

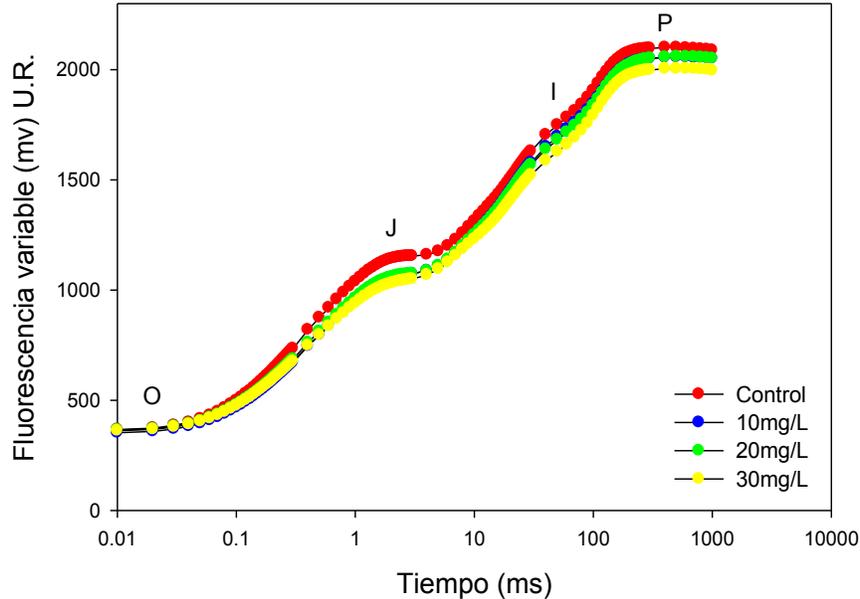


Figura 16. Efecto del Cd^{2+} sobre la fluorescencia variable expresada en tiempo logarítmico, en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. n=16.

Como se puede observar en la Figura 16, la fase O de la cinética de fluorescencia no presenta modificaciones en los tratamientos con Cd^{2+} con respecto al grupo control. El nivel de fluorescencia inicial (F_o) está relacionado con la fracción de energía disipada por parte del complejo antena, de manera basal. El valor de la fluorescencia en K y J disminuyen alrededor del 5% en los tratamientos con el metal. A partir de estos valores de fluorescencia es posible obtener información del funcionamiento del complejo antena del PSII (LCHII), el centro de reacción, el complejo liberador de oxígeno (CLO) así como la separación de cargas en el P680, sin embargo también nos da información del flujo de electrones desde la molécula del agua hasta el primer aceptor estable del PSII, la quinona A (Q_A). A pesar de la disminución observada en la liberación de oxígeno (Fig. 11), la Figura 16 muestra la fase K y J no se ve modificada de manera evidente con respecto al control, lo que indicaría que no existe diferencia en el flujo de electrones desde CLO hasta Q_A . Toth y colaboradores (2007) sugieren que cuando hay inactivación de CLO's, los centros de reacción del PSII tienen acceso a un gran número de donadores alternativos de electrones (Cyt b559, TyrD y β -carotenos) que contribuyen con la reducción parcial de Q_A y la cadena transportadora de electrones, lo que podría explicar la discrepancia entre ambas mediciones.

Por otro lado, la reducción de los valores de fluorescencia en la fase J y P se puede relacionar con una ligera disminución en el transporte electrónico en el lado donador del PSII, que podría llevar a un decremento del pool de Q_A^- (Mehta *et al.*, 2010). La disminución de F_m o el valor de P, puede ser interpretada también como cambios de la estructura del centro de reacción en PSII e incluso a una disminución de la actividad de los CLO (Strasser y Strasser, 1995), como se observa también en la Figura 11. Sin embargo Dewez y colaboradores (2007) sugieren que la disminución en la intensidad de fluorescencia después de la fase I, indica también un equilibrio en el transporte de electrones entre el PSII y el PSI.

La Figura 17 muestra los valores de fluorescencia graficados como fluorescencia relativa $[V_t=(F_t-F_o)/(F_m-F_o)]$. El cálculo de la fluorescencia variable relativa (V_t) permite visualizar de manera dinámica la reducción de Q_A en el tiempo desde F_o a F_m . (Delosme y Joliot, 2002).

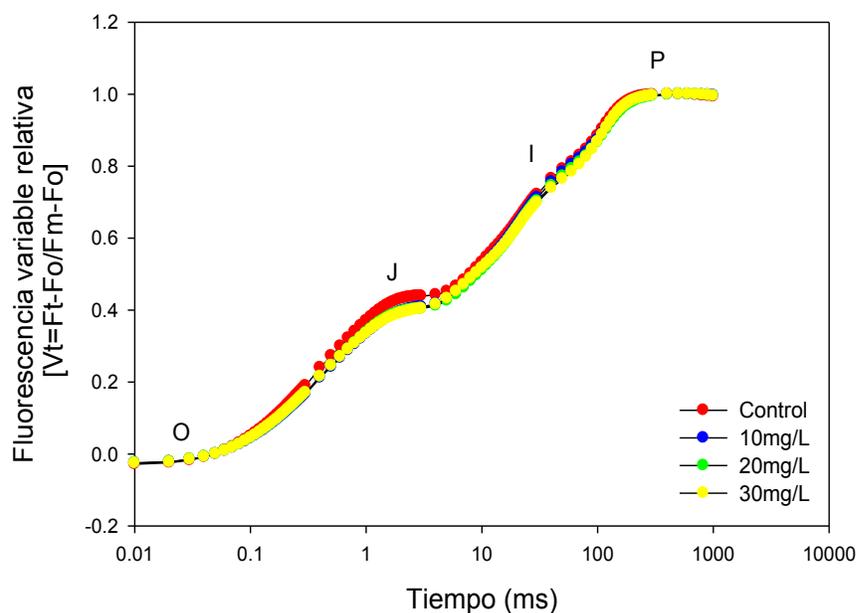


Figura 17. Efecto de las concentraciones de Cd^{2+} sobre la Fluorescencia variable relativa (V_t) expresada en tiempo logarítmico en plantas pre acondicionadas a la oscuridad de *Phaseolus vulgaris* L. n=16.

La fluorescencia variable relativa (Fig. 17) muestra una pequeña disminución a nivel del llenado de Q_A . Este punto de la curva de inducción de la fluorescencia se le conoce como fase luminosa de incremento polifásico, ya que depende cinéticamente de la intensidad lumínica con que trabaja el sistema (el paso de la fase O a la fase J).

Los cambios en la cinética de OJIP se pueden observar con más detalle cuando se grafica el cambio (Δ) dado entre el grupo control y las muestras experimentales (Fig. 18).

Las curvas mostradas en la Figura 18 se construyeron restando los valores de la cinética de fluorescencia normalizada de los tratamientos (V_t) del valor de V_t del grupo control, estas curvas se conocen como ΔV_t . De estas curvas es posible observar inflexiones hacia arriba, que indican inhibiciones en el transporte electrónico e inflexiones hacia abajo, las cuales indican estímulos en el transporte de electrones. Con respecto a lo anterior es posible visualizar una inflexión hacia abajo que comienza entre K y J de aproximadamente 5 % y se observa otro pico desde J a I menos perceptible.

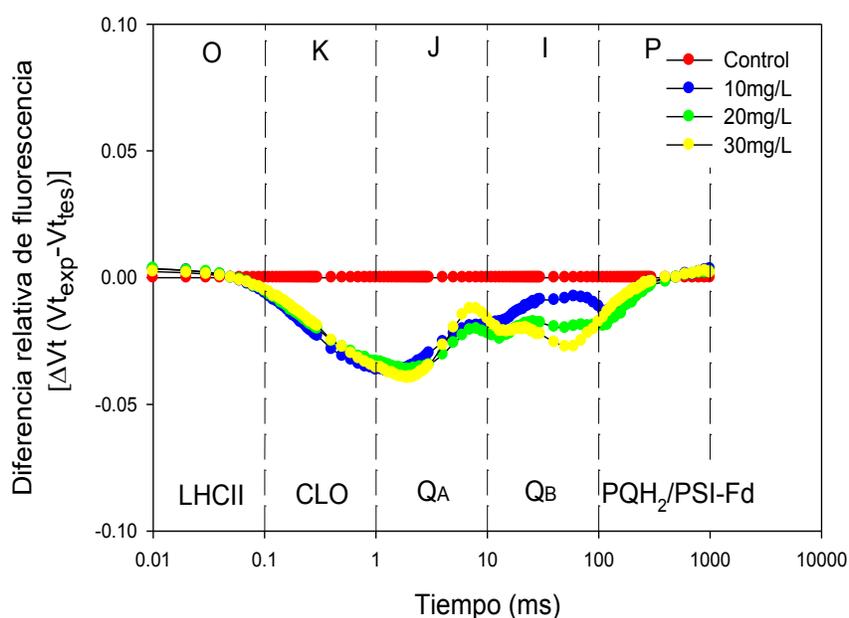


Figura 18. Efecto del Cd^{2+} sobre la fluorescencia variable relativa (V_t experimental – V_t testigo) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. $n=16$.

La inflexión observada alrededor de los 300 μs (K), está relacionada con el paso de electrones desde el CLO hasta el primer aceptor, la Q_A , es decir, cuando Q_A recibe un electrón desde la Feo^- , mientras que $P680^+$ es reducido por Y_Z (Stirbet y Govindjee, 2011). Por otro lado la inflexión entre J e I muestra un estímulo en el paso de electrones entre los aceptores Q_A y Q_B , lo que indica un ligero aumento en la aportación de electrones al PSII y en la salida de este.

Estos resultados coinciden con lo observado por Segura en el (2010) en plantas de *P. vulgaris* tratadas con distintas concentraciones de Ni^{2+} quien reportó que este estímulo podría estar relacionado con la salida de electrones hacia el PSI, probablemente por la activación de una vía cíclica de la fotosíntesis, como vía alterna para transportar electrones fuera de la cadena transportadora y así evitar daños fotooxidativos en los fotosistemas. Probablemente se trate de un efecto indirecto del Cd^{2+} debido a una posible acumulación de ATP y NADPH en la fase oscura de la fotosíntesis por disminución en la fijación de CO_2 o alteraciones en la actividad de algunas enzimas del Ciclo de Calvin-Benson (Fig. 8d).

Utilizando los valores calculados de la fluorescencia variable (Fig. 16) y la fluorescencia variable relativa (Fig. 17), se calculó el número de centros de reacción activos de PSII, así como su función. El fotosistema II se encuentra formando parte de un supercomplejo proteico de múltiples subunidades embebido en la membrana tilacoidal, el cual está constituido por un complejo central dimérico, cada monómero se compone de un centro de reacción y unidades proteicas asociadas a pigmentos que conforman el complejo cosechador de luz (Taiz y Zeiger, 2006).

En la Figura 19 se muestra la gráfica que indica la fracción de centros de reacción activos, en la cual a medida que incrementa la concentración de Cd^{2+} en el medio aumenta de forma significativa ($P < 0.05$) de lo obtenido en el grupo control el número de centros de reacción activos en el PSII [$\text{RC/ABS} = (\text{Mo/Vj}) / (1 - F_o/F_M)$].

