



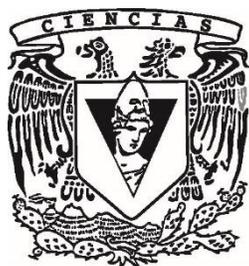
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Respuesta fisiológica de *Baccharis sarothroides* A. Gray a la toxicidad
por cobre

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:
CAROLINA REYES SERRANO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

2016

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

	Pág.
Lista de Abreviaturas	III
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
1. Resumen	1
2. Marco Teórico	2
2.1 Contaminación del suelo por metales pesados	2
2.1.1 La industria minera en México: sistemas áridos y semiáridos	4
2.1.1.1 Industria cuprífera	7
2.2 Metales pesados en plantas	8
2.2.1 Tolerancia de las plantas a los metales pesados	9
2.3 Consideraciones generales del Cobre	13
2.3.1 Propiedades químicas	13
2.3.2 Fuente natural y antropogénica	13
2.3.3 Nutriente esencial para la vida	14
2.3.4 Elemento tóxico para la salud humana	16
2.4 Toxicidad y Tolerancia al Cobre en plantas	16
2.4.1 Absorción y transporte del Cobre en el tejido vascular	16
2.4.2 Absorción del Cobre a nivel celular	18
2.4.3 Síntomas visibles de Estrés y Toxicidad	20
2.4.4 Plantas metalofitas	21
2.4.4.1 Plantas hiperacumuladoras	23
2.5 Hiperacumulación de Cobre en la Familia Asteraceae	25
2.5.1 Género <i>Baccharis</i>	26
2.5.1.1 <i>Baccharis sarothroides</i> A. Gray	28
3. Antecedentes e Hipótesis	29
4. Objetivos	33
4.1 Objetivo general	33

4.2 Objetivos particulares:.....	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1 Sitio de estudio	34
5.2 Material Biológico	34
5.3 Bloque I: Determinación del peso y área de las semillas	35
5.4 Bloque II: Evaluación del efecto de Cobre en la Biomasa de plántulas de 4 días de edad ..	36
5.5 Bloque III: Evaluación del efecto de Cobre en plantas de 30 días de edad.....	37
5.5.1 Diseño experimental, semillas y sustrato inerte.....	37
5.5.2 Parámetros de crecimiento	37
5.5.3 Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	42
5.5.4 Análisis de elementos químicos: Hojas y Raíces.....	45
5.6 Análisis estadístico	46
6. Resultados	48
7. Discusión.....	67
8. Conclusiones	76
9. Perspectivas.....	78
10. Bibliografía.....	80
11. Anexos.....	97

Lista de Abreviaturas

ABS = Absorbance (Absorbancia)

AGR = Absolute Growth Rate (Tasa de crecimiento absoluto)

Chl *a* = Chlorophyll *a* (Clorofila *a*)

Cu = Cobre (Cu⁺²)

F₀ = Minimal fluorescence level (nivel mínimo de fluorescencia)

F_m = Maximum fluorescence level (nivel máximo de fluorescencia)

F_v = Variable fluorescence (Fluorescencia variable)

F_v/F_m = Máximum quantum yield of PSII photochemistry (producción cuántica máxima de *PSII*)

LAR = Leaf Area Ratio (Proporción de Área Foliar)

LWR = Leaf Weight Ratio (Proporción de Peso Foliar)

NAR = Net Assimilation Rate (Tasa de Asimilación Neta)

PEA = Plant Efficiency Analyser (Analizador portátil de la fluorescencia)

PI = Performance index (Índice de Desempeño)

PI_{ABS} = Performance index on absorption basis (Índice de Desempeño Fotosintético)

PQ = Plastoquinone (Plastoquinona)

PSII = Photosystem II (Fotosistema II)

RGR = Relative Growth Rate (Tasa de Crecimiento Relativa)

RWR = Root Weight Ratio (Proporción de Peso en Raíz)

SLA = Specific Leaf Area (Área Foliar Específica)

SWR = Stem Weight Ratio (Proporción de Peso en Tallo)

T_{fm} = The time at which the maximal fluorescence occurs (tiempo en que ocurre la máxima fluorescencia, *F_m*)

XRF = X-Ray Fluorescence (Fluorescencia de Rayos-X)

Notas:

1. Las abreviaturas utilizadas en este trabajo, por convención, hacen referencia a las siglas en inglés, sin embargo, en cada abreviatura se indica su significado.
2. Hermosillo = población del sitio no-contaminado
3. Nacozari de García = población del sitio contaminado con Cu

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Depósitos de residuos (jales) en Nacozeni de García, Sonora	6
Figura 2. Absorción relativa y bioacumulación potencial de algunas plantas de ambientes contaminados	9
Figura 3. Procesos celulares que pueden ocurrir en los diferentes compartimentos en las plantas tolerantes a los metales pesados.....	12
Figura 4. Esquema de los componentes de la homeostasis del Cu en <i>Arabidopsis sp.</i>	17
Figura 5. Esquema del transporte celular identificado para el Cu en las plantas.....	19
Figura 6. Algunas de las especies del Género <i>Baccharis</i> : <i>B. halimifolia</i> , <i>B. salicifolia</i> , <i>B. linearis</i> , <i>B. sarothroides</i>	27
Figura 7. Semillas de <i>Baccharis viminea</i> y plántulas de <i>Baccharis pilularis</i>	28
Figura 8. Presas de jales existentes en Nacozeni de García, Sonora	30
Figura 9. <i>Baccharis sarothroides</i> en Sonora en el sitio no contaminado (Hermosillo), individuo con flores, y en el sitio contaminado, individuo sin flores (Jales, Nacozeni de García).....	35
Figura 10. Plantas de 90 días de edad, al final del tratamiento con Cu, de la población de Hermosillo y de la población de Nacozeni.....	38
Figura 11. Componentes del sistema Handy PEA	43
Figura 12. Periodo de crecimiento de <i>B. sarothroides</i> y su periodo de tratamientos con Cu.....	43
Figura 13. Análisis de los elementos químicos con la técnica XRF	46
Figura 14. Peso y área de las semillas de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni	48
Figura 15. Fotos al microscopio de las semillas de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni.....	48
Figura 16. Porcentaje de la biomasa seca en plántulas de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni.....	49
Figura 17. Biomasa seca total en plantas jóvenes de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni.....	50
Figura 18. Tasa de crecimiento absoluta (AGR) de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni.....	51
Figura 19. Tasa de crecimiento relativa (RGR) y Tasa de asimilación neta (NAR) de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozeni	52

Figura 20. Proporción de área foliar (LAR), Área foliar específica (SLA) y Proporción de biomasa foliar (LWR) de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozari.....	53
Figura 21. Biomasa seca de hojas y Área foliar de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozari.....	54
Figura 22. Asignación de biomasa a raíz (RWR), tallo (SWR) y hojas (LWR) de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozari.....	55
Figura 23. Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria F_v/F_m e Índice de desempeño PI_{ABS} , de las plantas de <i>B. sarothroides</i> de la población de Hermosillo y Nacozari	56
Figura 24. Proporción relativa de Cu en raíces y hojas de <i>B. sarothroides</i> con 90 días de vida, de la población de Hermosillo y Nacozari.....	59
Figura 25. Proporción relativa de P y S en raíces y en hojas de <i>B. sarothroides</i> con 90 días de vida, de la población de Hermosillo y Nacozari.....	63
Figura 26. Proporción relativa de Mn y K en raíces y en hojas de <i>B. sarothroides</i> con 90, días de vida.....	64
Figura 27. Proporción relativa de Fe y Zn en raíces y en hojas de <i>B. sarothroides</i> con 90 días de vida.....	65
Figura 28. Proporción relativa de Ca y Cl en raíces y en hojas de <i>B. sarothroides</i> con 90 días de vida.....	65
Figura 29. Procesos fotoquímicos en las plantas. Luz transmitida, reflejada y absorbida.....	101
Figura 30. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones.....	102
Figura 31. Parámetros de fluorescencia en hojas tratadas en oscuridad y luz utilizando la técnica de pulsos de amplitud modulada de la fluorescencia de la clorofila asociada al PSII.....	103

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Micronutrientes y Macronutrientes necesarios para el óptimo funcionamiento de los organismos.....	3
Tabla 2. Concentraciones geoquímicas de algunos metales pesados que se encuentran normalmente en el suelo, o por encima del umbral de tolerancia de plantas, animales y seres humanos.....	4
Tabla 3. Umbral de concentración de metales en plantas hiperacumuladoras por taxa y número de familias (Baker <i>et al.</i> , 2000).....	24
Tabla 4. Angiospermas terrestres hiperacumuladoras o potencialmente hiperacumuladoras de Cobre.....	25
Tabla 5. Equivalencia de la concentración del CuSO ₄ en sustrato inerte (µg/kg) y en solución acuosa (µM).	F36
Tabla 6. Resumen de las funciones de los nutrientes inorgánicos en las plantas.....	97
Tabla 7. Solución de Hoagland modificada a una quinta potencia.	98
Tabla 8. Parámetros de crecimiento de <i>B. sarothroides</i> con diferentes tratamientos de CuSO ₄ para ambas poblaciones de Hermosillo y Nacozari.....	104
Tabla 9. Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria (F_v/F_m) de <i>B. sarothroides</i> con diferentes tratamientos con CuSO ₄	105
Tabla 10. Índice de eficiencia fotosintética (PI_{ABS}) de <i>B. sarothroides</i> con diferentes tratamientos con CuSO ₄	106
Tabla 11. Concentración mineral (ppm) en el tejido seco de las hojas de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozari con diferentes tratamientos de CuSO ₄	107
Tabla 12. Concentración mineral (ppm) en el tejido seco de la raíz de <i>B. sarothroides</i> de la población Hermosillo y Nacozari con diferentes tratamientos de CuSO ₄	108

1. Resumen

En este trabajo se evaluó el desempeño fisiológico de *Baccharis sarothroides* A. Gray al aumento en la concentración del cobre (Cu), en plántulas (4 días de edad) y plantas jóvenes (30 días de edad) provenientes de semillas colectadas en un sitio contaminado (Nacozari de García) y un sitio no-contaminado (Hermosillo) del Estado de Sonora, México.

Se registró el peso y el área de las semillas de ambos sitios. Posteriormente, en las plántulas se evaluó el efecto de 0, 0.4, 2, 4, 10, 50 y 100 μM de Cu, en la biomasa seca, a 8 días de exposición. Por último, en plantas jóvenes se evaluó el efecto de 0, 100, 500 y 1000 μg de Cu kg^{-1} de suelo, a 60 días de exposición, a través de un análisis de crecimiento clásico y de la eficiencia fotosintética. Al concluir los tratamientos con Cu de las plantas jóvenes, se determinó la concentración del metal en el tejido seco de hojas y raíces con la técnica de fluorescencia de rayos X (sistema-XRF). En el análisis de las semillas se encontraron diferencias en el peso y área de las semillas procedentes de ambos sitios; sin embargo, las plántulas y plantas jóvenes de ambas poblaciones mostraron la capacidad de tolerar las concentraciones usadas de Cu. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de Cu en las plantas jóvenes de *B. sarothroides*, tanto para los parámetros clásicos de crecimiento como para la eficiencia fotosintética. No obstante, las plantas de ambos sitios se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de las hojas independiente al aumento en la concentración del Cu en los tratamientos. Las plantas de Nacozari tuvieron una menor producción de biomasa foliar, una menor área foliar y una mayor densidad o grosor de hojas. Dichas diferencias repercutieron en los parámetros fisiológicos: la Tasa de Asimilación Neta (NAR), la Producción Cuántica Máxima del Fotosistema II (F_v/F_m) y el Índice de Desempeño (PL_{ABS}). Donde, las plantas de Nacozari tuvieron una respuesta más eficiente en la fotosíntesis.

Las plantas de ambos sitios mostraron un aumento en la concentración de Cu en el tejido de hojas y raíces como consecuencia del incremento del Cu en el medio; también, mostraron una mayor acumulación de este metal en las raíces. Las plantas de Nacozari tuvieron una mayor concentración de Cu en la raíz en comparación a las plantas de Hermosillo.

Estos resultados sugieren que la tolerancia de *B. sarothroides* al Cu no depende del sitio de origen de las plantas, sino a características constitutivas que le permiten a esta especie tolerar altas concentraciones de Cu, dentro y fuera de los tejidos, sin causarles efectos adversos.