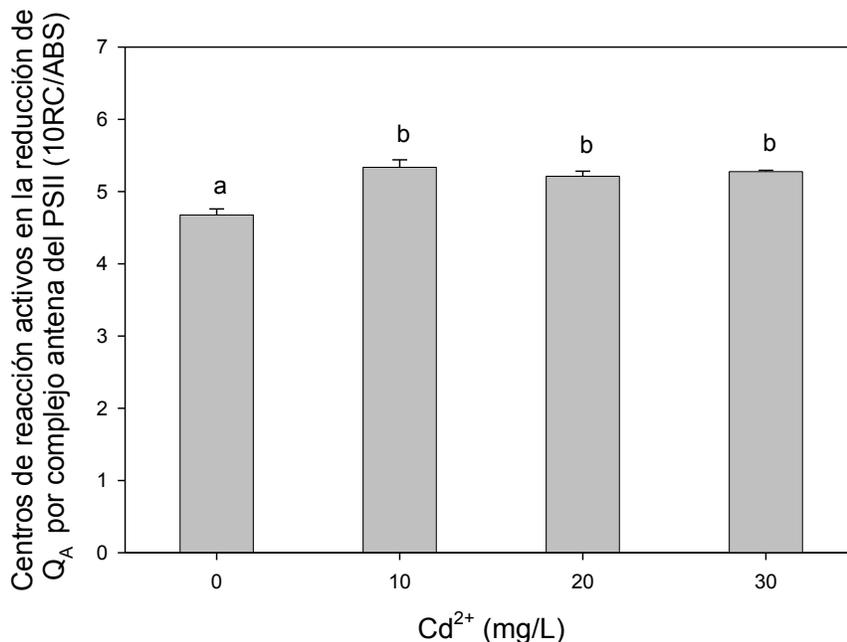


Figura 19. Efecto de las concentraciones de Cd²⁺ sobre los centros de reacción activos en la reducción de QA por cada complejo antena del Fotosistema II en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días. n=16. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05.

Este parámetro está relacionado con la fase luminosa y el lado donador del PSII. Lo anterior implica que hay una mayor captación de energía para llevar a cabo la fotoquímica primaria. Quizá una de las causas por las que el número de centros de reacción se incremento fue para mantener un aporte constante de electrones a la cadena (Valdés, 2005). Sin embargo cabe la posibilidad que este aumento este dado por un incremento en la demanda de agentes reductores (NADPH) y ATP para aumentar los sistemas de defensa contra el estrés ocasionado por la presencia de Cd²⁺ en el cloroplasto. Por lo tanto aumenta la capacidad de reducir Q_A.

Los resultados anteriores, así como la interpretación de los mismos, se corroboran a través del análisis de la prueba OJIP (Strasser y Strasser, 1995), la cual plantea que se puede establecer el destino del flujo de energía luminosa atravesando el PSII como: flujo absorbido (ABS), flujo atrapado (TRo), flujo utilizado para el transporte electrónico (ETo) y flujo disipado como calor (Dlo).

Los flujos de energía se pueden calcular en base a los centros de reacción (RC), los cuales se calculan considerando el inicio de la emisión de la fluorescencia en el tiempo cero, es decir, la pendiente inicial de la cinética de la fluorescencia (M_0) y el valor de fluorescencia variable a los 2ms (V_J). Cuando estos flujos específicos son expresados no solo considerando la velocidad inicial de la fluorescencia (M_0) y el valor de la fluorescencia variable, sino además los valores de fluorescencia variable ($F_V = F_0 - F_M$) y máxima (F_M) de acuerdo al flujo de energía (Force *et al.*, 2003; Van Heerden *et al.*, 2004), se obtienen los rendimientos cuánticos máximos para cada uno de los procesos, estos son: el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕP_0), la eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de Q_A^- (ψ_0), la probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A^- (ϕE_0) y el producto máximo de disipación energética como calor (ϕD_0) (Fig. 20) (González *et al.*, 2008). Estos flujos de energía están relacionados entre sí y dependen de propiedades estructurales y de la actividad fotosintética de la muestra evaluada.

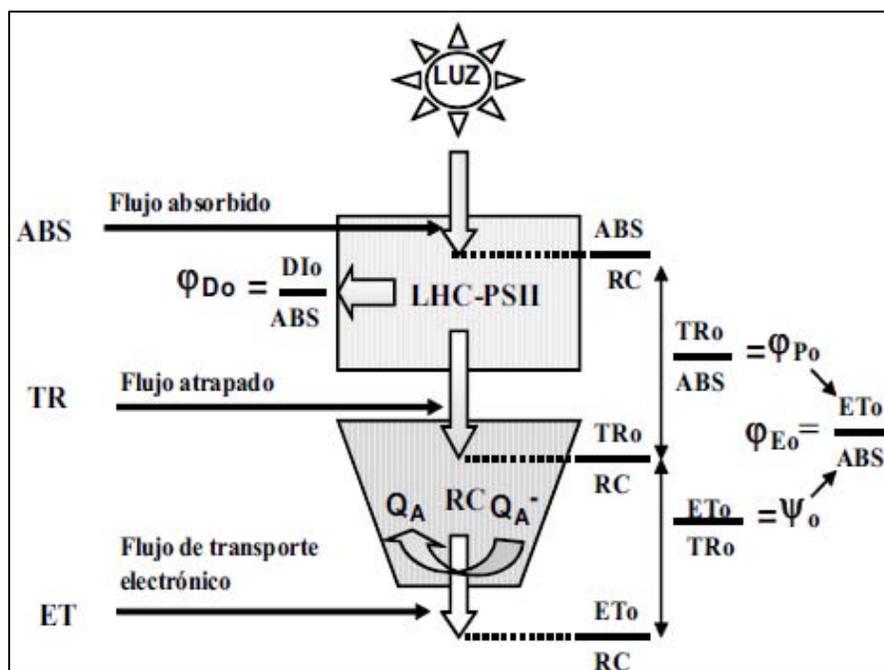


Figura 20. Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético, según la prueba OJIP (Strasser y Strasser, 1995).

La Figura 21 muestra los flujos de energía obtenidos de hojas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento con distintas concentraciones de Cd^{2+} . El flujo de excitón absorbido por centro de reacción (ABS/RC) muestra una disminución significativa

($p < 0.05$) en todos los tratamientos con respecto a lo obtenido en el grupo control sin embargo el decrecimiento más evidente se dio en el tratamiento de 20mg/L de Cd^{2+} con 9.67% (Fig. 21a). El flujo de excitación atrapado por centro de reacción (TRo/RC) que conduce a la reducción parcial del primer aceptor (Q_A) del PSII decrece a lo largo de los tratamientos, donde la disminución más notable es la del tratamiento con 10mg/L de Cd^{2+} con 11.49% de lo obtenido en las plantas del grupo control, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los tratamientos (Fig. 21b). Sin embargo, el flujo de electrones por centro de reacción después de Q_A (ETo/RC), no varía ($p < 0.05$) en las plantas tratadas con respecto al grupo control (Fig. 21c). La disipación térmica por centro de reacción (Dlo) disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) en los tres tratamientos con Cd^{2+} (Fig. 21d), cabe señalar que la disminución más evidente se dio en el tratamiento más alto (30mg/L).

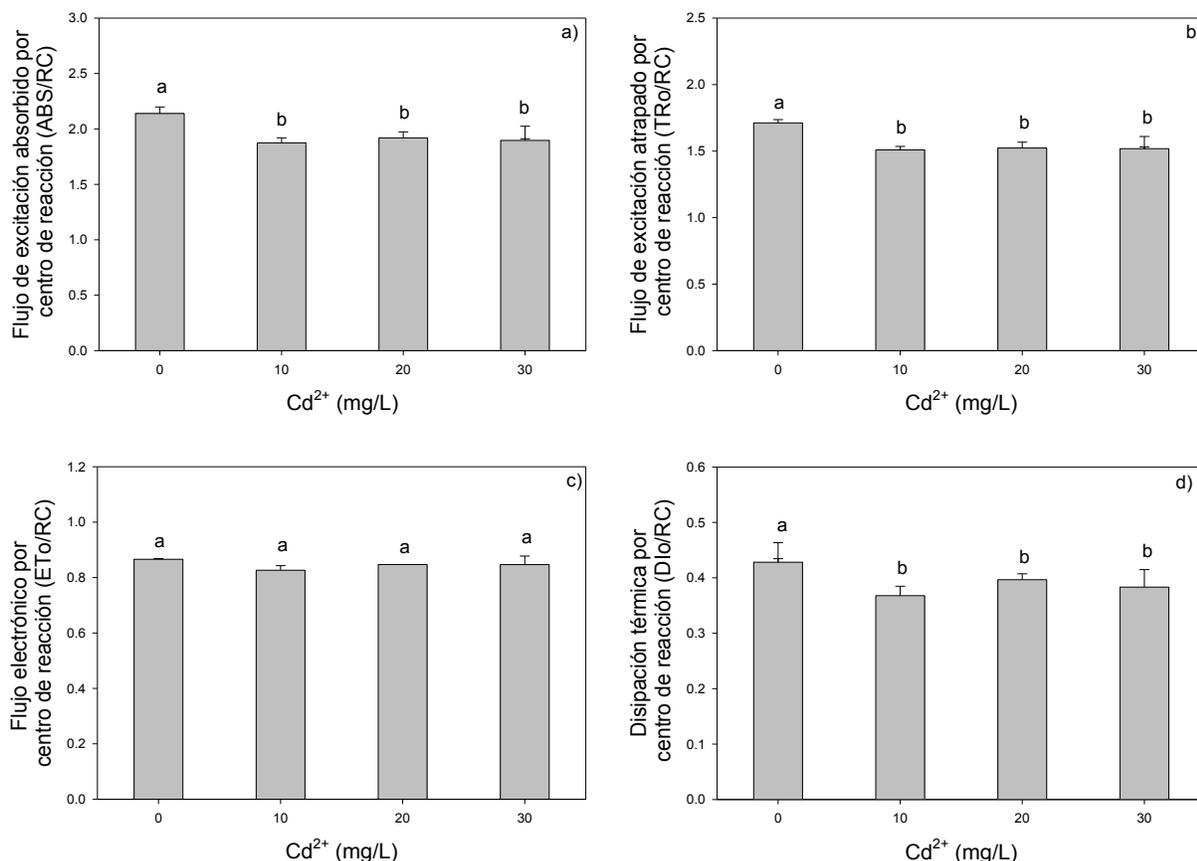


Figura 21. Efecto del Cd^{2+} a distintas concentraciones sobre a) flujo de excitación absorbido por centro de reacción (ABS/RC), b) flujo de excitación atrapado por centro de reacción (TRo/RC), c) flujo electrónico por centro de reacción (ETo/RC) y d) disipación térmica por centro de reacción (Dlo/RC) del Fotosistema II en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. $n=16 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento según la prueba de Tukey $p < 0.05$.

La relación ABS/RC, es considerada como una medida del tamaño aparente del LHCII o bien indica el número de centros de reacción activos, sin embargo a pesar de que hay un aumento en el número de centros de reacción activos (Fig. 19) este parámetro disminuye. Es posible que lo anterior se deba a una disminución en el tamaño de los complejos cosechadores de luz del PSII, y posiblemente a mecanismos de regulación de la energía lumínica, que implican el movimiento del complejo antena externo del PSII hacia el PSI, el llamado mecanismo de relajación qT (Schansker *et al.*, 2006).

Ya que el flujo de excitón (TRo/RC), representa la fracción del flujo de fotones absorbidos utilizados para la separación de carga primaria del PSII y la estabilización de los RCs como $P680^+ Q_A^-$, dicho de otro modo, la energía utilizada para reducir Q_A (Stirbet y Govindjee, 2011), es un proceso dependiente de la absorción de energía electromagnética a través de LHCII, por lo tanto la disminución observada en ABC/RC conlleva a una disminución paralela del flujo de excitón atrapado por centro de reacción (Fig. 21b).

A pesar de lo anterior, el transporte de electrones después de Q_A (ETo/RC) se mantiene sin cambios aparentes (Fig. 21c), esto indica que toda la energía absorbida (ABS) por los complejos cosechadores de luz del PSII y atrapada (TRo) por centro de reacción es utilizada para reducir Q_A (Q_A^-) y por lo tanto reducir Q_B (Q_B^-), esto se refleja en el parámetro de disipación por centro de reacción (Dlo), ya que no hay cambios en la pérdida de energía con respecto al grupo control en forma de calor por parte de los complejos antena presentes en el PSII (Fig. 21d).

En ocasiones en condiciones de estrés, la energía que llega a los centros de reacción no puede ser utilizada tan eficientemente debido a que los procesos de conversión de esta en energía química y el uso de NADPH y ATP se encuentran restringidos, por ende dicha energía de excitación debe liberarse por algún mecanismo fotoquímico o no fotoquímico. Como se mencionó anteriormente el comportamiento observado en el flujo de energía por centro de reacción (RC) puede ser explicado por dos procesos, un cambio en el tamaño de los complejos antena y procesos de relajación fotoquímico.

En el primer caso y como se pudo observar en el cambio de la proporción de clorofila a y b (Fig. 9), una antena de menor tamaño en plantas bajo estrés ayudaría a disminuir la

absorbancia del cloroplasto y así disminuir la cantidad de energía que llega a los centros de reacción, esto le permite a la planta controlar el flujo de excitación que llega específicamente al PSII, de esta manera se reduce la absorbancia del mismo y aumenta su transmitancia (Perales, 2001).

En el segundo caso (mecanismo de relajación qT), cuando la energía que llega al PSII excede la que recibe el PSI, la PQ se acumula en forma reducida (PQH₂) ya que el PSI a través del Cit b₆/f y la plastocianina no pueden reducirla. La acumulación de PQH₂ activa una cinasa que fosforila el complejo antena del PSII (LHCII) modificando su estructura, lo que induce a su disociación del PSII y su unión al PSI. El LHCII ahora asociada a PSI incrementa la frecuencia con la que recibe excitones y al mismo tiempo disminuye esta frecuencia en el PSII, es decir, disminuye su actividad. De esta manera el PSI aumenta su velocidad de funcionamiento respecto a PSII y el exceso de PQH₂ se drena aumentando la sobre reducción de la cadena del lado aceptor del PSII. Este sistema permite mantener un mejor equilibrio de flujo de energía entre los dos fotosistemas (Horton y Hague, 1988).

Algunos autores relacionan estos cambios a procesos de regulación de la energía de excitación y no a efectos directos del factor estresante, por lo tanto se trata de una respuesta adaptativa para prevenir posibles daños en el aparato fotosintético (Carter y Cheesman, 1993; Keiper *et al.*, 1998).

Las relaciones de los datos anteriores permitieron determinar que la eficiencia cuántica para la fotoquímica primaria (ϕ_{Po}) se mantenga constante debido a que la absorción de fotones es proporcional a la atrapada por los centros de reacción. La eficiencia de transporte de electrones después de Q_A (Ψ_o), así como la probabilidad de movimiento de electrones después de Q_A (ϕ_{Eo}) aumenta con el tratamiento de Cd²⁺ encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tres tratamientos con respecto al grupo control (Fig. 22). Esto confirma que no hubo una afección evidente sobre los centros de reacción y el transporte de electrones dentro del PSII e incluso se podría pensar en un estímulo en el transporte de electrones después de Q_A.

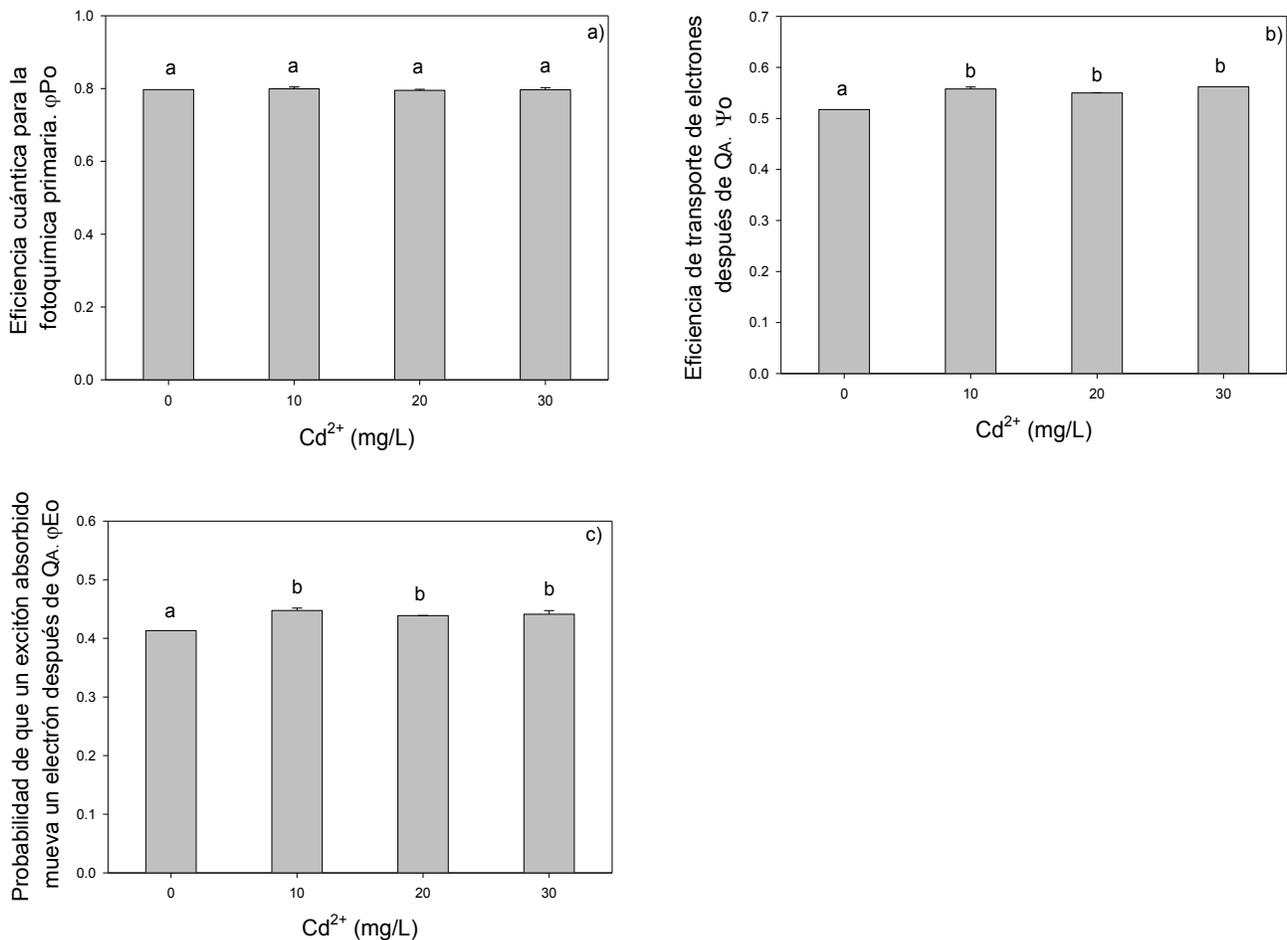


Figura 22. Efecto de las concentraciones de Cd²⁺ sobre a) rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{Po}), b) eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de Q_A (Ψ_o) y c) rendimiento cuántico del transporte electrónico (ϕ_{Eo}) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. $n=16 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento según la prueba de Tukey $p<0.05$.

Los resultados obtenidos en la eficiencia de transporte de electrones después de Q_A (Ψ_o) así como en la probabilidad de movimiento de electrones después de Q_A (ϕ_{Eo}) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con Cd²⁺ coinciden con lo reportado por Dewez y colaboradores (2007) quienes observaron un efecto de relajación fotoquímico y un transporte de electrones acelerado a través del PSI, que se reflejó en el PSII como un aumento en el transporte de electrones después de Q_A (Ψ_o) y en la probabilidad de movimiento de electrones después del primer aceptor estable del PSII (ϕ_{Eo}).

El mecanismo de relajación qT conlleva a una recuperación de la transición J-P de la cinética de fluorescencia (Fig. 16). La recuperación de esta fase a su vez esta paralelamente relacionada con la reducción de la ferredoxina (Fd), el centro de reacción

P700 y la plastocianina (Pc). La capacidad de la luz para reducir toda la cadena de transporte de electrones podría depender de la presencia o ausencia de un bloqueo en el lado aceptor del PSI. Sin embargo estas limitaciones no se observan cuando el mecanismo de relajación qT está presente, por lo tanto el pool de NADP^+ se oxida lo suficiente como para aceptar todos los electrones de la cadena (Schansker *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo anterior, generalmente la re-oxidación de Q_A se puede producir a través de dos vías: la primera se debe a reacciones de recombinación entre Q_A^- y los estados S_2 y S_3 del CLO cuando existe algún bloqueo en la cadena transportadora de electrones más haya de Q_A , y la segunda vía se debe al transporte de electrones hacia adelante en los centros que se encuentran en los estados S_0 y S_1 , y que depende de la disponibilidad de moléculas de PQ oxidadas (Toth *et al.*, 2007). Esto sugiere que el estímulo en la transferencia de electrones después de Q_A observada en este trabajo se produjo a través de la transferencia hacia adelante de la cadena no habiendo recombinación entre el donador de electrones y Q_A estimulado por el estado redox del PSI.

Es posible también que la velocidad en la rotación de la proteína D1 se relacione con los mecanismos de tolerancia del PSII, ya que como lo sugieren Franco y colaboradores (1999), el metabolismo de D1 desempeña un papel importante en la dinámica de tolerancia al estrés por las plantas superiores.

d. Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad y eficiencia cuántica del transporte de electrones en los acarreadores intermedios (Q_B -PQ-Cit b_6/f -PC) y los acarreadores del lado aceptor del fotosistema I (A_0 - A_1 - F_x - F_A / F_B -Fd-FNR)

El PSI es un complejo proteico localizado en las zonas no apiladas del cloroplasto y regula el flujo de electrones entre el PSII y NADP^+ . La energía de excitación del complejo antena del PSI (LCHI) se transfiere al centro de reacción P700 que a su vez dona los electrones al primer aceptor A_0 . La separación de carga y la estabilización se da a través del segundo aceptor A_1 , donde finalmente se da la transferencia de electrones hacia los centros de hierro-azufre (F_x , F_A y F_B), lo que conlleva a la reducción de la ferredoxina (Fd). La forma oxidada del P700^+ formada después de la separación de carga se vuelve a reducir por la plastocianina (Pc). A sí mismo la Pc^+ recibe electrones del Cit b_6/f (Azcon-Bieto, 2008).

Es fundamental destacar que la mayoría de los estudios reportan que el PSII es un sitio altamente sensible a la presencia de Cd^{2+} y que su estructura y función se altera a un grado mayor que el Cit b_6/f y el PSI (Kumar y Kumar, 1999). En este estudio se determinó el funcionamiento del PSI a través de δRo que representa la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor del PSI y ϕRO que es el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI.