2. Marco Teórico

2.1 Contaminación del suelo por metales pesados

La degradación del suelo se define como el proceso que disminuye la capacidad actual y potencial del suelo para producir bienes y servicios (Bunning *et al.*, 2011) y puede originarse por acciones directas (a través de la agricultura, deforestación y ganadería) o por acciones indirectas (por actividades industriales y de transporte) (Eslava, 2009).

La contaminación, es un ejemplo de la degradación del suelo, y esta se define como el exceso de elementos químicos o compuestos de cualquier tipo que repercute en su equilibrio biogeoquímico (Eslava, 2009). Su origen puede ser geológico o antropogénico. El primero se genera por las rocas madre, de la actividad volcánica o de la lixiviación durante los procesos de mineralización; y el segundo se genera por residuos peligrosos derivados de actividades industriales, agrícolas, mineras y de otros residuos sólidos urbanos (Galán & Romero, 2008).

Las actividades industriales, como la minería, son de las principales fuentes de contaminación para los suelos al producir desechos inorgánicos que tienen un gran impacto en los ecosistemas involucrados. La explotación y extracción de metales por la industria minera produce anualmente millones de toneladas de residuos, en su mayoría piritita y otros sulfuros, cuya oxidación libera grandes cantidades de metales pesados al ambiente, en particular a los suelos y las aguas superficiales cercanas a las zonas de explotación, donde se depositan los residuos que no tienen valor en la minería. En estos suelos las capas superiores presentan elevadas concentraciones de Cu, Ni, As, Se, Cd, Fe, entre otros, dependiendo del tipo de minerales explotados (Galán & Romero, 2008).

La contaminación por metales pesados es un tipo de degradación química y física del suelo que se da por la explotación de los minerales del subsuelo, generando la pérdida de los servicios ecosistémicos. Las consecuencias engloban: la pérdida de la estructura y composición del suelo (evitando su formación natural); la pérdida de la vegetación y disminución de la biodiversidad; contaminación del aire, aguas superficiales y subterráneas; y toxicidad en los humanos por contener grandes cantidades de compuestos inestables (SEMARNAT, 2000; Wong, 2003).

Los metales pesados son aquellos elementos con un peso atómico mayor al del hierro (55.845 g mol⁻¹) (Galán & Romero, 2008) y una densidad mayor a los 4 g cm⁻³ (Lavoiser, 2006). Estos se presentan en concentraciones relativamente bajas en la corteza de la Tierra, suelos y plantas. Algunos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos, sin embargo, después de ciertos umbrales de concentración máxima pueden llegar a ser tóxicos. Existen cerca de 53 tipos y de este grupo alrededor de 17 son necesarios para la vida (Tabla 1) (Galán & Romero, 2008).

Tabla 1. Micronutrientes y Macronutrientes necesarios para el óptimo funcionamiento de los organismos (Siegel, 2002).

Tipo de Metal	Símbolo químico
Metales pesados que son micronutrientes esenciales	As, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, V, Zn
Otros micronutrientes esenciales	F, I, Si
Macronutrientes	Ca, Cl, Mg, P, K, Na, S
Metales pesados no esenciales	Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, Ti

Los metales pesados no esenciales son muy tóxicos incluso en concentraciones micromolares, ya que éstos poseen una alta persistencia en el ambiente con una baja degradación química y/o biológica en formas más simples en el suelo, agua o aire (Cheng, 2003; Eslava, 2009). Incluso pueden llegar a actuar como competidores de otros elementos que induzcan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo efectos mutagénicos y cancerígenos (Alloway, 1995; Vatamaniuk *et al.*, 2002; Eslava, 2009).

En el caso de los metales esenciales, cuando se encuentran por encima de las concentraciones óptimas en el ambiente también son tóxicos (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones geoquímicas de algunos metales pesados que se encuentran normalmente en el suelo, o por encima del umbral de tolerancia de plantas, animales y seres humanos (Bowie & Thornton, 1985).

Elemento	Rango Normal (ppm)	Concentraciones por encima del umbral de tolerancia (ppm)
As	5-40	Hasta 2,500
Cd	1-2	Hasta 30
Cu	60	Hasta 2,000
Mo	1-5	10-100
Ni	2-100	Hasta 8,000
Pb	10-150	10,000 o más
Se	1-2	Hasta 500
Zn	25-200	10,000 o más

En sitios ricos en metales pesados por contaminación antropogénica, el movimiento de éstos es muy bajo ya que se comienzan a acumular en los primeros centímetros del suelo, generando lixiviados hacia los horizontes inferiores en muy pequeñas cantidades, donde la concentración decrece drásticamente con la profundidad. Esto sucede porque la disponibilidad de un elemento depende también de las características del suelo en donde se encuentra asociado. Estos parámetros geo-edáficos llegan a ser esenciales para valorar la sensibilidad de los suelos a la agresión de los contaminantes, tales como: pH, textura, mineralogía de arcillas, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, condiciones redox, presencia de carbonatos, óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, y por la salinidad (Galán & Romero, 2008).

2.1.1 La industria minera en México: sistemas áridos y semiáridos

La minería es una de las actividades económicas más extensas en México y se le ha considerado como una parte fundamental en el desarrollo del país al ser el insumo de prácticamente todas las industrias, entre las que destacan las de construcción, metalúrgica, siderúrgica, química y la electrónica. También forma parte de la fabricación de artículos de uso cotidiano (SEDESOL, 1994).

Actualmente, México se encuentra entre los principales países productores de minerales como la plata (Ag), celestita (SrSO_4), bismuto (Bi), fluorita (CaF_2), arsénico (As), cadmio (Cd), grafito (C), zinc (Zn), plomo (Pb) y sal (NaCl). Pero también tiene áreas productoras de cobre (Cu), hierro (Fe), antimonio (Sb), tungsteno (W), boratos (BO_3^{3-}) y perlita (Fe_3C , $\text{Fe-}\alpha$) (Hurtado *et al.*, 2001). Las principales entidades productoras se centran en ambientes áridos y semiáridos al centro-norte del país en los estados de Chihuahua, Michoacán, Zacatecas, Durango, Sonora, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Sinaloa, Colima y Jalisco (SEMIP, 1994).

Los ambientes áridos y semiáridos, por sus características geológicas, geoquímicas y geofísicas propician la presencia de materiales de importancia económica como los hidrocarburos, los minerales preciosos y de construcción, así como los metales ya mencionados (Gratzfeld, 2004).

En México, las actividades extractivas de los metales por las industrias, generan depósitos de desechos en forma de montículos conocidos como jales (Figura 1). Los depósitos o residuos tóxicos, en ambientes áridos y semiáridos, tienen efectos negativos en todos los organismos (tanto dentro de los jales, como en los alrededores) debido a la facilidad de movilización de los contaminantes por el viento y/o por el drenaje ácido. En los ambientes áridos, existe una evaporación mayor a la precipitación anual durante la misma época, propiciando la formación de lixiviados de sulfuros disueltos con elementos como el Fe, Cu y Zn. Estos elementos son reclutados por escorrentía superficial en arroyos y sedimentos superficiales, donde se encuentran sometidos a una constante erosión eólica. Además, en estos ambientes, se presenta una alta disponibilidad de los elementos catiónicos para los organismos debido a la acidificación del suelo (Romero *et al.*, 2008).



Figura 1. Depósito de residuos (Jales) localizado dentro de la zona urbana de Nacoziari de García, Sonora, México.

En el estado de Sonora, por ejemplo, de clima que va de árido a semi-árido, se encuentran regiones que son o fueron productoras de Cu. Entre los municipios con mineras activas e inactivas hallamos a Nacoziari de García. Dentro de sus depósitos de residuos (Jales) (Figura 1) existen elementos como sulfatos ($3.5-173 \text{ mg L}^{-1}$), Fe ($0.2-203 \text{ mg L}^{-1}$), Cu ($1.2-173 \text{ mg L}^{-1}$) y Zn ($0.2-25.6 \text{ mg L}^{-1}$) que resultan altamente disponibles para algunas plantas y animales al concentrarse en las capas superficiales. Este sistema, propicia la formación de soluciones ácidas en épocas de lluvias, formando lixiviados ácidos con estos elementos. En el municipio de Nacoziari de García, el régimen de evaporación es hasta siete veces mayor que el de las precipitaciones, lo que indica que la escorrentía superficial que se forma en épocas de lluvia podría ser más importante que la infiltración; por tanto, el mayor riesgo ambiental que representan estos jales es la dispersión del lixiviado ácido hacia los arroyos de la zona, con la subsecuente afectación de aguas superficiales y sedimentos (Romero *et al.*, 2008).

Aunado a este complejo sistema geoquímico, los ambientes áridos y semiáridos son altamente vulnerables a las perturbaciones ya que poseen una gran diversidad de especies vegetales, en su mayoría nativas, que proporcionan estabilidad al suelo además de ser partícipes en una gran cantidad de relaciones intraespecíficas e interespecíficas (Sánchez *et al.*, 2007).

2.1.1.1 Industria cuprífera

En México prehispánico la explotación del cobre tenía como centro de producción el territorio del Imperio purépecha, actualmente Santa Clara del Cobre Michoacán, quienes fabricaban gran variedad de bienes, en su mayoría no utilitarios (Maldonado, 2006). Después de la conquista por los españoles en 1522, se inaugura la primera minera de la industria cuprífera en Latinoamérica ubicada en Taxco Guerrero, México.

En la actualidad la producción minera de este metal se concentra en los estados de Sonora (75.5%), Zacatecas (11.3%), San Luis Potosí (5.3%) y Chihuahua (3%) con 29,395, 4,391, 2,082 y 1,168 toneladas, respectivamente. El 4.9% restante se encuentra en los estados de Durango, Guerrero, Estado de México, Michoacán de Ocampo, Querétaro, Sinaloa y otras entidades (INEGI, 2013).

Hoy día se han incorporado nuevos procedimientos extractivos para la industria cuprífera de forma más eficiente, esto ha permitido un incremento en la demanda de consumo en productos como son: los cables eléctricos (61%); la fabricación de tubos, perfiles y láminas (30%); y la fabricación de monedas (6%) (Cortinas, 1994). México se encuentra en el décimo segundo lugar en la producción mundial del cobre, siendo este metal el sexto en la producción minera del país (primero se encuentra Zinc, Azufre, Oro, Plomo y Plata) (INEGI, 2013).

No obstante, el incremento en su demanda ha ido a la par al incremento negativo en el impacto ambiental. En particular, los procesos de molienda, refinación y fundición, generan contaminantes que son descargados sobre aguas superficiales o subterráneas, como: descargas de ácidos, de metales, de cianuro de sodio, de materiales reactivos, de aceites lubricantes usados y, en general, de sólidos suspendidos. Incluso, se emiten al aire partículas de polvo de naturaleza similar a las que se descargan al agua. En último lugar los procesos de combustión también contribuyen a la contaminación del aire con la emisión de monóxidos y dióxidos de carbono, y óxido de nitrógeno (Cortinas, 1994; Romero *et al.*, 2008).

Como consecuencia del impacto ambiental por minería se han realizado estudios donde se intenta neutralizar a los contaminantes, éstos estudios han descrito que algunas plantas pueden llegar a crecer en condiciones estresantes como los jales; esto gracias a mecanismos de tolerancia

que le permita seguir creciendo y completar su ciclo de vida, a pesar de la deficiencia y toxicidad de algunos elementos químicos (Galán & Romero, 2008).

2.2 Metales pesados en plantas

El estrés en plantas se define como todo factor ambiental que diste del estado fisiológico óptimo en el que una planta puede seguir creciendo y reproduciéndose, es decir, un factor externo que genera una respuesta en la planta de acuerdo a la intensidad y duración del estrés (Larcher, 2003). Por ejemplo, en el estrés por metales pesados existen plantas que no pueden sobrevivir y plantas que sobreviven sacrificando ciertos recursos. Sin embargo, existen otras plantas que pueden llegar a tolerar dicho estrés, a estas plantas se les conoce como plantas metalofitas, metalofitas facultativas o pseudo-metalofitas (Baker *et al.* 2010).

La clasificación de las plantas metalofitas está determinada por la presencia del metal y por los mecanismos biológicos para tolerar dichas condiciones; las metalofitas facultativas pueden estar en suelos con o sin metales pesados, pero la distribución de algunos ecotipos con amplia tolerancia a un metal depende de la presencia del mismo; mientras que las pseudo-metalofitas son plantas moderadamente tolerantes que no dependen de la presencia del metal (Baker *et al.* 2010).