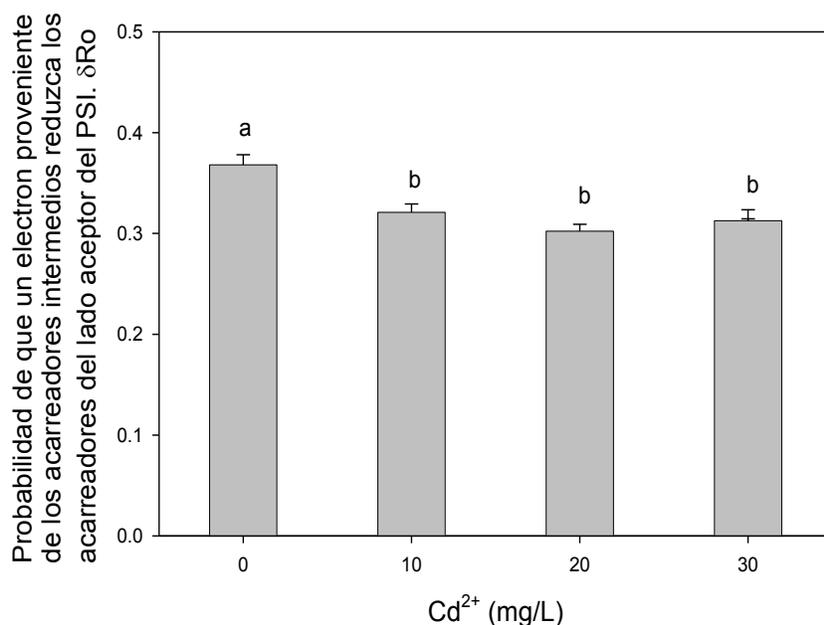


Figura 23. Efecto de distintas concentraciones de Cd^{2+} (10, 20 y 30mg/L) sobre la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor del PSI δRO en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. . n=16 \pm . Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento según la prueba de Tukey $p<0.05$.

Como se puede observar en la Figura 23 a medida que aumenta la concentración de Cd^{2+} en el medio disminuye la probabilidad de que un electrón de los acarreadores intermedios pueda ser transferido para reducir a los aceptores finales del lado aceptor del PSI ($\delta\text{Ro}=(1-V_i)/(1-V_j)$), habiendo diferencias significativas ($p<0.05$) en los tres tratamientos con respecto a lo obtenido en el grupo control, siendo la disminución más evidente la encontrada en el tratamiento de 20mg/L de Cd^{2+} con 16.28%. El rendimiento cuántico para la reducción de los últimos aceptores del PSI (ϕRo) es el resultado del producto de la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria (ϕPo), la probabilidad de que un

electrón se mueva más allá de Q_A^- (ϕEo) y la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor del PSI (δRo). En esta investigación ϕPo se mantiene sin cambios aparentes, mientras que ϕEo aumenta, por lo cual como se puede observar en la Figura 24 este parámetro se mantiene sin cambios aparentes con respecto al control.

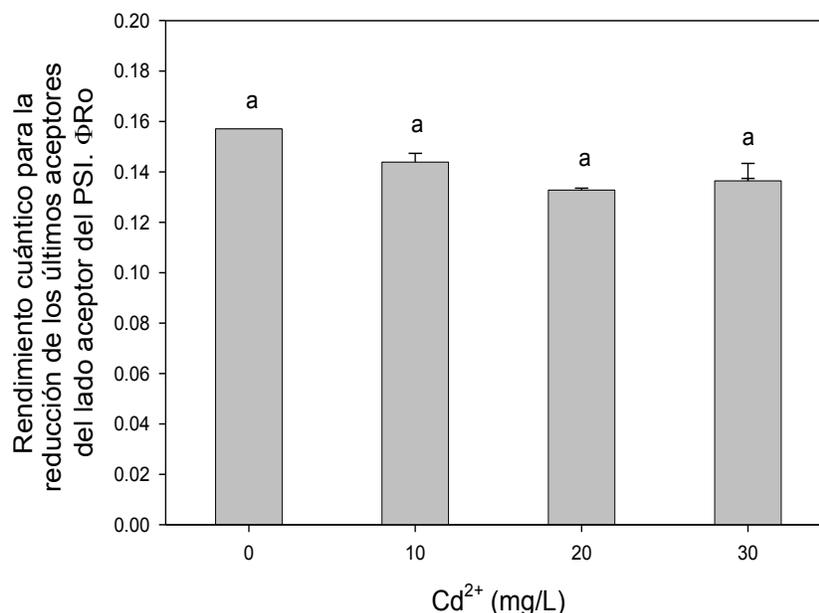


Figura 24. Efecto del Cd^{2+} (10, 20 y 30mg/L) sobre el rendimiento cuántico para la reducción de los aceptores del lado aceptor del PSI (ϕRO) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. después de 14 días de tratamiento. . n=16 \pm . Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento según la prueba de Tukey $p < 0.05$.

Es bien sabido que los metales pesados son capaces de competir con los metales nativos por los sitios de unión en distintas metaloproteínas. Muchos de estos sitios se encuentran relacionados con la inhibición de la cadena fotosintética de transporte de electrones (Kupper *et al.*, 2002). Con respecto a lo anterior se ha observado que algunos cationes divalentes como el Pb^{2+} bloquea la transferencia de electrones entre la Pc y P700, presuntamente por unión del catión a la plastocianina, la cual es un polipéptido que contiene un ion Cu^{2+} (Belatik *et al.*, 2013). Se sabe que algunos cationes divalentes como el Pb, Hg y el Cd compiten con dianas moleculares específicas con otros cationes divalentes esenciales como el Mn, Mg, Cu y Fe. Por lo cual es probable que el Cd^{2+} pueda

perturbar el sitio de unión del Fe^{2+} en el Cit b_6/f o en los centros Fe-S (F_X , F_A y F_B) del PSI e incluso en el sitio de unión del Cu^{2+} en la plastocianina. Aunado a esto Sigfridsson y colaboradores (2004) observaron que si bien el Cd^{2+} no tenía un efecto aparente sobre los distintos componentes del PSII, pero si sobre el lado aceptor de este PSII al unirse entre Q_B y algunos componentes moleculares con Fe^{2+} , posiblemente al desplazar al Fe^{2+} y unirse a los residuos de histidina que coordinan la unión de este ion y con ello se reduce la velocidad de la transferencia de electrones. Es importante mencionar que la histidina es el punto de entrada para los protones que participan en la protonación de la Q_B reducida. Alteraciones de este tipo podrían alterar sin duda la actividad de transporte de electrones entre los Fotosistemas.

Por otro lado es posible que una deficiencia de Fe^{2+} provocada por la presencia de Cd^{2+} reportado por varios autores, sea la principal causa de daño en el PSI. La deficiencia prolongada de Fe^{2+} da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tilacoides, lo cual trae como consecuencia la destrucción de los centros Fe-S (F_X , F_A y F_B), desestabilizando el funcionamiento del PSI y provocando cambios en la velocidad de transporte de electrones entre el PSII y PSI (Parmar *et al.*, 2013; Timperio *et al.*, 2007).

Si bien la curva de emisión de fluorescencia OJIP y la gráfica de fluorescencia variable ΔV (Fig. 16 y 17) muestran que el Cd^{2+} no tuvo un efecto evidente en la fotoquímica primaria de las plantas de *Phaseolus vulgaris* L., la velocidad de acarreo de electrones entre el PSII y PSI disminuye significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control, indicando una alteración directa en los acarreadores intermedios entre el Cit b_6/f y la ferredoxina oxido/reductasa en PSI. Esta disminución provocaría *in vivo*, un atraso en la oxidación de PSII y por lo tanto un aumento en la presión de reducción de Q_A , lo cual encendería mecanismos para liberar el exceso de energía en los centros de reacción sin embargo no ocurrió (Fig. 15). Valdés en el 2005, en plantas de *P. vulgaris* tratadas con Mn^{2+} reportó que el Cit b_6/f fue afectado por la presencia del ion, sin embargo no desencadenó la disipación de energía en forma de calor, atribuyendo este efecto a que las plantas tendieron a disminuir la captación de energía. Es posible que la exposición prolongada al Cd^{2+} conlleve a una adaptación al estrés, como algún tipo de reorganización de la membrana tilacoidal que permita la estabilización de la función fotoquímica (Maslenkova *et al.*, 1993).

Por otro lado, en la Figura 9 podemos observar que el cambio en la relación de la clorofila a/b está dado por un aumento predominante de la clorofila b sobre la clorofila a . Como se detalló con anterioridad, este cambio está relacionado con la modificación de la estequiometría entre PSII/PSI y con el grado de apilamiento del PSII. Perales en el 2001, reportó un aumento en el contenido de plastoquinona que estaba directamente relacionado con el aumento de clorofila a en plantas de *Triticum aestivum* L. sometidas a salinidad. Concluyó que un aumento de la poza de plastoquinona aumentaría la probabilidad de encontrar un acarreador oxidado en el PSII y de esta manera se liberaría la presión de reducción sobre Q_A .

Como lo muestra la Figura 24, es posible que la actividad del PSI se haya mantenido sin cambios aparentes con respecto a lo obtenido en el grupo control en plantas de *Phaseolus vulgaris*, debido a distintos mecanismos como flujo cíclico de electrones en el PSI, cambio en la proporción de PSII/PSI o sistemas de relajación, esto con el fin de ayudar a la oxidación de los acarreadores de electrones del PSII y de esta forma evitar la inhibición del transporte de electrones de este fotosistema. Sin embargo esto podría propiciar la generación de ROS y por lo tanto desencadenar estrés oxidativo lo cual ya ha sido observado en estudios anteriores (Asada, 1999; Samantary, 2002).

e. Efecto del Cd^{2+} sobre el Índice de rendimiento total

La estructura y función del PSII y PSI puede ser descrita mediante la obtención del índice de rendimiento total (PI_{tot}), este parámetro es muy sensible a factores de estrés sobre la actividad fotoquímica. PI_{tot} es un índice multifactorial, el cual parte de varios componentes independientes: la concentración de centros de reacción por clorofila [$ABS/RC/(1-ABS/RC)$], una expresión relacionada a la fotoquímica primaria ($\phi Po/(1-\phi Po)$), una expresión relacionada al transporte de electrones después de Q_A ($\Psi_o/(1-\Psi_o)$) y la probabilidad de reducir los aceptores finales del PSI ($\phi Ro/1-\phi Ro$).

El índice de rendimiento total, es sensible a los cambios en las propiedades de la antena, la eficiencia de atrapamiento, transporte electrónico después de Q_A así como en la reducción de los aceptores finales del PSI (Oukarroum *et al.*, 2007; Yusuf *et al.*, 2010). Por lo tanto, si un tipo de estrés afecta alguno de estos componentes, el efecto se reflejara en

el índice de rendimiento, por lo tanto su sensibilidad es superior a la alcanzada por cualquiera de sus componentes de forma individual (Stirbet y Govindjee, 2011).

Como puede observarse en la Figura 25 el PI_{total} se mantiene constante sin diferencias significativa ($p < 0.05$) con respecto a lo obtenido en el grupo control. Los parámetros que componen el índice aumentan de manera similar pero en distinta magnitud a excepción de δRo que se mantiene sin cambios a lo largo de los tratamientos.

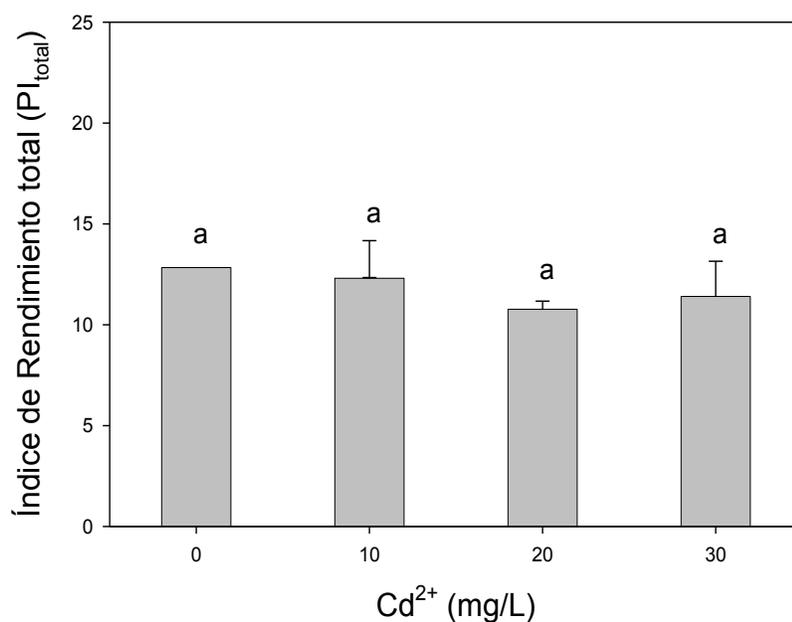


Figura 25. Efecto de las concentraciones de Cd^{2+} sobre el índice de funcionamiento o rendimiento total (PI_{total}) en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. $n=16 \pm$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamiento según la prueba de Tukey $p < 0.05$.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la actividad fotosintética y al contenido de Cd^{2+} presente en las hojas (Fig. 4c) este ion no se acumuló en concentraciones tóxicas en este tejido en plantas de *Phaseolus vulgaris*. La raíz es el primer sitio expuesto a la toxicidad de este ion y funciona como una barrera que restringe el transporte hacia la parte aérea de la planta. Sin embargo la capacidad de las plantas para acumular iones en la raíz depende de la especie (Gouia *et al.*, 2000).

Mishra *et al.*, (2006), observaron que la cantidad de Cd^{2+} almacenado en plantas de *Bacopa monnieri* fue muy alto y aproximadamente el 80.6% se mantuvo confinado en la raíz. Esto se puede atribuir a la inmovilización del ion en la pared celular y a la concentración extracelular de ciertos carbohidratos. Aunado a esto, es probable la acumulación en las vacuolas tanto de la raíz como de las hojas, por la acción de glutatión (GSH) y las fitoquelatinas (PCs) (Gouia *et al.*, 2000).

Skorzynska y Krupa (2006), encontraron que el contenido de GSH en plantas jóvenes de *Phaseolus coccineus* tratadas con Cd^{2+} fue alto en comparación con el grupo control, concluyeron que la síntesis de moléculas quelantes es una estrategia importante de tolerancia. Estos datos indican que, como ocurre con otras especies de plantas, la estrategia de desintoxicación de Cd^{2+} en plantas de frijol se basa en la acumulación de Cd^{2+} a nivel de raíz.

Como se mencionó anteriormente las PCs son péptidos de bajo peso molecular y ricos en cisteína capaces de eliminar al metal del citoplasma uniéndolo mediante la formación de enlaces tiol con los residuos de cisteína. Las PCs se sintetizan a partir del tripeptido glutatión (GSH, γ -Glu-Cys-Gly) por la acción de la enzima fitoquelatina sintasa. Las fitoquelatinas comparten una porción de su ruta de síntesis con el GSH, el cual se produce secuencialmente en dos pasos catalizados por la γ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa con consumo de ATP (Azcon y Talon, 2008). La participación de NADPH en la actividad del glutatión reductasa (GR) es esencial para mantener alto el nivel de GSH para la síntesis de PCs. El NADPH también es necesario para mantener reducido los tioles de las PCs (Adelaide *et al.*, 2002).

El crecimiento moderado observado en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con Cd^{2+} , durante el presente estudio también se puede deber a que el ATP y NADPH producido durante el proceso fotosintético y la actividad de la mitocondria a través del ciclo de Krebs así como el CO_2 fijado probablemente no se utilizan para el crecimiento, si no para la síntesis de carbohidratos extracelulares, así como de GSH y PCs que le permiten a la planta tolerar el estrés producido por Cd^{2+} .

Por otro lado el Cd^{2+} casi siempre adopta un solo estado de oxidación, que es como catión divalente. A diferencia de metales activamente redox como el Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ,

Mn²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺, el Cd²⁺ no es capaz de inducir la producción de ROS a través de la reacción de Fenton (Smeets *et al.*, 2005). Sin embargo es uno de los metales que estimula la producción de ROS y la activación del sistema de defensa antioxidativo. Existen varias hipótesis sobre como induce el desequilibrio redox: interacción con la defensa antioxidativa; disrupción de la cadena transportadora de electrones; cambios en la homeostasis del Fe²⁺ y por lo tanto en la producción de ROS mediados por la reacción de Fenton (Mobin *et al.*, 2007).

Los cloroplastos, son el componente principal del tejido fotosintético, son altamente sensibles al daño causado por la toxicidad de Cd²⁺. Las ROS también se producen por la reacción del cloroplasto (O₂) y los electrones que escapan desde el sistema de transferencia de electrones fotosintético bajo circunstancias normales (Zhang *et al.*, 2009). En un escenario donde la fijación de CO₂ disminuye por cambios estomáticos o el funcionamiento del ciclo de Calvin-Benson, se provocaría una disminución en el uso de los productos de la fase luminosa, ATP y NADPH. El atraso en la reducción de ADP y NADP⁺ podría provocar un estancamiento de los electrones en la cadena transportadora de electrones. Vías como la fotorrespiración y la reducción de otras moléculas podría permitir a la cadena transportadora seguir funcionando, no obstante con cierta dificultad. La sobre reducción de los transportadores de electrones provocaría una duración mayor del estado excitado de las clorofilas, de esta forma incentivando la producción de especies reactivas en los centros de reacción, lo que provocaría una fotodestrucción (Perales, 2001).

Las células vegetales han desarrollado un sistema de defensa antioxidante para contrarrestar los radicales libres con el fin de protegerse del estrés oxidativo, este sistema de defensa opera con la acción secuencial y simultanea de enzimas antioxidantes y componentes no enzimáticos. El primer grupo de enzimas involucrado en la defensa contra ROS son la peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). El papel más importante de las peroxidasas es la compactación de H₂O₂ y peróxidos orgánicos (Smeets *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Singh *et al.*, (2012) encontró que el aumento de la actividad de SOD, CAT y APX en hojas de *L. sativum* después del tratamiento con Cd²⁺ a bajas concentraciones conduce a la protección del aparato fotosintético. Las peroxidasas (especialmente SPOD) también juegan un papel en la polimerización de lignina. La lignificación de la pared celular limita la expansión de la

célula, esto puede ser un mecanismo de adaptación al estrés (Smeets *et al.*, 2005) y probablemente se relacione con la reducción del crecimiento de las hojas de *Phaseolus vulgaris* observado en este estudio.

Los componentes no enzimáticos que participan en la eliminación de ROS son el ascorbato (ASC), glutatión (GSH), α -tocoferol y β -carotenos (Qui *et al.*, 2008). El ascorbato es fundamental en la eliminación de H_2O_2 a través del ciclo ascorbato-glutation, donde H_2O_2 envía una señal sistémica para la inducción de algunas enzimas antioxidantes (Mobin *et al.*, 2007). El glutatión reducido (GSH) aparte de ser el precursor de las PCs desempeña un papel activo en la protección de la membrana contra daño de radicales libres, siendo el principal reductor intracelular presente en los cloroplastos, mitocondrias, y otras estructuras celulares, así como en el espacio intermembranal de los organelos (Maleva *et al.*, 2012). El α -tocoferol (vitamina E) es el mayor compuesto encontrado en los cloroplastos. Este antioxidante desactiva las ROS derivados de la fotosíntesis (1O_2 y OH^\cdot) y previene la propagación de la peroxidación lipídica eliminando los radicales lipid peroxy en la membrana tilacoidal (Hediji *et al.*, 2010). Los carotenoides son antioxidantes lipófilos altamente efectivos en la inactivación de radicales libre y daño fotoquímico (Mishra *et al.*, 2006 y Maleva *et al.*, 2011). El aumento aunque no significativo de la concentración de carotenoides observado en las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. tratadas con Cd^{2+} es un indicador del inicio de la posible sobreproducción de ROS y del aumento en la actividad de los distintos mecanismos de defensa antioxidante. En general, el equilibrio entre la producción y eliminación de ROS es crucial en la determinación de la carga oxidativa en los tejidos vegetales y su protección (Mohamed *et al.*, 2012).

La tolerancia de las plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a las distintas concentraciones de Cd^{2+} puede ser atribuido a la capacidad de la planta para secuestrar el metal y por el aumento de la defensa antioxidante. Ambos mecanismos consumen energía y este puede ser el motivo de la limitación del crecimiento, tanto a nivel de la raíz como de la parte aérea de la planta. Además de un cambio de los recursos metabólicos del crecimiento a la defensa, la reducción del crecimiento podría atribuirse a un efecto tóxico del metal sobre distintas biomoléculas (ya sea directa o mediada por ROS) (Iannelli *et al.*, 2002; Ekmekci *et al.*, 2008).

7. Conclusiones

Las plantas están sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables para su desarrollo y funcionamiento óptimo ocasionado por alteraciones en el medio ambiente. Por ello, han desarrollado distintos mecanismos fisiológicos que les han permitido tolerar el estrés medio ambiental y de esta forma sobrevivir en estas condiciones.

El cadmio (Cd^{2+}), es un elemento no esencial que a bajas concentraciones puede ser tóxico para las plantas. Las plantas de *Phaseolus vulgaris* expuestas a Cd^{2+} durante 14 días disminuyeron la velocidad de crecimiento, el índice de área foliar y su capacidad de asimilación de biomasa por unidad de área foliar.

La reducción del crecimiento no estuvo relacionada a cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos o a la capacidad fotoquímica del tejido foliar, sino a la reducción de la conductancia estomática y la capacidad de fijación de CO_2 por unidad de área foliar.

En las condiciones experimentales de la presente investigación, la tolerancia de *Phaseolus vulgaris* a las concentraciones del metal probadas depende de la capacidad de la raíz y el tallo para impedir su absorción y acumulación en el tejido fotosintéticamente activo.

La reducción del crecimiento observado durante el presente estudio también se puede deber a que la energía y biomasa derivada de la actividad fotosintética y respiratoria, no es utilizada para el crecimiento, sino para mantener los diferentes mecanismos que le permiten a la planta tolerar el estrés producido por Cd^{2+} .

Por lo anterior, podemos concluir que los cambios encontrados en esta investigación aparentemente son un ajuste fisiológico en la planta, en donde, aun cuando las condiciones imperantes de estrés por Cd^{2+} retrasa el crecimiento, los procesos metabólicos se mantienen casi sin cambios, a fin de mantener el aporte energético necesario para contrarrestar la condición de estrés y mantener el crecimiento de la planta.

8. Bibliografía

Acosta A. M. M. Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del valle del Mezquital, Hgo. Tesis que para obtener el título de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.

Anderson J. M. 1986. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 93-136.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplast: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *An. Rev. of Plant Physiol. And Plant. Mol.* 50: 601-639.

Atkin O. K., Millar A. H., Gardestrom P. y Day D. A. 2000. Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants, En: *Photosynthesis: Physiology and metabolism*, Leegood R. C., Sharkey T. D. y Von Caemmerer S. (Eds): 153-175, Dordrecht: Kluwer.

Azcon B. J. y Talon M. 2008. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Edit., Mc Graw Hill. Segunda Edición. Madrid España.

Baker N. R. y Oxborough K. 2008. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. *Annal Review of plant Biology*. 59: 89-113.

Balderas P. M. A., Cajuste L. J., Lugo F. J. A. y Vázquez A. A. 2003. Suelos agrícolas contaminados por metales pesados provenientes de depósitos de vehículos de desecho. *TERRA Latinoamericana*. 21 (4) octubre-diciembre: 449-459.

Barceló J. y Poschenrieder Ch. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13: 1-37.

Behera R. K., Mishra P. Ch. y Choudhury N. K. 2002. High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *J Plant Physiol*. 159: 967-73.

Belatik A., Hotchandani S., Tajmir-Riahi H. A. y Carpentier R. 2013. Alteration of the structure and function of photosystem I by Pb²⁺. Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology. 123: 41-47.

Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Curren Science. 89 (7): 1113-1121.