El estrés y la tolerancia a los metales pesados dependen del tipo de metal, de las condiciones presentes en los suelos contaminados y de su biodisponibilidad. Este último factor a su vez depende de las características del suelo como el pH, el contenido de arcillas, el contenido de materia orgánica, el potencial redox y el estatus nutricional (Ross, 1994). Así mismo, las cantidades de metales disponibles están reguladas por el intercambio iónico, intercambio catiónico y las quelaciones de la materia orgánica, procesos principales que facilitan la disponibilidad de los metales (Seoáñez, 1999).

Los metales pesados han generado una fuerte presión de selección en la vegetación que crece en los sitios contaminados; la respuesta de las plantas incluye desde cambios de compensación fenotípica (aclimatación), o cambios en su morfología, anatomía y fisiología, que resultan de la selección genotípica durante su proceso evolutivo (adaptación). Este rendimiento de las plantas ante el aumento en la accesibilidad de un elemento químico en el ambiente y su interacción con el

resto de nutrientes, le permiten a las plantas sobrevivir bajo condiciones, consideradas estresantes para otras plantas y otros organismos (Figura 2) (Macnair *et al.*, 2000).

Se pueden distinguir dos mecanismos de respuesta al estrés nutricional: los procesos de adaptación a corto plazo que implican cambios en la expresión génica de los componentes de la homeostasis y detoxificación del metal; y los cambios a largo plazo que suponen modificaciones epigénéticas del ADN dirigidas a la supervivencia de la progenie en condiciones adversas (Andrés, 2008).

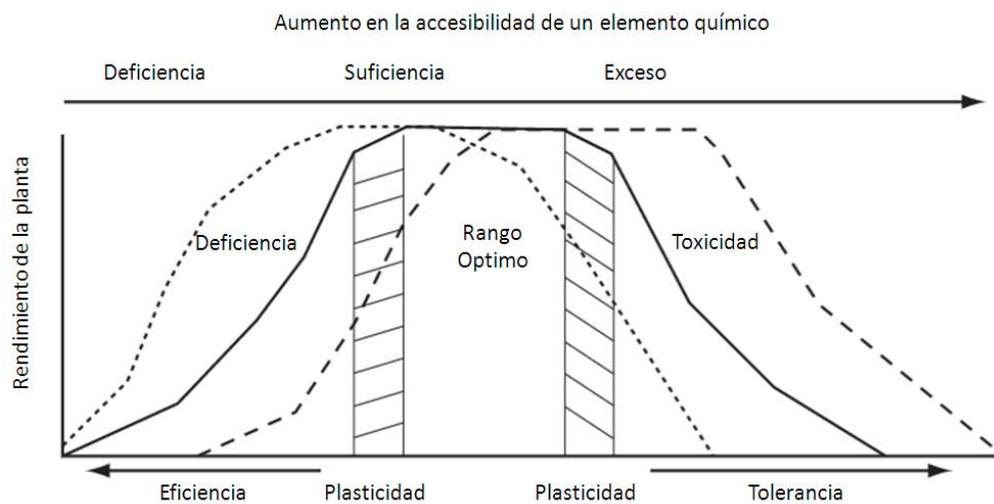


Figura 2. Rendimiento de las plantas ante el aumento en la accesibilidad de un elemento químico en el ambiente y su interacción con el resto de nutrientes. El área sombreada representa la plasticidad fenotípica de los individuos. La línea punteada es el rendimiento de las plantas después de un proceso de selección en la población, que se traduce en un aumento en el rendimiento de la planta. La línea discontinua muestra el cambio a un mejor desempeño después de un proceso evolutivo de la tolerancia en las plantas dado el aumento de los niveles de los elementos químicos (Modificada de Ernst, 2006).

2.2.1 Tolerancia de las plantas a los metales pesados

La tolerancia a altas concentraciones de metales en plantas que pueden crecer en suelos contaminados se da gracias a una serie de mecanismos a nivel celular que están implicados en la desintoxicación del metal (Hall, 2002; Wei *et al.*, 2008).

Los mecanismos de tolerancia son aquellos procesos que permiten la supervivencia de una planta a pesar de las condiciones de estrés a la cual está sometida, funcionando de manera

óptima. Es decir, cuando existe un factor de estrés, ciertas plantas generan una respuesta de tolerancia y/o aclimatación (Yruela, 2005).

Estos mecanismos de tolerancia están implicados principalmente en evitar la acumulación de concentraciones tóxicas en los sitios sensibles dentro de la célula, evitando así los efectos nocivos (Yruela, 2005).

Los posibles mecanismos involucrados en la tolerancia a los metales consisten en (Hall, 2002; Wei *et al.*, 2008):

- i) A nivel externo,
 - a. La asociación micorrízica.
 - b. La exudación de ácidos orgánicos y otros compuestos.
- ii) A nivel interno,
 - a. Los exudados radicales.
 - b. El secuestro de los metales por componentes de la pared celular.
 - c. La quelación de los metales en el citosol por diversos ligandos.
 - d. La compartimentación de los metales en la vacuola.

A nivel externo, la absorción de los metales puede estar influenciada por la presencia de microorganismos como las bacterias y los hongos asociados con la raíz (comunidad rizosferica). Los hongos micorrízicos (HM) forman asociaciones mutualistas con diversas plantas mediante dos tipos de estrategias: (1) Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) los cuales penetran el medio intracelular de las raíces, y (2) Hongos ecotomicorrízicos (HEM) que colonizan el medio extracelular de la raíz (Harrison, 2005). En el caso de los HEM, los mecanismos que presentan son: (1) movilidad del metal en el apoplasto del hongo, en donde es retenido por la red de Hartig evitando la entrada a la raíz; (2) reducción de la movilidad del metal en el apoplasto como resultado de la hidrofobicidad del hongo; (3) exudación de sustancias quelantes como ácidos orgánicos y otras sustancias producidas por el HEM; y (4) retención de los metales en el micelio externo del hongo (Adriaensen *et al.*, 2004). En el caso de HMA, los mecanismos son: a) inmovilización extracelular de los metales por la ácidos orgánicos (AO); b) reducción de la transferencia de iones del sistema radical al tallo, por precipitación intracelular del metal por PO_4^{4-} ; c) adsorción de los iones metálicos en la pared celular de diferentes estructuras del hongo (hifa,

esporas, micelio extraradical) y la retención del metal en la micorizósfera por la producción de proteínas específicas (Tullio *et al.*, 2003; González-Mendoza & Zapata-Pérez, 2008).

A nivel externo e interno, los ácidos orgánicos excretados por las plantas, como el citrato, el oxalato y el malato, pueden facilitar la absorción de metales, pero estas moléculas también pueden inhibir la adquisición del metal por las plantas mediante la formación de un complejo químico. Por ejemplo, en la toxicidad por aluminio algunas plantas llegan a formar complejos en la interfase suelo-raíz para evitar la toxicidad (Martínez, 2013). Con respecto al Cu, se ha observado que el metal funciona como inductor de la exudación de ácidos orgánicos por las raíces para la formación de complejos (Yang *et al.*, 2005; Kinraide *et al.* 2005).

También, a nivel interno el secuestro de los metales en el apoplasto ocurre a través de componentes celulares de las plantas, entre los más importantes encontramos a la lignina y la celulosa (Carrier *et al.*, 2003). Su principal papel en la tolerancia a los metales se da por la formación de complejos ligando-metal, reduciendo la translocación del metal (Thurman, 1981). Ederli *et al.* (2004) y Wójcik & Tukiendorf (2005) reportan que el secuestro de metales como Zn, Cu y Cd, en la pared celular de la raíz de *Phragmites australis* y *Zea mays*, está relacionado con una mayor lignificación de las células radicales. Los autores atribuyen esto al incremento de la actividad de la peroxidasa que estimula la biosíntesis de lignina en respuesta al estrés causado por estos metales.

La “quelación” se puede definir como la capacidad de una molécula para formar un complejo con un metal y así formar un nuevo compuesto con propiedades químicas diferentes al original. Es un proceso homeostático en el que participan: a) moléculas transportadoras, encargadas de transferir iones específicos de metales a organelos particulares como las vacuolas, cloroplastos y mitocondrias que los requieran; y b) los ligandos de alta afinidad como las fitoquelatinas, metalotioneinas, ácidos orgánicos, proteínas de choque térmico y aminoácidos, los cuales contribuyen en la desintoxicación manteniendo estable la concentración de iones de metales en el citosol (Hall, 2002; Clemens, 2001).

Una vez dentro de las células de la raíz, los metales pesados son translocados a su destino final por transportadores de membrana y proteínas. Este proceso involucra proteínas específicas que mantienen un equilibrio entre los niveles esenciales del metal para las funciones metabólicas, y al

mismo tiempo, para evitar la deficiencia o toxicidad. En las células, el exceso de metales es almacenado de forma tal que se eviten efectos nocivos en los procesos celulares. Esto implica el almacenamiento en compartimentos celulares especiales, tales como la vacuola (Figura 3). Y en algunos casos implica el secuestro de iones vía apoplasto, o en células especializadas como las células de la epidermis y en los tricomas (Yruela, 2005).

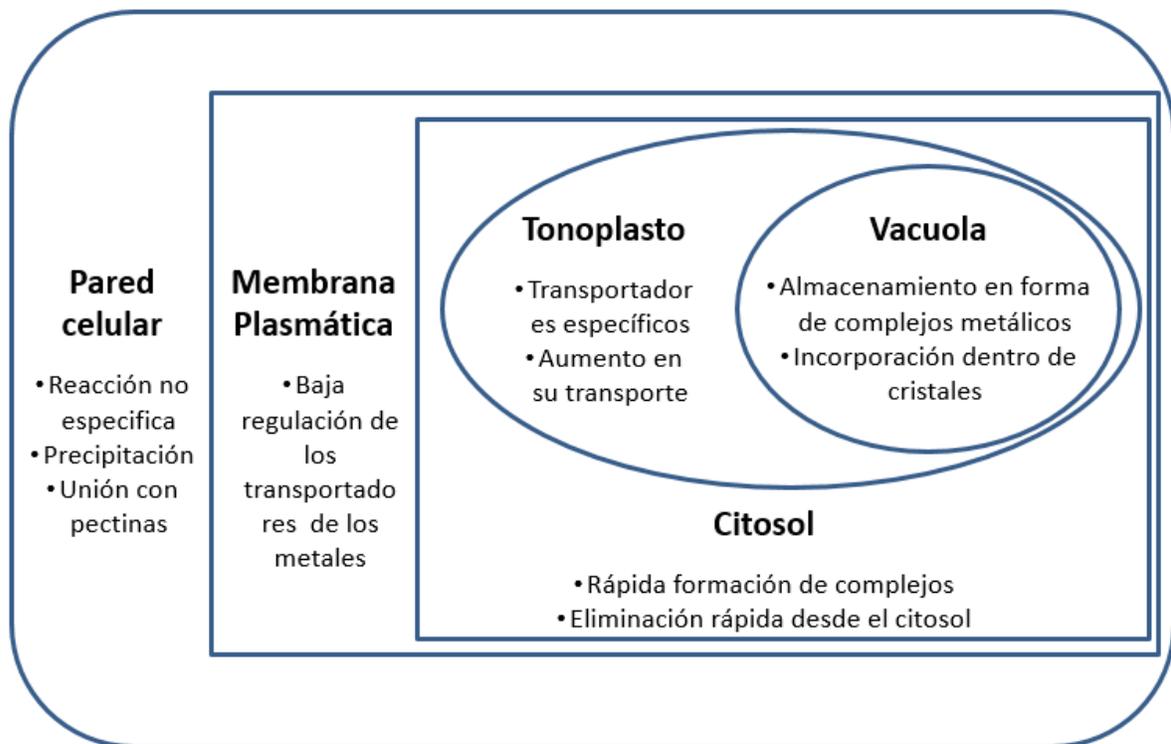


Figura 3. Procesos celulares que pueden ocurrir en los diferentes compartimentos en las plantas tolerantes a los metales pesados (Modificada de Wilfried, 2006).

Otro mecanismo de tolerancia involucra directamente la presencia de enzimas que se activan con altas concentraciones de Cu. Entre estas enzimas se encuentran la peróxido dismutasa (POD) y la superóxidodismutasa (SOD). En algunas especies de plantas, se ha registrado una actividad diferencial de estas enzimas, tanto en plantas nativas de sitios contaminados como en plantas provenientes de sitios no contaminados, debido probablemente a la plasticidad génica que le es suficiente para sobrevivir en tales condiciones (Liu *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 2009).

2.3 Consideraciones generales del Cobre

2.3.1 Propiedades químicas

El cobre (Cu) es un metal de transición con un número atómico de 29. Se presenta principalmente en estados de oxidación Cu^{2+} y Cu^+ . Es un metal que puede encontrarse en el ambiente en forma de sulfuros minerales y en minerales oxidados, pero también, se puede encontrar en forma de catión libre como consecuencia de actividades extractivas (Andrés, 2008).

Para las plantas el Cu es un elemento esencial que a pequeñas cantidades forma complejos altamente estables y de fácil transferencia de electrones, pero, en altas concentraciones genera toxicidad, especialmente en suelos con un pH ácido. El Cu además participa como cofactor enzimático y en el flujo de electrones en los procesos fotosintéticos y de respiración celular (Yruea, 2009).

Debido a la dualidad del Cu como elemento, los mecanismos celulares para asegurar el abastecimiento y evitar la toxicidad se dan de manera simultánea en los seres vivos (Andrés, 2008).

2.3.2 Fuente natural y antropogénica

El Cu como elemento de origen natural está presente en diversas formas y concentraciones. En la corteza terrestre, océanos, lagos y ríos, se encuentra como oligoelemento en minúsculas cantidades, o en grandes cantidades en yacimientos. Su disponibilidad está regulada por factores como la acidez en el medio y la solubilidad. Para la vida se considera un micronutriente para el cual se disponen de mecanismos de regulación (Torres, 2005).

En el mar la concentración de Cu es alrededor de 2.5×10^{-4} mg/L y su concentración es notablemente más baja a medida que aumenta la distancia a las costas. En aguas continentales, el metal puede alcanzar fácilmente valores que superan los 2×10^{-2} mg/L. Anualmente, se estima que el depósito total de Cu en el ambiente acuático es aproximadamente cuatro veces superior al que produce el hombre (Torres, 2005; Araya *et al.*, 2008).

En la corteza terrestre, la concentración media aproximada es de 60 mg/kg (Campbell *et al.*, 2011). Los óxidos, los sulfuros y otros minerales de Cu son parte de los componentes de las rocas que forman la corteza terrestre y han dado lugar a los suelos y a los sedimentos a través de procesos geológicos. Por otra parte, las actividades volcánicas promueven que el Cu llegue a la atmósfera en forma de materiales en polvo y en partículas que después se depositan en el suelo y en las aguas superficiales (Araya *et al.*, 2008).

La contaminación por Cu puede originarse por la minería y metalurgia, pero también, por la refinación de petróleo, fertilizantes, por la descarga de afluentes de industrias de producción de cloro-alcalinos, galvanoplastia, pinturas, colorantes, pesticidas y fertilizantes (Goswami & Talukdar, 2013).

2.3.3 Nutriente esencial para la vida

El Cu es una parte integral de la maquinaria de la vida y se encuentra muy bien definido por su carácter oxidativo. Posee una elevada capacidad para formar complejos en coordinación con moléculas orgánicas en el entorno celular de cualquier ser vivo, a través de sus estados de oxidación (Cu^{2+} y Cu^+). Esta unión con las proteínas, lo involucran directamente en reacciones de transferencia de electrones, en la respiración y fotosíntesis, o en la detoxificación de radicales libres. El primer estado de oxidación lo encontramos unido al nitrógeno en cadenas de histidina, y el segundo interacciona con sulfuros de cisteína o metionina (Andrés, 2008).

El Cu es un micronutriente esencial que se requiere en cantidades pequeñas (microgramos). En la salud humana se necesita para múltiples funciones, como: en la eficiencia de los mecanismos de defensa, para la fijación del calcio en los huesos, para la concentración y para el transporte del hierro (Fe) en sangre, y para un buen desarrollo del cerebro. En el humano el Cu es absorbido por el tracto digestivo y distribuido por la sangre a órganos claves (hígado, riñones, cerebro, placenta) y tejidos en general. El exceso del metal sale del cuerpo a través de secreciones biliares que llevan al Cu de vuelta al intestino delgado (Torres, 2005).

En las células, el Cu participa en la respiración como cofactor y como elemento accesorio al ser donante o receptor de electrones para las funciones de ciertas proteínas debido a esta alta

reactividad química. Este proceso ayuda a neutralizar los radicales libres cuando se unen con ciertas enzimas (Torres, 2005).

A lo largo de la evolución, las células vegetales han desarrollado mecanismos que les permiten captar el Cu necesario para sus funciones básicas, así como para controlar su potencial oxidativo gracias a proteínas de Cu (llamadas también cuproproteínas). La captación la realizan mediante transportadores ubicadas en la membrana plasmática que incorporan al Cu desde el medio externo al medio intracelular. La protección la realizan manteniendo al ión cobre ligado a algunas proteínas “quelantes” como ciertas chaperonas o metalotioneinas (Figura 3).

En este sentido se conocen diversas cuproproteínas con diferentes tipos de centros de Cu y sus funciones biológicas, entre los que destacan para las especies vegetales (Andrés, 2008):

- (1) Plastocianinas. Proteína implicada en el transporte de electrones en las cadenas fotosintéticas.
- (2) Plantacianina. Proteína que participa en la orientación del tubo polínico en el estigma.
- (3) Oxidasas. Enzimas que catalizan la oxidación de moléculas pequeñas en la reducción del oxígeno molecular o del anión nitrito o el radical superóxido.
- (4) Superóxido dismutasa (SOD). Enzima que posee tres isoformas localizadas en el citosol, cloroplasto y la mitocondria.
- (5) Receptor de etileno. Proteína que usa al cobre como unión reversible de etileno.
- (6) Cofactor del molibdeno. Centro catalítico que participa en la biosíntesis de fitohormonas y catabolismo de purinas.

En plantas superiores, una cuproproteína cuya función no puede ser realizada por ninguna otra proteína en la planta, es la plastocianina. Sin embargo, otras cuproproteínas pueden ser eliminadas o sustituidas por proteínas con función equivalente pero que poseen otro metal como cofactor en su centro activo, como es el caso de la Cu/ZnSOD que puede ser sustituida por la FeSOD (Andrés, 2008).

2.3.4 Elemento tóxico para la salud humana

En la mayoría de los casos la toxicidad por Cu se da por la ingesta en alimentos o en líquidos contaminados. Esta toxicidad produce en el organismo náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal; y cuando la ingestión es en grandes cantidades puede causar fallas de múltiples órganos y sistemas, shock y muerte. En 2002, la OMS definió que 2 mg/L es el nivel al cual no se observan efectos agudos, esto es efectos gastrointestinales reversibles (Torres, 2005). Entre otros síntomas se puede tener dolor de cabeza, taquicardia, dificultad para respirar, anemia hemolítica, hematuria, y sangrado gastrointestinal. En el caso particular con la exposición cutánea al Cu no se presenta como tal una toxicidad sistémica, pero se han reportado algunas respuestas alérgicas en personas sensibles (Ransom *et al.*, 2007).

2.4 Toxicidad y Tolerancia al Cobre en plantas

2.4.1 Absorción y transporte del Cobre en el tejido vascular

La adquisición del Cu a partir de los recursos minerales del suelo y su posterior distribución por toda la planta es el resultado de la contribución de diferentes procesos, entre ellos la biodisponibilidad y movilización del metal en el suelo (Brun *et al.*, 2001).

La biodisponibilidad de un elemento mineral como el Cu se define como la fracción de ese elemento en el suelo que puede ser absorbida por una determinada especie de planta. En el suelo, el Cu se encuentra secuestrado por ligandos orgánicos, por lo que el metal resulta ser de difícil acceso, para ello las plantas poseen una serie de estrategias que permiten movilizar el micronutriente, tal como se menciona a continuación (Brun *et al.*, 2001).

El movimiento de los iones a lo largo de la planta está impulsado por el gradiente de potencial hídrico que existe entre la rizósfera y la atmósfera. Esto ocurre a través de dos vías acuosas paralelas entre los haces conductores (por el apoplasto o el simplasto) y el citoplasma de las células (Figura 4) (Marschner, 1995).

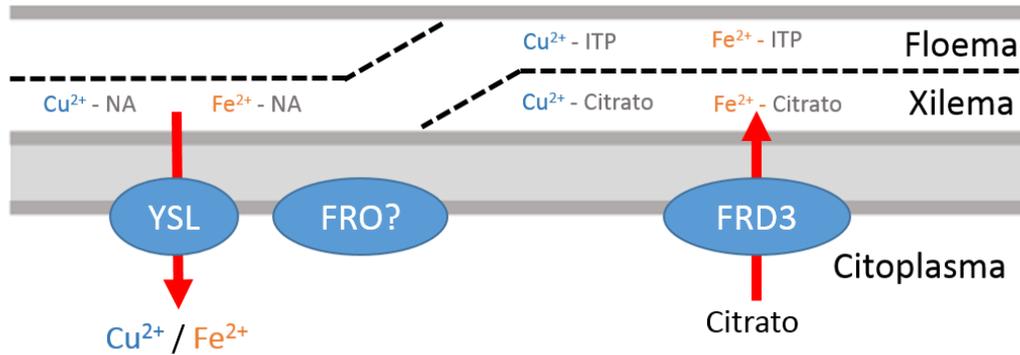


Figura 4. Esquema de los componentes de la homeostasis del Cu que participan en el transporte del metal entre los haces conductores y las células, en *Arabidopsis sp.* Las flechas indican el sentido del transporte de iones y compuestos. Los signos de interrogación indican componentes aún no confirmados. FRD, del inglés *ferric reductase defective*; FRO, del inglés *ferric reductase oxidase*; ITP, del inglés *iron transport protein*; NA, *nicotianamina*; YSL, del inglés *yellow stripe-like* (tomado de Andrés, 2008).

Cuando el transporte de los nutrientes se da por la vía del simplasto, los iones pueden quedar secuestrados dentro de las células de la raíz, o seguir por la misma vía hasta alcanzar a los haces xilemáticos para llegar a toda la planta. La distribución de los iones entre ambos destinos depende del tipo de ligando químico al que se unen (Salt *et al.*, 1998).

El transporte de los metales por el xilema está dado por ligandos de ácidos orgánicos (especialmente citrato y malato) (Haydon & Cobbett, 2007). En el xilema, los grupos carboxílicos de la pared actúan como intercambiadores catiónicos de baja afinidad y selectividad que restringe el libre movimiento de solutos cargados positivamente, excluyendo los aniones. Por este motivo, los complejos metálicos aniónicos son transportados de manera más eficiente (Senden *et al.*, 1990).

La descarga del xilema en las partes aéreas supone el primer paso para controlar la distribución de metales. Canales iónicos aún no identificados podrían facilitar el transporte de cationes metálicos desde el xilema hacia el simplasto (Karley *et al.*, 2000).

Una vez movilizado el Cu, este debe ser absorbido a través de la raíz. El perfil de absorción a lo largo del eje longitudinal varía según el tipo de ión, el estado nutricional de la planta y la especie vegetal considerada. La tendencia general en dicotiledóneas y plantas perennes es que el ritmo de entrada de iones por unidad de longitud disminuye a medida que aumenta la distancia al

ápice de la raíz. En el caso del Cu, se ha visto que la entrada es uniforme a lo largo de la raíz (Marschner, 1995).

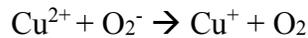
2.4.2 Absorción del Cobre a nivel celular

La entrada del Cu al citosol ocurre gracias a una familia específica de proteínas transportadoras de Cu (COPT) (Figura 5) (Sancenón *et al.*, 2003). Estos transportadores COPT provienen de una familia de genes conservada de transportadores de Cu (*CRT*) caracterizados por 3 dominios transmembranales y un elevado contenido de metionina (Sunil, 2011).

Este metal de transición cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) como el hidroxilo (OH^\cdot), anión peróxido (O_2^{2-}), el superóxido (O_2^-) y el peróxido (H_2O_2), que causan la degradación de membranas, el rompimiento de los ácidos nucleicos y la desnaturalización de proteínas. Por lo tanto, un exceso de Cu puede causar estrés oxidativo en las plantas y, posteriormente, aumentar la respuesta antioxidante debido al aumento de la producción elevada de radicales libres de oxígeno. Los ROS se generan por reducción incompleta del dióxigeno durante la respiración celular y su producción se intensifica con temperaturas extremas, radiación de elevada intensidad, sequía o contaminantes atmosféricos. El Cu^+ contribuye a generar radicales hidroxilo por catálisis de la reacción de Fenton (Andrés 2008):



Y el Cu^{2+} se reduce en presencia del radical superóxido:



El balance neto, conocido como reacción de Heber-Weiss, es:



La citotoxicidad de los radicales hidroxilo se debe a su reacción inmediata con las moléculas del entorno, mientras que el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno lo hacen más lentamente, hecho que posibilita su difusión lejos del lugar donde se originan. Su encuentro con

dianas específicas como el ADN, las proteínas o los lípidos, es el responsable del daño celular a estas macromoléculas causado por el ataque oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1989).