Busch A. y Hippler M. 2011. The structure and function of eukaryotic photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta. 1807 (8): 864-877.

Carter D. R. y Cheeseman J. M. 1993. The effects of external NaCl on thylakoid stacking in lettuce plants. Plant Cell and Environment. 16: 215-222.

Chen X., Wang J., Shi Y., Zhao M. Q. y Chi G. Y. 2011. Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. Botanical Studies.52: 41-46.

Chow W. S., Melis A. y Anderson J. A. 1990. Adjustemnts of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. PNAS. 87: 7502-7506.

Chugh L. K. y Sawhney S. K. 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 37 (4): 297-303.

Ci D., Jiang D., Wollenweber B., Dai T., Jing Q. y Cao W. 2010. Cadmium stress in wheat seedling: growth, cadmium accumulation and photosynthesis Acta Physiol Plant. 32: 365-373.

Clemens S., Antosiewicz D. M., Ward J. M., Schatman D. P. y Schroeder J. I. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12043-12048.

Conn S. y Guilliham M. 2010. Comparative physiology of elemental distributions in plants. Annals of Botany. 105: 1081-1102.

Comisión Nacional de Agua (CNA). 1993. Aprovechamiento de aguas residuales en la agricultura. Situación actual en México. Cuernavaca, Morelos, México.

Costa G. y Spitz E. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Science*. 128: 131-140.

Cuttriss A. J., Mimica A. J., Howitt C. A. y Pogson B. J. 2007. Carotenoids, En: The structure and function of plastids. Wise R. R. y Hooper J. K. Springer. 315-334.

Dalla Vecchia F., La Rocca N., Moro I., De Faveri S., Andreoli C. y Rascio N. 2005. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Sci*. 168: 329-338.

Delosme R. y Joliot P. 2002. Period four oscillations in chlorophyll a fluorescence. *Photosynthesis Research*. 73: 158-168.

Dewez D., Eullaffroy P., Popovic R. y Juneau P. 2007. Rapid chlorophyll a fluorescence transients of *Lemna minor* leaves as indication of light and exogenous electron carriers effect on photosystem II activity. *Photochemistry and Photobiology*. 83: 714-72.

Drazkiewicz M. y Baszynski T. 2005. Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. *Journal of Plant Physiology*. 62: 1013-1021.

Ekmekci Y., Tanyolac D. y Ayhan B. 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology*. 165: 600-611.

Enríquez S. y Borowitzka M. A. 2011. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae, En: Suggett D. J., Prásil O. y Borowitzka M. A. (Eds) *Chlorophyll a fluorescence in Aquatic Science: Methods and Applications*. Springer Dordrecht Heidelberg. 187-208.

Faller P., Kienzler K. y Krieger L. A. 2005. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochimica et Biophysica. Acta.* 1706: 158-164.

Financiera Nacional de Desarrollo, Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. 2014. Panorama del frijol. Secretaria de Hacienda y Crédito Publico. D. F. México.

Financiera Rural. 2011. Monografía del Frijol. D.F., México.

Flexas J., Ribas-Carbó M., Diaz-Espejo A., Galmés J. y Medrano H. 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ.* 31: 602-621.

Force L., Critchley C. y van Rensen J. J. S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynth. Res.* 78: 17-33.

Franco E., Alessandrelli S., Masojidek J., Margonelli A. y Giardi M. T. 1999. Modulation of D1 protein turnover under cadmium and heat stresses monitored by [³⁵S] methionine incorporation. *Plant Science.* 144: 53–61.

Garza A. V. 2000. Reusó agrícola de las aguas residuales de Cd. Juárez, (Chih., México), en el Valle de Juárez y su impacto en la salud pública. *Salud pública y nutrición.* 3 (1).

Gaucín P. S. D. y Torres G. E. 2011. El mercado de los fertilizantes 2011-2012 Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). México: 45-48.

Genty B., Briantais J. M. y Baker M. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimicaet Biophysica Acta.* 990: 87-92.

Ghnaya T., Slama I., Messedi D., Grignon C., Ghorbe M.H. y Abdelly C. 2007. Effects of Cd²⁺ on K⁺, Ca²⁺ and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: consequences on growth. *Chemosphere.* 67: 72-79.

González M. S., Perales V. H. y Salcedo A. M. O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 4 (27): 119-129.

Gorinova N., Nedkovska M., Todorovska E., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Georgieva K., Demirevska-Kepova K., Atanassov A. y Herzig R. 2007. Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environmental Pollution*. 145: 161-170.

Gouia H., Suzuki A., Brulfert J. y Ghorbal M. H. 2003. Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings, *J. Plant Physiol*. 160: 367-376.

Govindjee, kern J. F., Messinger J. y Whitmarsh J. 2010. Photosystem II, En: *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester.

Grattan S. R. y Grieve C. M. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*. 78: 127-157.

Haag-Kerwer A., Schafer H. J., Heiss S., Walter C. y Rausch T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot*. 50: 1827-1835.

Hediji H., Djebali W., Cabasson C., Maucourt M., Baldet P., Bertrand A., Zoghalmi L. B., Deborde C., Moing A., Brouquisse R., Chaibi W. y Gallusci P. 2010. Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 1965-1974.

Heldt H. W. 2002. Three decades in transport business: studies of metabolic transport in chloroplast – a personal perspective. *Photosynth. Res*. 73: 265-272.

Horton P. y Hague A. 1988. Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching, *Biochim. Biophys. Acta.* 932: 107-115.

Iannelli M. A., Pietrini F., Fiore L., Petrilli L. y Massacci A. 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 977-982.

Ingwersen J. y Streck T. 2005. A regional-scale study on the crop uptake of cadmium from sandy soils: measurement and modeling. *J. Environ Qual.* 34: 1026-1035.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2009. Metales Pesados. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales#2>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. Estadística básica sobre el medio ambiente. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Boletín de prensa. No. 121/13.

Keiper F. J., Chen D. M. y Filippis L. F. 1998. Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of Eucalyptus. *Journal of Plant Physiology.* 152: 564-573.

Kholodova V., Volkov K., Abdeyeva A. y Kuznetsov V. 2011. Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany.* 71: 382-389.

Kim Y. Y., Yang Y. Y. y Lee Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116: 368-372.

Krause G. H. y Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. *Ann Rev. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.

Krupa Z., Krupa M. y Gruszecki W. 2004. Changes in chlorophyll spectral characteristics in rye seedling grown under heavy metals stress. *Sciro publishing.* 1-4.

Kupper H., Setlik I., Spiller M., Kupper F. C. y Prásil O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology*. 38: 429-441.

Laegreid M., Bockman O. C. y Kaarstad E. O. 1999. *Agriculture fertilizers and environment*. Wallingford: CAB. 294.

Lazár D. 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*. 33: 9-30.

Lavaud J., Strzeppek R. F. y Kroth P. G. 2007. Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography*. 52: 1188-1194.

Leita L., Maggioni C. y Maggioni A. 1991. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*. 77: 139-147.

Li X-P., Muller –Moule P., Gilmore A. M. y Niyogi K. K. 2002. PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *PNAS*. 99: 15222-15227.

Liu X., Peng K., Wang A., Lian C. y Shen Z. 2010. Cadmium accumulation and distribution in populations of *Phytolacca Americana* L. and the role of transpiration. *Chemosphere*. 78: 1136-1141.

Lombardi A. T., Hidalgo T. M. R. y Vieira A. A. H. 2005. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. 60.

López M. A. F., Sagardoy R., Solanas M., Abadía A. y Abadía J. 2009. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in Hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*. 65: 376-385.

Losch R. y Kohl K. I. 1999. Plant respiration under the influence of heavy metals. En: Prasad M. N. V. Hagemeyer J. (Eds.). Heavy Metal Stress in Plants. Springer. Berlin, pp. 138-156.

Maleva M. G., Nekrasova G. F., Borisova G. G., Chukina N. V. y Ushakova O. S. 2012. Effect of Heavy Metals on Photosynthetic Apparatus and Antioxidant Status of Elodea. Russian Journal of Plant Physiology. 2 (59): 190-197.

Mallick N. y Mohn F. H. 2003. Use of chlorofyll fluorescence in metal-stress research: a case study whit the green microalga Scenedesmus. Ecotox. Environ. Safe. 22: 64-69.

Martínez P. A., Reigosa M. J. y Sanchez M. A. M. 2011. Imaging chlorophyll a fluorescence reveals specific spatial distributions under different stress conditions. Flora. 206: 836-844.

Maslenkova L. T., Zanev Y. y Popova L. P. 1993. Adaptation to salinity as monitored by PSII oxygen evolving reactions in barley thylakoids. Journal of Plant Physiology. 142: 629-634.

Mehta P., Allakhverdiev I. S. y Jajoo A. 2010. Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). Photosynthesis Research. 105: 249-255.

Meharg A. A. 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiol. Plantarum. 88: 191-198.

Méndez G. T., Rodríguez D. L. y Palacios M. S. 2000. Impacto del riego con aguas contaminadas, evaluado a través de la presencia de metales pesados en suelos. TERRA. 4 (18): 277-288.

Mishra S., Srivastava S., Tripathia R. D., Govindarajan R., Kuriakose S. V. y Prasad M. N. V. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology and Biochemistry. 44: 25-37.

Mobin M. y Khan N. A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*. 164: 601-610.

Mohamed A. A., Castagna A., Ranieri A. y Sanita di Toppi L. 2012. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 57: 15-22.

Moya J. L., Ros R. y Picazo I. 1995. Heavy metal-hormone interaction in rice plants: Effects on growth, net photosynthesis and carbohydrates distribution. *Journal of Plant Growth Regulation*. 14: 61-67.

Nalewajko C. y Olaveson M. M. 1995. Differential responses of growth, photosynthesis, respiration, and phosphate uptake to copper in copper-tolerant and copper-intolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Can. J. Bot.* 73: 1295-1303.

Nedjimi B. y Daoud Y. 2009. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora*. 204: 316-324.

Nesterenko T. V., Tikhomirov A. A. y Shikhov V. N. 2007. Induction of chlorophyll fluorescence and estimation of plant resistance to unfavorable Effects. *Zh. Obshch. Biol.* 68: 444-458.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2005. Tendencias mundiales actuales y perspectivas de los fertilizantes al 2009/10. Dirección de Información. Viale delle Terme di Caracalla. Italia, Roma: 13-16.

Oukarroum A., El Madidi S., Schansker G. y Strasser R. J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ Exp. Bot.* 60: 438-446.

Pagliano C., Raviolo M., Dalla V. F., Gabbrielli R., Gonnelli C., Rascio N., Barbato R. y La Rocca N. 2006. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 84: 70-78.

Parmar P., Kumari N. y Sharma V. 2013. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies*: 54: 45.

Pasichnaya Y. A. 2002. Toxicity of copper for hydrophytes: accumulation effects on photosynthesis, respiration and pigment systems. *Hydrobiol. J.* 38: 103-118.

Perales V. H. 2001. Efecto del estrés salino sobre los eventos primarios de la fotosíntesis en *Triticum aestivum* L. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Estado de México. México.

Perales V. H., González M. S., Montes H. C. y Cañizares V. R. O. 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. 67: 2274-2281.

Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A. y Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32: 539-548.

Pernía B., De Sousa A., Reyes R. y Castillo M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*. 33 (2): 112-119.

Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S. y Massacci A. 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav). Trin. Ex Steudel. *Plant Physiol.* 133: 829-837.

Polit E. S. y Baszynski T. 1997. Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Science*. 128: 11-21.

Prieto M. J., González R. C. A., Román G. A. D. y Prieto G. F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 29-44.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PUMA). 2010. Análisis del flujo del comercio y revisión de prácticas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y el Caribe. Roma, Italia. 35-56.