En consecuencia, se ha observado que el exceso de Cu deriva en cambios en la actividad de ciertas enzimas y componentes de las vías antioxidantes, como la ascorbato peroxidasas (APX), la glutatión reductasa (GR), la superóxido dismutasa (SOD) y la guicol peroxidasa (Wang *et al.*, 2004; Andrés 2008).

La enzima SOD (Superóxido dismutasa) es un componente importante de la maquinaria de defensa antioxidante. El incremento de su actividad es un factor muy importante en la tolerancia al Cu (González-Mendoza & Zapata-Pérez, 2008).

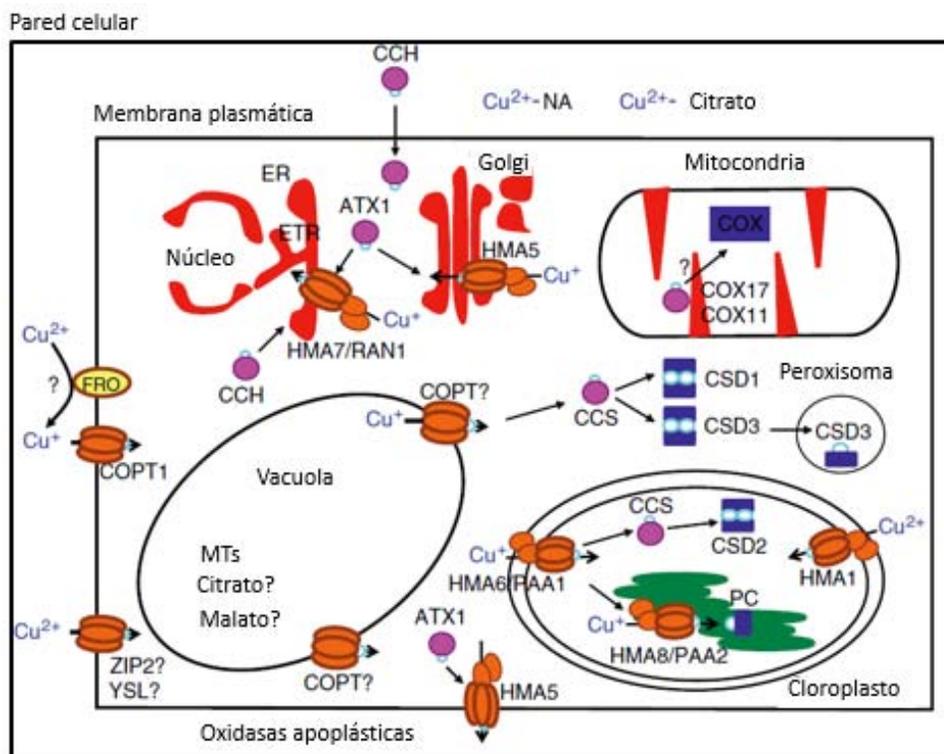


Figura 5. Esquema del transporte celular identificado para el Cu en las células de las plantas. Las flechas indican la dirección propuesta para el transporte de los metales. CCH, copper chaperone; ATX1, antioxidante 1; CCS, copper chaperone para Cu/Zn superoxide dismutase; CSD1, cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase; CSD2, chloroplatic Cu/Zn superoxide dismutase; CSD3, peroxisomal Cu/Zn superoxide dismutase; COPT, copper transporter; COX, cytochrome-c oxidase; ER, endoplasmic reticulum; FRO, ferric reductase oxidase; HMA, heavy metal P-type ATPase; MT, metallothioneins; NA, nicotianamine; PAA, P-type ATPase en *Arabidopisis*; Pc, plastocyanin; RAN1, responsive-to-antagonist 1; SOD, superoxide dismutase; YSL, yellow stripe-like protein; ZIP, IRT-like protein. (tomado de Yruela, 2009).

Finalmente, el Cu puede interactuar con cadenas laterales de aminoácidos como histidina, cisteína y metionina. Esta interacción provoca el desplazamiento de otros iones metálicos esenciales de sus centros de coordinación y/o el plegamiento defectuoso de las respectivas metaloproteínas (Yang *et al.*, 2005). Sin embargo, en algunos casos, este desplazamiento de iones de los centros activos de las proteínas supone un mecanismo de regulación en respuesta a un exceso del metal.

2.4.3 Síntomas visibles de Estrés y Toxicidad

El contenido promedio de Cu en el tejido vegetal va de 4-30 partes por millón (ppm) del peso seco de una planta sana (ppm es igual a las unidades en peso de un elemento por millón de unidades del material de la planta en seco: es decir, 1 % = 10.000 ppm) (Raven *et al.*, 1992), por debajo de este rango se considera deficiencia y por encima se considera toxicidad para algunas plantas (Andrés, 2008). Su principal mecanismo de tolerancia es la acumulación en vacuolas o exclusión gracias a la presencia de ácidos orgánicos como el malato y el citrato (Marschner, 1995).

La toxicidad por Cu está relacionada con la unión de este metal a grupos sulfhídrico en la membrana plasmática (Yruela, 2005). Asimismo, tiene repercusiones directas en procesos celulares como la fotosíntesis y la respiración.

El síntoma más evidente de la toxicidad por Cu es la disminución en la asignación de biomasa, reduciendo considerablemente su tasa de crecimiento, y así, una menor producción y superficie de hojas.

El exceso de Cu en particular genera en principio una clorosis intervenal en las hojas principales (Jain *et al.*, 1990). En una exposición prolongada las hojas van presentando: manchas tenues de color blanco y tejido necrótico, tanto en las puntas como en los márgenes de las hojas. En casos de toxicidad aguda, las hojas movilizan sus recursos a tallo antes de llegar al estado necrótico conocido como marchitamiento. Incluso, en algunas especies, la toxicidad de Cu genera un follaje color púrpura (Choi *et al.*, 1996).

Otros efectos de la toxicidad por este metal se traducen en la disminución en la actividad de la enzima nitrato reductasa, enzima necesaria para la asimilación de nitratos (Llorens *et al.*, 2000). Asimismo, se ha observado que el Cu puede modificar la morfología de los cromosomas durante la división celular (Jiang *et al.*, 2000), y también se genera un estrés oxidativo que actúa directamente en la señalización de las auxinas (Pasternak *et al.*, 2005).

En los tejidos fotosintéticos, el Cu puede desencadenar el ataque oxidativo en la clorofila, lípidos y proteínas de la membrana tilacoidal afectando el transporte de electrones en los cloroplastos (Yruela *et al.*, 2000). Dicha modificación a la estructura del cloroplasto y en la composición de la membrana tilacoidal tiene consecuencias en la actividad fotosintética. La actividad del fotosistema II (PSII) y la tasa de transferencia de los electrones son las más afectadas por el daño causado por la toxicidad por Cu.

Igualmente, la toxicidad causa una deficiencia de hierro (Fe) ya que el Cu lo oxida hasta su forma férrica (insoluble para la planta) (Reichman, 2002).

En la raíz, la toxicidad por Cu es más evidente incluso antes de ver síntomas visibles en los órganos aéreos. Afecta directamente la elongación, engrosamiento y crecimiento de raíces laterales debido a que el Cu inhibe la división celular del ápice radicular, y también afecta a la organización del sistema radicular (Reichman, 2002).

A nivel de semilla, las concentraciones elevadas de Cu pueden provocar una disminución de la tasa de germinación debido a sus efectos en la membrana plasmática (Marschner, 1995); y que el Cu juega un papel muy importante en procesos celulares como la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, la oxidación y entrecruzamiento de grupos tiol de proteínas que pueden causar su inactivación (Yruela, 2005).

2.4.4 Plantas metalofitas

Las plantas que crecen en sitios contaminados por metales pesados poseen diferentes mecanismos de tolerancia que les permite sobrevivir. La raíz de estas plantas interviene directamente en los procesos químicos de la fracción móvil de los metales pesados en el suelo. Este volumen de suelo que rodea a la raíz (rizosfera) se ve afectado por la exudación de

sustancias orgánicas, liberación de CO₂, protones, hormonas, secreciones (ectoenzimáticas), mucilago (hidratos de carbono), mucigel (restos celulares) y lisados (compuestos fenólicos) de la raíz (Kidd *et al.*, 2009; Bentz, 2013).

Los suelos metalíferos naturales varían ampliamente en características químicas y físicas, así como en los tipos y concentraciones de los metales pesados; representan un suelo apto para especies vegetales tolerantes a los metales presentes (Baumbach, 2012; Reeves, 2006). Esta vegetación única puede dividirse en tres grandes grupos de acuerdo a Tlustos *et al.* (2006): excluidoras, indicadoras y acumuladoras.

- (1) Excluidoras, en su mayoría hierbas monocotiledóneas, lo hacen mediante la inhibición de la absorción o translocación de los metales a la planta y a los brotes. El transporte y concentración de los metales están restringidos dentro de la planta y se mantienen constantes, es decir, la relación del metal con respecto al peso seco de la planta es una relación de < 1 .
- (2) Indicadoras, generalmente contienen concentraciones de metales pesados que se correlacionan directamente con la concentración del metal en el sitio contaminado. Estas son en su mayoría cultivos agrícolas, como: el trigo, avena y maíz.
- (3) Acumuladoras, contienen las concentraciones más altas de los elementos traza en los tejidos de los brotes de las plantas en relación con las concentraciones de los metales disponibles (Cheng, 2003; Tlustos *et al.*, 2006). La parte aérea de la planta así como la raíz contienen una mayor concentración de los elementos, es decir, la relación del metal con respecto al peso seco de la planta es de > 1 . Peterson (1971) define a la acumulación de metales con base en dos criterios, donde: (i) una planta acumuladora de metales es aquella que posee en su tejido cantidades mayores del elemento que el propio medio en el que se encuentran creciendo; (ii) una planta acumuladora es aquella que posee grandes cantidades de un elemento sea cual sea la concentración del elemento en el medio. En este último encontramos a las plantas hiperacumuladoras, en su mayoría hierbas perennes o bianuales de corta duración, arbustivas o árboles pequeños, son especies comúnmente registradas en suelos mineros que pueden translocar y concentrar los metales en tallos y hojas en cantidades considerablemente mayores a las raíces y otros órganos de almacenamiento (Adriano, 2001).

Las concentraciones de los metales dentro del tejido de este grupo de plantas dependen de factores intrínsecos (genéticos) y factores extrínsecos (ambientales), varían en gran medida para las diferentes especies y en menor medida dentro de una misma especie para los diferentes metales (Baker *et al.*, 2010).

2.4.4.1 Plantas hiperacumuladoras

La hiperacumulación de los metales pesados y la tolerancia son generalmente un rasgo inherente. La hiperacumulación de metales pesados en plantas fue un concepto empleado por primera vez por Brooks *et al.* (1977), y se definió como una concentración no menor o igual a 1,000 g/g (no mayor a 0.01%) en tejido seco para las plantas, reportado para el níquel (Ni). Posteriormente, Brooks *et al.* (1980) identificó 15 especies de plantas hiperacumuladoras de cobalto (Co) y 12 especies hiperacumuladoras para el cobre (Cu).

En la actualidad se sabe que una de las características principales de las plantas hiperacumuladoras es concentrar los metales en cantidades que superan al 1% del peso seco de la planta sin ningún efecto adverso sobre su crecimiento (cantidades superiores a las 1000 ppm) (Soares dos Santos *et al.*, 2009; Andrés, 2008). Esto implica mecanismos de detoxificación y altos costos metabólicos que las convierte en plantas con alto endemismo en suelos ricos en metales, y en plantas poco competidoras con plantas no tolerantes bajo condiciones normales. A pesar de ello, las plantas hiperacumuladoras son capaces de convertirse en especies pioneras o dominantes en ambientes contaminados (Soares dos Santos *et al.*, 2009).

La concentración umbral del metal (con base en el peso seco) en las plantas hiperacumuladoras depende del metal pesado en cuestión, por ejemplo, Cd (> 100 mg/kg); Ni, Pb y Cu (> 1000 mg/kg), y Zn (> 10.000 mg/kg) (Baker & Walker, 1989; Baker *et al.*, 2000) y poco se sabe de los mecanismos de transporte de metales en estas plantas.

Debido a un sistema de detoxificación poco específico dentro de las plantas hiperacumuladoras, éstas llegan a acumular diversos metales al mismo tiempo (Reeves, 2006). Esta respuesta diferencial de las especies a ciertos metales varía notablemente. Se ha reportado que especies con la misma distribución geográfica han desarrollado un mecanismo de tolerancia contrastante hacia los mismos metales, por ejemplo, *Silene itálica* L. y *Alyssum bertolonii* Desv.,

ambas especies se encuentran en suelos de serpentina y son respectivamente, una excludora y una acumuladora de níquel (Gabbrielli *et al.*, 1990). Es importante señalar que los taxas reportados como plantas hiperacumuladoras para sitios contaminados son la minoría, y cada una, presentan un umbral de concentración de metales (Tabla 3). De hecho, el mecanismo más común taxonómicamente en plantas tolerantes a los metales pesados es la exclusión del metal (Baker *et al.*, 2000).

Tabla 3. Umbral de concentración de metales en plantas hiperacumuladoras por taxa y número de familias (Baker *et al.*, 2000).

Metal	Criterio (% de materia seca en hojas)	No. de Taxa	No. de Familias
Cadmio	>0.01	1	1
Cobalto	>0.1	28	11
Cobre	>0.1	37	15
Plomo	>0.1	14	6
Manganeso	>1.0	9	5
Níquel	>0.1	317	37
Zinc	>1.0	11	5

Los mecanismos de detoxificación de metales dentro de las plantas puede implicar la quelación de los metales por ligandos y/o el secuestro de los metales lejos de los sitios metabólicos en las células, en particular hacia la vacuola o en la pared celular. Otra adaptación incluye la activación de rutas metabólicas alternativas menos sensibles a los iones metálicos, la modificación de la estructura de las enzimas, o la alteración de la permeabilidad de la membrana por la reorganización o cambios en la composición estructural de la membrana (Ernst, 2006).

Vázquez *et al.* (1994) reportaron que en las vacuolas de células de la epidermis y subepidermis de los brotes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl, bajo tratamientos con diferentes concentraciones de zinc, se encontraba la mayor concentración del metal, por lo que proponen esto como un mecanismo más de las plantas hiperacumuladoras, el cual se da a través de la acumulación del metal a nivel tisular. Por otro lado, Baker & Walker (1989) presentan datos que

sugieren que los metales en las hojas de algunas plantas hiperacumuladoras pueden desempeñar un papel en la defensa contra insectos herbívoros.

2.5 Hiperacumulación de Cobre en la Familia Asteraceae

La hiperacumulación de los metales es una característica presente en alrededor de 500 especies de plantas, abarcando aproximadamente el 0.2% de todas las angiospermas, principalmente de familias como Brassicaceae y Fabaceae.

Las especies de plantas que hiperacumulan metales pesados corresponden a 101 familias diferentes, como son: Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunoniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Eupobiaceae.

Dentro de estas familias, la Asteraceae es el grupo más numeroso de las angiospermas y comprende 1,100 géneros con 25,000 especies. Además, muchas de estas plantas son tolerantes a varios metales o a un metal en particular, por ejemplo, las plantas que hiperacumulan o potencialmente acumulan el Cu y otros metales (Tabla 4).

Tabla 4. Angiospermas terrestres hiperacumuladoras o potencialmente hiperacumuladoras de Cobre.

Nombre científico	Bioacumulación*	Familia	Referencias
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	3,771 mg/kg	Brassicaceae	Ariyakanon & Winaipanich (2006)
<i>Brassica napus</i> L.	s/n	Brassicaceae	Marchiol <i>et al.</i> (2004)
<i>Brassica campestris</i> L.	s/n	Brassicaceae	Chandra <i>et al.</i> (2009)
<i>Raphanus sativus</i> L.	s/n	Brassicaceae	Marchiol <i>et al.</i> (2004)
<i>Helianthus annuus</i> L.	1070 µg/g	Asteraceae	Lin <i>et al.</i> (2003)
<i>Calendula officinalis</i> L.	s/n	Asteraceae	Moustakas <i>et al.</i> (2011)
<i>Tagetes erecta</i> L.	s/n	Asteraceae	Chintakovid <i>et al.</i> (2008)
<i>Ipomea alpina</i> Rendle	12,300 mg/kg	Asteraceae	Baker & Walker (1989)
<i>Bidens alba</i> (L.) DC. var. <i>radiata</i>	879 mg/kg	Asteraceae	Ariyakanon & Winaipanich (2006)
<i>Gutenbergia cupricola</i> Robyns	82-5095 µg/g	Asteraceae	Brooks <i>et al.</i> (1987)
<i>Vernonia petersii</i> Oliv. Et	625-1555 µg/g	Asteraceae	Brooks <i>et al.</i> (1987)

Nombre científico	Bioacumulación*	Familia	Referencias
Hiern			
<i>Millotia myosotidifolia</i> (Benth.) Steetz	2,400 µg/g	Asteraceae	Blissett (1966)
<i>Aeollanthus biformifolius</i> De Wild	13,700 µg/g	Lamiaceae	Brooks <i>et al.</i> (1978)
<i>Minuartia verna</i> (L.) Hiern.	1,070 µg/g	Caryophyllaceae	Ernst (1974)
<i>Ricinus communis</i> L.	s/n	Euphorbiaceae	Shi & Cai (2009)
<i>Sorghum sudanense</i> (Piper) Stapf	5,330 mg/kg	Poaceae	Wei <i>et al.</i> (2008)
<i>Pistia stratiotes</i> L.	s/n	Araceae	Odjegba & Fasidi (2004)

*s/n = sin número, concentración no reportada.

El género más reportado como hiperacumulador de varios metales, como el Zn, Ni, Cd, Pb y posiblemente el Cu, ha sido *Thlaspi* de la familia Brassicaceae (Baker *et al.* 2000). Por ejemplo, la especie *Thlaspi goesingense*, es una planta hiperacumuladora de Ni (hasta del 3% en peso seco de la planta) debido a proteínas de tolerancia a los metales (TgMTPs) ubicadas en el tonoplasto que transportan este metal a las vacuolas de las células de las hojas (Persans *et al.*, 2001).

2.5.1 Género *Baccharis*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Baccharis* L.

El género *Baccharis* L. o “Romerillo” es uno de los más grandes de la Tribu Astereae y se encuentra distribuido principalmente en Brasil, Argentina, Colombia, México y el Sur de Estados Unidos (Verdi *et al.*, 2005). La gran distribución de especies en Brasil y los Andes indica que esta área es su probable centro de origen, con 220 especies. Se estima que en México tan solo existen 28 especies de las más de aproximadamente 500 reportadas (Verdi *et al.*, 2005).

Se trata de un género principalmente arbustivo, perenne, que mide en promedio 0.5 a 4.0 metros (Figura 6). Tiene un alto valor socioeconómico debido a sus propiedades medicinales gracias a sus metabolitos secundarios (flavonoides, diterpenos y triterpenos) que se usan para tratar enfermedades del estómago, el hígado, anemia, inflamaciones, para la próstata, para la diabetes y también para remedios en los procesos de la desintoxicación del cuerpo. Sin embargo en varias especies se han reportado la presencia de flavonoides citotóxicos como en la especie *Baccharis coridifolia*, *B. gaudichaudiana*, *B. lejia*, *B. ochracea*, *B. pseudotenuifolia*, *B. sarothroides*, entre otras (Kupchan & Bauerschmidt, 1971; Verdi *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2007).

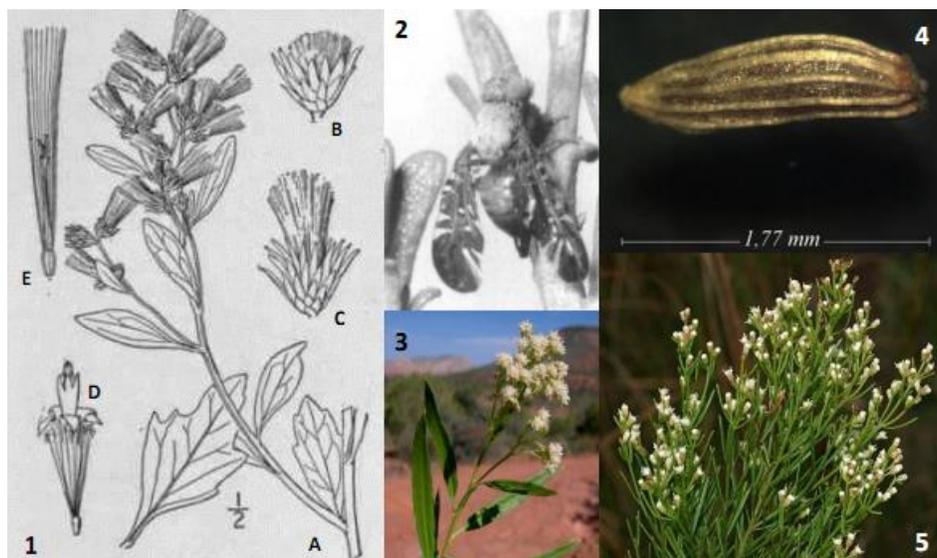


Figura 6. Algunas de las especies del Género *Baccharis*: (1) *B. halimifolia* L., (A) rama florífera. (B y C) capítulo pistilado. (D) flor estaminada. (E) flor pistilada (Britton & Brown, 1913); (2) *Aciurina thoracica* Curran, diptero adulto parásito de *B. sarothroides* (Goeden & Teerink, 1996); (3) *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (SEINet, 2009); (4) *B. linearis* (Ruiz & Pav.) Pers., semilla de 1.77 mm de longitud (Jardín Botánico Nacional Viña del Mar, 2010); y (5) *B. sarothroides* A. Gray (Pippen, 2006).

Sus hojas se encuentran dispuestas a través de las ramas de forma alterna. Sus flores son blancas. Su principal depredador son larvas de lepidópteros (Headrick & Goeden, 1993). Son plantas dioicas y su dispersión es por viento formando aquenios (Figuras 6 y 7). La producción de flor y fruto es anual. Tiene una elevada producción de semillas, aproximadamente 1 millón por individuo. Se ha observado que la sombra repercute negativamente en la producción de semillas (Karrfalt & Olson, 2008). Se considera una especie tolerante a la sal, también se han visto germinar y crecer bajo condiciones pobres de nutrientes en sustratos como arena y arcillas, así como en ambientes contaminados por minas de cobre (Haque *et al.*, 2008; Cuevas *et al.*, 2013).

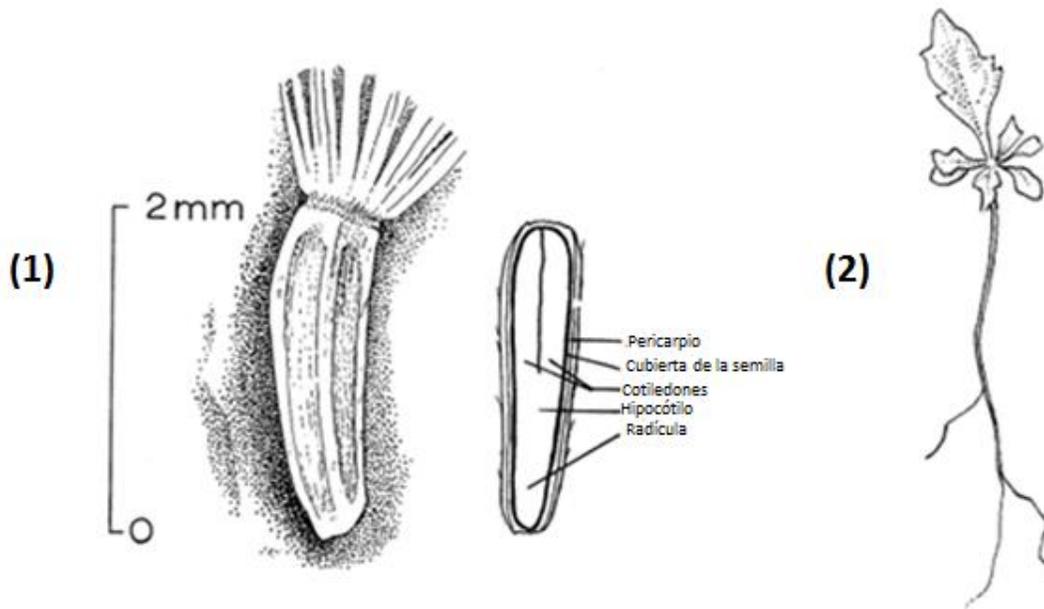


Figura 7. (1) *Baccharis viminea*, achenio con vilano y sección longitudinal de la semilla. (2) *Baccharis pilularis*, plántula de 60 días después de la germinación (Karrfalt & Olson, 2008).