Qui R. L., Zhao X., Tang Y. T., Yu F. M. y Hu P. J. 2008. Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F. *Chemosphere*, 74: 6-12.

Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M. y Sanita di Toppi L. 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 45-54.

Rascio N., Vecchia F. D., La Rocca N., Barbato R., Pagliano C., Raviolo M., Gonnelli C. y Gabbrielli R. 2008. Metal accumulation and damage in rice (*cv. Vialone nano*) seedlings exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 62: 267-278.

Redjala T., Zelko I., Sterckeman T., Legue V. y Lux A. 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany*. 71: 241-248.

Rivetta A., Negrini N. y Cocucci M. 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ*. 20: 600-608.

Rod M., Liu M., Qi H., Zhang Z. P., Song Z. W. y Kou T. J. 2012. Response of photosynthesis and chlorofyll fluorescence to drouht stress in two maize cultivars. *African Journal Agriculture Research*. 34: 4751-4760.

Rodríguez A. A., Grunberg K. A. y Taleisnik E.L. 2002. Reactive oxygen species in elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiol.* 129: 1627-32.

Rodríguez S. M., Martínez C. N., romero P. M. C., del Rio L. A. y Sandalio L. M. 2008. Toxicidad del cadmio en plantas. *Ecosistemas.* 3 (17): 139-146.

Saghir K. M., Zaidi A., Goel R. y Musarrat J. 2011. Biomanagement of metal-contaminated soils. *Environmental Pollution.* 20: 1-29.

Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J. y Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in *Indian Mustard*. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.

Samantary S. 2002. Biochemical responses of Cr- tolerant Cr- sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere.* 47: 1065-1072.

Sanders D., Leight R. A. y Tester M. 1996. Plant ion channels. *Journal of Experimental Botany.* 62-80.

Schansker G., Tóth Z. S. y Strasser J. R. 2006. Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1757: 787-797.

SEDESOL/INE. 1993. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente. México.

Segura U. J. 2007. Caracterización de los efectos del Ni²⁺ en la fotosíntesis, captación de iones y en las enzimas antioxidativas en frijol común *Phaseolus vulgaris* y frijol mungo *Vigna radiata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Estado de México. México.

Sherameti I. y Varma A. 2010. Soil Heavy Metals. *Soil Biology.* Vol. 19. New York. EE. UU: 19-30.

Sigel A., Sigel H. y Sigel R. K. O. 2013. Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Science. Ed. 3. Vol. 11. New York. EE. UU: 2-26.

Sigfridsson K. G. V., Bernát G., Mamedov F. y Styring S. 2004. Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659: 19-31.

Singsaas E. L., Ort D. R. y Delucia E. H. 2004. Elevated CO₂ effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant Cell Environ.* 27: 41-50.

Sinhg G. S., Khan A. N. y Tuteja N. 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science*. 182: 112-120.

Skrzynska-Polit E. y Krupa Z. 2006. Lipid Peroxidation in Cadmium-Treated *Phaseolus coccineus* Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 482-487.

Smeets K., Cuypers A., Lambrechts A., Semane B., Hoet P., Van Laere A. y Van Gronsveld J. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 437-444.

Srivastava S., Tripathia R. D. y Dwivedi U. N. 2004. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.* 161: 665-674.

Stirbet A. y Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biology.* 104: 236-257.

Strasser B. J. y Strasser R. J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En: *Photosynthesis: from light to biosphere*. Mathis P. (Eds) Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. pp. 977-980.

Suzuki N. 2005. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnol.* 22: 19-25.

Taiz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Edit., Universitat Jaume I. Tercera Edición. Títol IV. Los Angeles California. EU.

Tang L., Ying R. R., Jiang D., Zeng X. W., Morel J. L., Tang Y. T. y Qui R. L. 2013. Impaired leaf CO₂ diffusion mediates Cd-induced inhibition of photosynthesis in the Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricate*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 73: 70-76.

Timperio A. M., D'Amici G. M., Barta C., Loreto F. y Zolla L. 2007. Proteomics, pigment composition and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *Journal of Experimental Botany.* 58: 3695-3710.

Toth Z. S., Schansker G., Garab G. y Strasser J. R. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1767: 295-305.

Tripathi B. N., Mehta, S. K. y Anshu Amar Gaur J. P. 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere.* 62: 538-544.

Tsimilli-Michael M. y Strasser R. J. 2008. In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: Applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. En: Varma A. (ed) *Mycorrhiza* 3. Springer. Berlin. Heidelberg: 679-703.

U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). 1993. Standards for the use or disposal of sewage sludge. 40 Code of Federal Regulations Part. 503. Washington D.C.

Valdés L. O. 2005. Caracterización de los efectos del Cr y Mn en la fotosíntesis y en los niveles de osmolitos compatibles de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata* y *Medicago sativa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Estado de México. México.

van Heerden P. D. R., Straseer R. J. y Kruger G. H. J. 2004. Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiology Plantarum*. 12: 239-249.

Vassilev A., Lidon F. C., Matos M., Ramalho J. C. y Yordanov I. 2002. Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium- and copper-treated barley plants. *Journal of Plant Nutrition*. 11(25): 2343-2360.

Vázquez A. A., Cajuste L. J., Carrillo G. R., Zamudio G. B., Álvarez S. E. y Castellanos R. J. Z. 2005. Límites permisibles de acumulación de cadmio, níquel y plomo en suelos del valle del Mezquital, Hidalgo. *TERRA Latinoamericana*. 4(23): 447-45.

Vrettos J. S., Stone D. A. y Brudvig G. W. 2001. Quantifying the ion selectivity of the Ca²⁺ site in photosystem II: Evidence for direct involvement of Ca²⁺ in O₂ formation. *Biochemistry*. 40: 7937-7945.

Wentworth M., Ruban A. V. y Horton P. 2004. The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complex. *Biochemistry*. 43: 501-509.

Ying R. R., Qui R. L., Tang Y. T., Hua P. J., Qui H., Chen H. R., Shi T. H. y Morel J. L. 2010. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd Hyperaccumulator *Pteris divaricate*. *Journal of Plant Physiology*. 167: 81-87.

Yusuf M. A., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R. J., Tsimilli-Michael M. y Govindjee, Sarin N. B. 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 1428-1438.

Zhang F., Zhang H. X., Wang G., Xu L. y Shen Z. 2009. Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*. 68: 76-84.

Zhu R. K., Macfie S. M. y Ding Z. F. 2005. Cadmium-induced plant stress investigated by scanning electrochemical microscopy. *J. Exp. Bot.* 56: 2831-2838.

Zhou W. B. y Qui B. S. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Sci.* 169: 737-745.

9. Apéndice

Análisis de varianza de un factor y Tukey ($p=0.05$), datos analizados con prueba de distribución normal y homogeneidad de varianza de Bartlett.

Sistema SAS Procedimiento ANOVA

Figura 3a. Tasa media de crecimiento relativo.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.27039185	0.09013062	250.50	<.0001
Error	24	0.00863543	0.00035981		
Total correcto	27	0.27902728			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
6.917366	0.018969	0.274218

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.00036
Valor crítico del rango estudentizado	3.90126
Diferencia significativa mínima	0.028

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.44064	7	1
B	0.24019	7	2
B	0.23047	7	3
C	0.18557	7	4

Figura 3b. Índice de área foliar

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.27039185	0.09013062	250.50	<.0001
Error	24	0.00863543	0.00035981		
Total correcto	27	0.27902728			

	Coef Var	Raiz MSE	y Media
	6.917366	0.018969	0.274218

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.00036
Valor crítico del rango estudentizado	3.90126
Diferencia significativa mínima	0.028

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.44064	7	1
B	0.24019	7	2
B			
B	0.23047	7	3
C	0.18557	7	4

Figura 3c. Tasa de asimilación neta

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00004821	0.00001607	13.69	0.0001
Error	16	0.00001878	0.00000117		
Total correcto	19	0.00006699			

	Coef Var	Raiz MSE	y Media
	17.59984	0.001083	0.006155

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	16
Error de cuadrado medio	1.174E-6
Valor crítico del rango estudentizado	4.04609
Diferencia significativa mínima	0.002

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.0082770	5	1
A			
B A	0.0065134	5	2
B			
B	0.0059004	5	3
C	0.0039312	5	4

Figura 4c. Contenido de Cd²⁺ en hojas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	6669.771396	2223.257132	11.49	0.0008
Error	12	2321.416435	193.451370		
Total correcto	15	8991.187831			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
20.78181	13.90868	66.92719

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	193.4514
Valor crítico del rango estudentizado	4.19852
Diferencia significativa mínima	29.198

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	102.216	4	1
B	57.328	4	2
B			
B	54.173	4	4
B			
B	53.992	4	3

Figura 5a. Contenido de Ca²⁺ en raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	509.9269489	169.9756496	6.16	0.0557
Error	4	110.3348214	27.5837054		
Total correcto	7	620.2617704			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
15.43487	5.252019	34.02698

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	27.58371
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	21.38

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	42.365	2	4
A			
A	41.553	2	3
A			
A	27.312	2	1
A			
A	24.878	2	2

Figura 5b. Contenido de Ca²⁺ en tallo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	7315.656628	2438.552209	8.39	0.0336
Error	4	1162.786148	290.696537		
Total correcto	7	8478.442776			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
35.75675	17.04983	47.68281

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	290.6965
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	69.407

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	99.78	2	1
A			
B A	35.33	2	4
B			
B	28.48	2	3
B			
B	27.13	2	2

Figura 5c. Contenido de Ca²⁺ en hoja

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	6669.771396	2223.257132	11.49	0.0008
Error	12	2321.416435	193.451370		
Total correcto	15	8991.187831			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
20.78181	13.90868	66.92719

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	193.4514
Valor crítico del rango estudentizado	4.19852
Diferencia significativa mínima	29.198

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	102.216	4	1
B	57.328	4	2
B			
B	54.173	4	4
B			
B	53.992	4	3

Figura 6a. Contenido de Mg²⁺ en raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	217.7028784	72.5676261	5.02	0.0764
Error	4	57.7688146	14.4422037		
Total correcto	7	275.4716930			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
11.47323	3.800290	33.12310

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	14.4422
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	15.47

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	37.501	2	3
A			
A	37.120	2	1
A			
A	33.332	2	4
A			
A	24.540	2	2

Figura 6b. Contenido de Mg²⁺ en tallo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	122.4170373	40.8056791	1.02	0.4726
Error	4	160.2282689	40.0570672		
Total correcto	7	282.6453061			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
19.09055	6.329065	33.15288

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	40.05707
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	25.765

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	39.717	2	1
A			
A	32.498	2	2
A			
A	30.544	2	3
A			
A	29.853	2	4

Figura 6c. Contenido de Mg²⁺ en hoja

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	203.3263890	67.7754630	3.13	0.0658
Error	12	259.8687210	21.6557268		
Total correcto	15	463.1951100			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
16.02139	4.653571	29.04599

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	21.65573
Valor crítico del rango estudentizado	4.19852
Diferencia significativa mínima	9.7691

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	33.046	4	3
A			
A	31.938	4	4
A			
A	26.768	4	2
A			
A	24.433	4	1

Figura 7a. Contenido de K⁺ en raíz

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1887.626168	629.208723	9.47	0.0273
Error	4	265.666884	66.416721		
Total correcto	7	2153.293052			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
3.759907	8.149645	216.7512

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	66.41672
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	33.176

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	237.992	2	2
A			
B A	222.061	2	3
B A			
B A	210.958	2	4
B			
B	195.993	2	1

Figura 7b. Contenido de K⁺ en tallo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	153.8055983	51.2685328	1.30	0.3892
Error	4	157.5341662	39.3835416		
Total correcto	7	311.3397645			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
2.819949	6.275631	222.5441