2.5.1.1 *Baccharis sarothroides* A. Gray

Baccharis sarothroides A. Gray (escoba amarga o romerillo) es un arbusto dioico ampliamente distribuido entre los 304 y 1,676 metros sobre el nivel de mar desde Arizona, California, Baja California, Sonora, Chihuahua y Sinaloa; distribuida en biomas como el desierto, pastizal del desierto, chaparral, en ambientes ribereños y perturbados como carreteras. Sus hojas, son pequeñas, lineales, gruesas, sésiles, oblanceoladas, perennes y pueden medir 2 cm de longitud. Su tallo es de color verde y presenta muchas ramificaciones finas con muy pocas hojas. Generalmente alcanza 91.44 cm a 182.88 cm de altura. Produce achenios de 1.7-2.2 mm de longitud monocarpelados e indehiscetes que generan una semilla con largas hebras blancas en forma de pluma que le permite dispersarse por anemocoria. Es una planta pionera o con efecto nodriza que propicia el crecimiento de otras plantas y atrae insectos como la mariposa azul pigmea *Brephidium bexilis* en su época de floración (en otoño-invierno, por los meses de octubre y enero), la dispersión de los cientos o miles de semillas se da en la primavera justo cuando comienzan las lluvias. Su uso humano abarca desde utensilios de limpieza como la escoba elaborada con sus ramas, hasta el tratamiento contra el salpullidos, espasmos y depresión (Figura 6) (Austin, 2010).

También ha sido reportada como fitoestabilizadora potencial, debido a su fuerte adaptabilidad a los metales y metaloides como el cobre (Cu), molibdeno (Mo), cromo (Cr) y zinc (Zn), claramente con un factor de translocación elevado, lo cual, indica la existencia de un mecanismo de tolerancia que consiste en la detoxificación interna, además de estrategias de exclusión (Baker & Walker, 1989; Haque *et al.*, 2008).

3. Antecedentes e Hipótesis

La zona norte de México posee características geoquímicas que propiciaron la formación de yacimientos cupríferos. Estos yacimientos naturales han sido ampliamente explotados por el valor del metal en la industria minero-metalúrgica (De la O-Villanueva *et al.*, 2013).

El antiguo distrito de Nacozari, en el norte del estado de Sonora, abarca algunos de los yacimientos de Cu de clase mundial y de los más importantes de México. Entre los más grandes e importantes se encuentran: La Caridad, Brecha Pilares, El Batamote, Los Alisos, La Gloria y San Nicolás (De la O-Villanueva *et al.*, 2013). La mina los Pilares producía 3,000 toneladas diarias de Cu desde 1895 hasta 1949, y actualmente se ubica a 10 km de lo que hoy es la Ciudad de Nacozari de García. Los residuos mineros que se generaron durante este periodo se depositaron en tres presas de jales (I, II y III), en un área que abarca 52 hectáreas (ha) (Figura 8). La Presa I, con 19 ha, se encuentra dentro de la zona urbana de Nacozari a tan solo 10 metros de las casas de por lo menos 40 familias. Su cercanía con la población y el posible riesgo en la salud ha sido un foco de atención para realizar investigaciones y propuestas que ayuden a un posible amortiguamiento de los contaminantes (De la O-Villanueva *et al.*, 2013).

Meza-Figueroa *et al.* (2009) realizaron un estudio dentro de este distrito para conocer la concentración y tipos de metales dentro de la Presa I, en las sales eflorescentes de la misma (sales que se generan en la superficie de los jales por evaporación) y dentro de los suelos residenciales. Dentro de la Presa I encontraron: Ag, Cu, Hg y As. Dentro de las sales eflorescentes encontraron: Zn, Mn, Cr y Cu. Y dentro de los suelos residenciales encontraron: Cu y As. En este estudio observaron un patrón en la presencia de los metales que indica una fuerte dispersión de estos elementos por viento y drenaje ácido, donde el Cu es uno de los elementos más abundantes seguido del Fe. Finalmente, reportan la concentración para el Cu dentro de la Presa I de 400-2,317 mg/kg, para la zona urbana de 47-450 mg/kg y para las sales eflorescentes de 68,751

mg/kg. Los autores concluyeron que la manera de prevenir los procesos erosivos del sitio es propiciar una cobertura de vegetación nativa de los sitios contaminados que toleren las diferentes concentraciones de los elementos, y a su vez poder favorecer a largo plazo la estructura y estabilidad de los contaminantes en el suelo, proceso conocido como fitorremediación.



Figura 8. Presas de jales existentes en Nacoziari de García, Sonora (Rivera, 2009).

La fitorremediación es un sistema de detoxificación biológica de suelos contaminados que comprende procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos de las plantas que de manera natural toleran altas concentraciones de metales pesados. Un conocimiento profundo de estos procesos que dan lugar a un fenotipo tolerante puede llegar a optimizar la elección de plantas que ayuden a amortiguar los efectos adversos de los contaminantes en este sitio en Nacoziari de García (Rivera, 2009; Haque *et al.*, 2009).

Son pocos los estudios que se han enfocado a la respuesta fisiológica de las plantas ante diferentes concentraciones del metal, es decir, evaluar su umbral de tolerancia. Esto resulta de relevancia ya que esas características fisiológicas le permiten a la planta ocupar nichos ecológicos ricos en metales (Clemens *et al.*, 2002).

En el caso de Nacoziari se han hecho estudios de las plantas con posible aplicación para la fitorremediación, entre ellos:

- i. Grandlic *et al.* (2009) propone emplear para la Presa I plantas estabilizadoras como *Atriplex lentiformis* (Torr.) S. Wats. y *Bouteloua dactyloides* (Nutt.) Columbus, debido

a que tienen un crecimiento significativo en biomasa dentro de los jales adicionado con el 10% de composta.

- ii. Rivera (2009) propone dos especies nativas en Nacozari de García de la familia Euphorbiaceae que han sido empleadas en diversos trabajos de fitoestabilización en México, *Jatropha dioica* Sesseé ex Cerv. y *Euphorbia* sp., las cuales además han sido reportadas por Carrillo & González-Chávez (2006) como acumuladoras de Cu, Zn, Pb y Cd.
- iii. Finalmente, Haque *et al.* (2008), propone a *Baccharis sarothroides* A. Gray como una planta con potencial uso para la fitorremediación de minas de cobre por su capacidad intrínseca de hiperacumular metales como Cu, Mo, Cr y Zn. En este estudio se determinó que la concentración de Cu en la raíz y hojas fue de 818.3 y 1214.1 mg/kg, respectivamente.

En este trabajo nos concentraremos en el género *Baccharis* sp. ya que se han encontrado mayor número de estudios previos sobre su tolerancia al Cu, como planta hiperacumuladora o potencialmente acumuladora. Por ejemplo, Bech *et al.* (2002) reportaron a *B. amdatensis* como una planta potencialmente acumuladora de Cu y acumuladora de Zn en la raíz en cantidades superiores a 1,900 µg/g. Ginocchio *et al.* (2004) encontraron que las plantas de *B. linearis* crecen en suelos contaminados con Cu, mencionan que la concentración en el suelo en los primeros 5 cm es de 535.9 mg/kg y en su hojarasca de 3,718 mg/kg. Finalmente, Ortiz-Calderón *et al.*, 2008 reportaron a *B. salicifolia* como una planta que transloca Cu a raíz y hojas en una concentración de 71.3 y 667.9 mg/kg, respectivamente (Ortiz-Calderón *et al.*, 2008).

A pesar de que existan reportes para este género donde se afirma su capacidad como planta tolerante o potencialmente tolerante al Cu, no se han realizado estudios donde se pruebe su umbral de tolerancia bajo diferentes concentraciones del metal y tampoco se han realizado estudios donde se pruebe su capacidad intrínseca a nivel genético. Estos estudios serían de relevancia, ya que los contaminantes pueden llegar a comportarse como una fuerte presión de selección dentro de la especie, formándose así ecotipos más tolerantes. Haque *et al.* (2008) probaron esta hipótesis en plantas de *Prosopis* sp. (Mezquite). Ellos utilizaron semillas provenientes de un sitio contaminado y de un proveedor comercial. Los autores encontraron que

las plantas provenientes de semillas del sitio contaminado tenían un umbral de tolerancia mayor que las plantas de semillas comerciales. Concluyeron, que las semillas provenientes de sitios contaminados podían estar mejor adaptadas para éstas condiciones.

Con base en los antecedentes ya mencionados, para esta investigación se eligió a *B. sarothroides*, una planta nativa de los sitios contaminados en Nacozari de García y reportada como planta hiperacumuladora de Cu. La importancia de estudiar a *B. sarothroides* a nivel fisiológico fue el probar su umbral de tolerancia al Cu y además evaluar su capacidad intrínseca como especie de tolerar este metal pesado a través de la comparación de poblaciones provenientes de un sitio contaminado y un sitio no contaminado.

Para este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

- ❖ **Las plántulas de semillas provenientes del sitio no-contaminado tendrán la misma capacidad y umbral de tolerancia ante diferentes concentraciones de Cu, que las plántulas provenientes de semillas del sitio contaminado.**
- ❖ **Las plantas provenientes de ambas poblaciones de semillas tendrán la misma respuesta fisiológica ante diferentes concentraciones de Cu.**

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la toxicidad del cobre en el crecimiento y respuesta fotosintética de plántulas de *Baccharis sarothroides* A. Gray, provenientes de semillas de un sitio contaminado (depósito de residuos, jales) y uno no-contaminado.

4.2 Objetivos particulares:

- (1) Determinar las diferencias morfológicas en peso y tamaño de las semillas provenientes de dos municipios en Sonora: Hermosillo (sitio no contaminado) y Nacozari de García (sitio contaminado).
- (2) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Cobre (0, 0.4, 2, 4, 10, 50 y 100 μM de Cu) en la biomasa de plántulas de 4 días de edad de ambos sitios.
- (3) Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Cobre (0, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g Cu kg}^{-1}$ de suelo) en plantas jóvenes de 30 días de edad de ambos sitios:
 - (3.1) Evaluar el efecto en el crecimiento.
 - (3.2) Determinar el efecto de la toxicidad del Cu en la actividad fotosintética.
 - (3.3) Determinar la acumulación del Cu en las hojas y en raíz de en planta joven.

5. Materiales y Métodos

5.1 Sitio de estudio

El sitio no contaminado se localiza hacia el nororiente de la ciudad de Hermosillo, aproximadamente a 14 kilómetros, sobre la carretera Ures-Hermosillo. Se trata del Ejido San Rafael localidad San Pedro El Saucito que se encuentra a 246 metros sobre el nivel del mar (msnm), cuyas tierras se caracterizaron por la producción de trigo en suelos limo-arenosos. Su clima es desértico cálido (BW (h')) de acuerdo a la clasificación climática de Köppen, con una temperatura promedio anual de 25°C, y una precipitación pluvial media anual de 400 mm y 2800 mm de evaporación potencial (Vega *et al.*, 2011).

El municipio de Nacozari de García, se ubica al noreste del estado de Sonora, tiene una altitud de 1,040 msnm. Su clima es estepario cálido (BS (h')) con una temperatura promedio anual de 18.3°C; y una precipitación pluvial media anual de 500 mm y 2090 mm de evaporación potencial (CONAGUA, 2010). El sitio contaminado (presa inactiva de jales, Presa I) se ubica dentro de la zona urbana, a unos 10 metros de las casas, y abarca un total de 19 hectáreas (De la O-Villanueva *et al.*, 2013). Sobre este complejo se encuentran manchones de vegetación con especies vegetales como *Baccharis sarothroides* de los cuales se colectaron las semillas.

5.2 Material Biológico

Para este estudio se utilizaron semillas de *Baccharis sarothroides* colectadas de 5 individuos de un sitio contaminado (Nacozari de García, Jales), y de 5 individuos de un sitio no contaminado (Hermosillo), ubicados en el estado de Sonora (Figura 9).