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	39.38354
Valor crítico del rango estudentizado	5.75706
Diferencia significativa mínima	25.547

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	226.889	2	4
A			
A	225.923	2	2
A			
A	221.579	2	3
A			
A	215.786	2	1

Figura 7c. Contenido de K⁺ en hoja

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	4830.160479	1610.053493	9.56	0.0017
Error	12	2020.688844	168.390737		
Total correcto	15	6850.849323			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
6.160047	12.97655	210.6566

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	168.3907
Valor crítico del rango estudentizado	4.19852
Diferencia significativa mínima	27.241

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	231.475	4	3
A			
B A	222.544	4	4
B			
B C	201.304	4	2
C			
C	187.304	4	1

Figura 8a. Conductancia estomática

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00109066	0.00036355	15.43	0.0011
Error	8	0.00018849	0.00002356		
Total correcto	11	0.00127915			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
12.87936	0.004854	0.037688

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.000024
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	0.0127

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.053820	3	1
B	0.035567	3	2
B			
B	0.031267	3	4
B			
B	0.030100	3	3

Figura 8b. Transpiración

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.37754233	0.12584744	1.26	0.3505
Error	8	0.79735733	0.09966967		
Total correcto	11	1.17489967			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
26.00893	0.315705	1.213833

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.09967
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	0.8255

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	1.4300	3	1
A			
A	1.3000	3	4
A			
A	1.1767	3	2
A			
A	0.9487	3	3

Figura 8c. Concentración interna de CO₂.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	2032.250000	677.416667	1.16	0.3832
Error	8	4672.666667	584.083333		
Total correcto	11	6704.916667			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
17.89104	24.16782	135.0833

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	584.0833
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	63.192

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	155.67	3	4
A			
A	136.67	3	3
A			
A	125.67	3	1
A			
A	122.33	3	2

Figura 8d. Tasa de asimilación de CO₂.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	40.56696667	13.52232222	26.23	0.0002
Error	8	4.12480000	0.51560000		
Total correcto	11	44.69176667			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
11.94432	0.718053	6.011667

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.5156
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	1.8775

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	8.9933	3	1
B	6.0600	3	2
B			
B	4.6367	3	4
B			
B	4.3567	3	3

Figura 9a. Clorofila a

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	8.04016140	2.68005380	1.69	0.2455
Error	8	12.68216180	1.58527022		
Total correcto	11	20.72232320			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
19.67682	1.259075	6.398775

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	1.58527
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	3.2921

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	7.351	3	4
A			
A	6.762	3	3
A			
A	6.364	3	2
A			
A	5.118	3	1

Figura 9b. Clorofila b

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.41744990	0.13914997	4.77	0.0343
Error	8	0.23319929	0.02914991		
Total correcto	11	0.65064919			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
14.11886	0.170733	1.209258

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.02915
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	0.4464

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	1.4348	3	4
A			
B A	1.2830	3	3
B A			
B A	1.1975	3	2
B			
B	0.9217	3	1

Figura 9c. Carotenoides

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1.03227626	0.34409209	1.89	0.2095
Error	8	1.45543795	0.18192974		
Total correcto	11	2.48771421			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
24.87745	0.426532	1.714533

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.18193
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	1.1153

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	2.0733	3	4
A	1.8461	3	3
A	1.6666	3	2
A	1.2721	3	1

Figura 9d. Relación clorofila a y b.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.30679788	0.10226596	0.41	0.7506
Error	8	1.99798656	0.24974832		
Total correcto	11	2.30478444			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
9.445742	0.499748	5.290725

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	8
Error de cuadrado medio	0.249748
Valor crítico del rango estudentizado	4.52880
Diferencia significativa mínima	1.3067

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	5.5420	3	1
A	5.3099	3	2
A	5.1887	3	3
A	5.1224	3	4

Figura 10. Consumo de O₂ (respiración).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00412042	0.00137347	2.14	0.1121
Error	36	0.02309834	0.00064162		
Total correcto	39	0.02721876			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
26.15206	0.025330	0.096858

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	36
Error de cuadrado medio	0.000642
Valor crítico del rango estudentizado	3.80880
Diferencia significativa mínima	0.0305

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.10646	10	3
A			
A	0.10292	10	2
A			
A	0.09798	10	4
A			
A	0.08007	10	1

Figura 11. Tasa de liberación de O₂.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.38643238	0.12881079	5.04	0.0051
Error	36	0.91987465	0.02555207		
Total correcto	39	1.30630703			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
22.52410	0.159850	0.709685

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	36
Error de cuadrado medio	0.025552
Valor crítico del rango estudentizado	3.80880
Diferencia significativa mínima	0.1925

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.82893	10	1
A			
A	0.76951	10	2
A			
B A	0.66920	10	3
B			
B	0.57110	10	4

Figura 12. Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria del PSII (Fv/Fm).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.01123933	0.00374644	3.50	0.0346
Error	20	0.02142072	0.00107104		
Total correcto	23	0.03266006			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
4.017825	0.032727	0.814538

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	0.001071
Valor crítico del rango estudentizado	3.95829
Diferencia significativa mínima	0.0529

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.84660	6	2
A			
B A	0.82093	6	3
B A			
B A	0.80100	6	4
B			
B	0.78962	6	1

Figura 13. Rendimiento cuántico máximo para el fotosistema II (ϕ PSII)

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.02753979	0.00917993	3.03	0.0532
Error	20	0.06053417	0.00302671		
Total correcto	23	0.08807396			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
11.37762	0.055016	0.483542

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	0.003027
Valor crítico del rango estudentizado	3.95829
Diferencia significativa mínima	0.0889

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.51933	6	2
A			
A	0.51450	6	1
A			
A	0.45800	6	3
A			
A	0.44233	6	4

Figura 14. Transporte electrónico aparente (rETR).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	182.9261812	60.9753937	3.03	0.0532
Error	20	402.0830685	20.1041534		
Total correcto	23	585.0092497			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
11.37762	4.483766	39.40865

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	20.10415
Valor crítico del rango estudentizado	3.95829
Diferencia significativa mínima	7.2456

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	42.326	6	2
A			
A	41.932	6	1
A			
A	37.327	6	3
A			
A	36.050	6	4

Figura 15. Decaimiento No-Fotoquímico (NPQ).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.14716579	0.04905526	0.60	0.6248
Error	20	1.64548083	0.08227404		
Total correcto	23	1.79264663			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
28.20745	0.286835	1.016875

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	20
Error de cuadrado medio	0.082274
Valor crítico del rango estudentizado	3.95829
Diferencia significativa mínima	0.4635

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	1.0767	6	3
A			
A	1.0543	6	2
A			
A	1.0543	6	1
A			
A	0.8822	6	4

Figura 19. Centros de reacción activos en la reducción de Q_A (10RC/ABS).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	4.04798201	1.34932734	6.84	0.0005
Error	60	11.84427181	0.19740453		
Total correcto	63	15.89225382			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
8.739708	0.444302	5.083720

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.197405
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.4151

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	5.3366	16	2
A			
A	5.1871	16	3
A			
A	5.1452	16	4
B	4.6659	16	1

Figura 21a. Flujo de excitación absorbido por centro de reacción (ABS/RC).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.67077510	0.22359170	7.38	0.0003
Error	60	1.81841678	0.03030695		
Total correcto	63	2.48919188			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
8.764620	0.174089	1.986269

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.030307
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.1626

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	2.15583	16	1
B	1.96764	16	4
B			
B	1.93762	16	3
B			
B	1.88399	16	2

Figura 21b. Flujo de excitación atrapado por centro de reacción (TRo/RC).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.36133808	0.12044603	8.02	0.0001
Error	60	0.90080832	0.01501347		
Total correcto	63	1.26214641			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
7.745050	0.122529	1.582036
Alfa		0.05
Error de grados de libertad		60
Error de cuadrado medio		0.015013
Valor crítico del rango estudentizado		3.73709
Diferencia significativa mínima		0.1145

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	1.70687	16	1
B	1.57012	16	4
B			
B	1.54113	16	3
B			
B	1.51003	16	2

Figura 21c. Flujo electrónico por centro de reacción (ETo/RC).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00804940	0.00268313	0.62	0.6054
Error	60	0.26005738	0.00433429		
Total correcto	63	0.26810677			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
7.806492	0.065835	0.843341
Alfa		0.05
Error de grados de libertad		60
Error de cuadrado medio		0.004334
Valor crítico del rango estudentizado		3.73709
Diferencia significativa mínima		0.0615

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.86136	16	4
A			
A	0.84416	16	1
A			
A	0.83445	16	2
A			
A	0.83340	16	3

Figura 21d. Disipación térmica por centro de reacción (Dlo/RC).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.04834319	0.01611440	5.44	0.0022
Error	60	0.17767127	0.00296119		
Total correcto	63	0.22601446			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
13.46175	0.054417	0.404233

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.002961
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.0508

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.44896	16	1
B	0.39752	16	4
B			
B	0.39649	16	3
B			
B	0.37396	16	2

Figura 22a. Rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{Po}).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00084302	0.00028101	2.33	0.0832
Error	60	0.00723087	0.00012051		
Total correcto	63	0.00807388			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
1.376799	0.010978	0.797350

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.000121
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.0103

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.802025	16	2
A			
A	0.799213	16	4
A			
A	0.795813	16	3
A			
A	0.792350	16	1

Figura 22b. Eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de QA (Ψ_0).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00084301	0.00028100	2.33	0.0832
Error	60	0.00723087	0.00012051		
Total correcto	63	0.00807388			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
5.417175	0.010978	0.202650

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.000121
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.0103

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.207650	16	1
A			
A	0.204188	16	3
A			
A	0.200788	16	4
A			
A	0.197975	16	2

Figura 22c. Rendimiento cuántico del transporte electrónico (ϕ_{Eo}).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.02535786	0.00845262	6.22	0.0010
Error	60	0.08157486	0.00135958		
Total correcto	63	0.10693272			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
8.623412	0.036872	0.427586

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	0.00136
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	0.0344

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.44461	16	2
A			
A	0.44021	16	4
A			
A	0.43141	16	3
B	0.39411	16	1

Figura 23. Probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor del PSI (δ RO).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.03112490	0.01037497	9.91	<.0001
Error	60	0.06284656	0.00104744		
Total correcto	63	0.09397146			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
9.869725	0.032364	0.327914
Alfa		0.05
Error de grados de libertad		60
Error de cuadrado medio		0.001047
Valor crítico del rango estudentizado		3.73709
Diferencia significativa mínima		0.0302

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.36419	16	1
B	0.32362	16	2
B	0.31896	16	4
B	0.30488	16	3

Figura 24. Rendimiento cuántico para la reducción de los aceptores del lado aceptor del PSI (ϕ RO).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.00200849	0.00066950	1.62	0.1945
Error	60	0.02481767	0.00041363		
Total correcto	63	0.02682616			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
14.48618	0.020338	0.140395
Alfa		0.05
Error de grados de libertad		60
Error de cuadrado medio		0.000414
Valor crítico del rango estudentizado		3.73709
Diferencia significativa mínima		0.019

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	0.145975	16	1
A	0.143897	16	2
A	0.140374	16	4
A	0.131333	16	3

Figura 25. Índice de funcionamiento o rendimiento total (PI_{total}).

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	61.4367903	20.4789301	1.59	0.2017
Error	60	773.7485226	12.8958087		
Total correcto	63	835.1853129			

Coef Var	Raiz MSE	y Media
30.30278	3.591073	11.85064

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	60
Error de cuadrado medio	12.89581
Valor crítico del rango estudentizado	3.73709
Diferencia significativa mínima	3.355

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	t
A	13.253	16	2
A			
A	12.206	16	4
A			
A	11.288	16	1
A			
A	10.655	16	3