Para todos los experimentos las semillas de *B. sarothroides* se desinfectaron con agua destilada y jabón líquido (Axion ®) en agitación por 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se vaciaron a una solución con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% por 5 minutos, y finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada.

De acuerdo a los objetivos propuestos para este estudio los experimentos se dividieron en tres bloques (que corresponden a los objetivos particulares), donde: en el Bloque I se determinó el peso y el área de las semillas; en el Bloque II se evaluó el efecto del Cu en la biomasa de

plántulas de 4 días de edad; y en el Bloque III se evaluó el efecto del Cu en plantas de 30 días de edad.

La germinación de las semillas para los Bloques experimentales II y III de ambas poblaciones se llevó a cabo en cajas de Petri de 9 cm con papel filtro y 3 ml de agua destilada durante 24 horas, tiempo en el cual se daba la germinación de por lo menos el 50% de las semillas, o hasta alcanzar aproximadamente el 90% de germinación. Esto se realizó bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento Biotronette 844 (Lab-Line ®) con una humedad relativa de 60-80%, una temperatura constante de 26°C (día/noche), y un fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad).

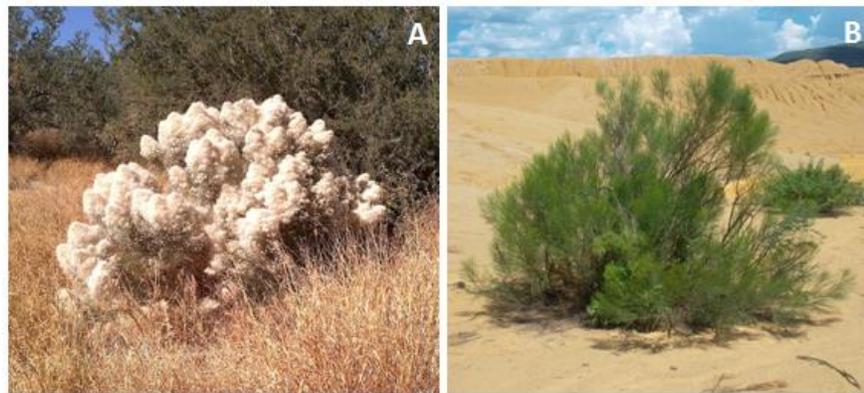


Figura 9. *Baccharis sarothroides* en Sonora. (A) Sitio no contaminado (Hermosillo), individuo con flores, y (B) Sitio contaminado, individuo sin flores (Jales, Nacozari de García).

5.3 Bloque I: Determinación del peso y área de las semillas

Se evaluó el peso y área de las semillas de *B. sarothroides* de ambas poblaciones para determinar sus diferencias, con la finalidad de descartar una respuesta diferencial al Cu derivada de la morfología de estas. El área de la semilla se tomó como un indicador de tamaño.

Primero, se tomaron fotografías de 30 semillas para cada población a una escala de 500 μm en un microscopio Axionskop 40 ZEISS ® con aumento de 5x, utilizando el programa AxionVision 4.7.1. La medición del área final se registró con el programa ImagenJ (versión 1.45) ajustado a la misma escala.

Después, se determinó el peso (mg) en una balanza analítica Adventurer™ OHAUS de 6 lotes de 250 semillas cada uno.

5.4 Bloque II: Evaluación del efecto de Cobre en la Biomasa de plántulas de 4 días de edad

Una vez germinadas las semillas se seleccionaron plántulas de tamaño similar de 4 días de edad, estas fueron transferidas a cajas de Petri de 5 cm con papel filtro y una solución de CaCl₂ 0.5 mM (pH 4.5) adicionada con las diferentes concentraciones de CuSO₄ (μM), con la finalidad de probar su umbral de tolerancia, por un tiempo de 8 días (Tabla 5). Se realizaron cambios de la solución cada 2 días para mantener un pH constante durante el tratamiento.

Tabla 5. Equivalencia de la concentración del CuSO₄ en sustrato inerte (μg/kg) y en solución acuosa (μM).

Tratamiento	Concentración en μg/kg	Concentración en μM
1	Control*	Control*
2	100**	0.4
3	500**	2
4	1000**	4
5	2,500	10
6	12,500	50
7	25,000	100

*En el sustrato inerte la concentración de CuSO₄ para el Control fue de 0.2 μM, y en la solución acuosa fue de 0 μM. **Concentraciones basadas en las reportadas por Haque *et al.* (2008) y Meza-Figueroa *et al.* (2009) para Nacozari de García.

Los tratamientos consistieron en 20 plántulas por cada caja Petri con 3 repeticiones cada una para ambas poblaciones.

A los 4 días se realizó una cosecha inicial de 20 plántulas con 3 repeticiones, esto con el fin de tener la biomasa previa a los tratamientos (t_0). Después de 8 días de tratamiento se realizó la segunda cosecha para la biomasa final (t_1) de todos los tratamientos incluyendo el control.

El material vegetal de cada cosecha fue secado en un horno Felisa ® a 80°C durante 15 días. Posteriormente, se pesó en una balanza analítica para calcular la biomasa total seca.

5.5 Bloque III: Evaluación del efecto de Cobre en plantas de 30 días de edad

5.5.1 Diseño experimental, semillas y sustrato inerte

El sustrato inerte esterilizado previamente en autoclave, consistió en peat-moss y agrolita (1:0.5). Con este sustrato, se llenaron bolsas forestales de 25 cm de alto y 15 cm de ancho, con un peso seco de 252.5 g de sustrato. Las plántulas se eligieron aproximadamente con la misma longitud de raíz y con los 2 cotiledones desarrollados. Estas plántulas se transplantaron a las bolsas con el sustrato y éstas se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 26°C (día/noche), un fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad) y una humedad relativa de 60-80%. Todas las plántulas fueron regadas con solución Hoagland modificada completa (Anexo I), hasta el inicio de los tratamientos.

A los 30 días de edad de las plántulas se iniciaron los tratamientos con diferentes concentraciones de CuSO₄ (Tabla 5), en las mismas condiciones de la cámara de crecimiento. Y se tomaron los datos morfológicos de 10 plántulas para el tiempo inicial (t₀) del análisis de crecimiento.

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones para cada tratamiento y para el control. Los tratamientos fueron: 100 µg/kg, 500 µg/kg y 1000 µg/kg, es decir, microgramos de Cu por kilogramo de sustrato. Las plántulas se regaron dos veces por semana. La humedad relativa del sustrato (óptima entre 60 y 80%) se monitoreó con un medidor electrónico (sav·a·plant II TM AMI Medical Electronics).

Los tratamientos se llevaron a cabo por un tiempo de 60 días con el objetivo de poder observar el efecto del metal en el tiempo final (t₁) en los procesos fotosintéticos y en el crecimiento.

5.5.2 Parámetros de crecimiento

Para evaluar el efecto del CuSO₄ en plantas de 30 días de edad se realizó el análisis clásico descrito por Chiariello *et al.* (1989), a través de los parámetros de crecimiento propuestos por Hunt (1990) y Evans (1972). Estos parámetros comprenden aspectos fisiológicos como la tasa de asimilación neta (NAR) y aspectos morfológicos de las plantas, calculados a través de la

proporción del área foliar (LAR), y sus componentes, el índice de peso foliar (LWR) y el área foliar específica (SLA).

Para este análisis se realizaron dos cosechas, tiempo inicial (t_0) y tiempo final (t_1) (Figura 10), donde se separaron los diferentes órganos (hoja, tallo y raíz) de cada una de las plantas de los diferentes tratamientos. Se registró su peso fresco en la balanza analítica, para ambas poblaciones. Posteriormente, el tejido fresco de tallo y raíz fue depositado en bolsas de papel de estraza y secado en un horno a 80°C durante 15 días para poder registrar su peso seco.

El área foliar de las hojas se calculó con un medidor de área foliar portátil (Li-Cor modelo Li-3000 A1) en cm^2 , posteriormente fueron colocadas en una prensa y secadas bajo las mismas condiciones. Los datos se procesaron y se calcularon los parámetros para el análisis clásico de crecimiento.

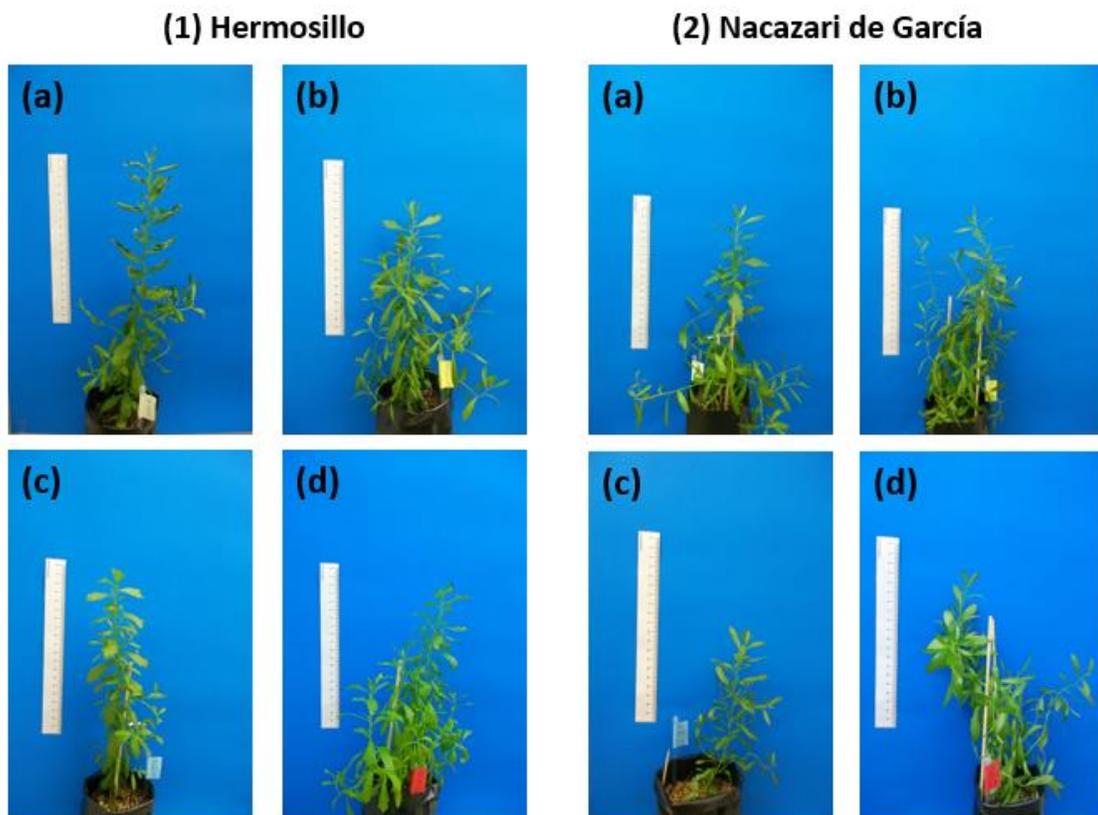


Figura 10. Plantas de 90 días de edad [en el Tiempo final (t_1)]. (a) Control; (b) $100 \mu\text{g/kg}$; (c) $500 \mu\text{g/kg}$; (d) $1000 \mu\text{g/kg}$, de CuSO_4 . La regla indica la escala de 20 cm.

Los parámetros y el cálculo de crecimiento relativo se describen a continuación:

Biomasa seca total

Este parámetro representa la suma del peso seco de la parte aérea y subterránea de cada planta expresada en gramos (g), se calculó con la siguiente ecuación:

$$Biomasa = W_2 - W_1$$

Ec. 1

Donde \bar{W}_1 y \bar{W}_2 son la medida del peso seco total de las plantas (g) para la cosecha del tiempo inicial (t_0) y el tiempo final (t_1).

Tasa de crecimiento absoluto (AGR)

La tasa de crecimiento absoluto describe la tasa de cambio en talla ó incremento en tamaño por unidad de tiempo, es decir:

$$\overline{AGR} = \frac{(\bar{W}_2 - \bar{W}_1)}{(t_1 - t_0)}$$

Ec. 2

Donde \bar{W}_1 y \bar{W}_2 son la medida del peso seco total de las plantas (g) en la cosecha del t_0 y t_1 (día⁻¹).

Tasa de crecimiento relativo (RGR)

La tasa de crecimiento relativo se define como el incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total de la planta, por unidad de tiempo (g g⁻¹ día), calculada con la siguiente ecuación:

$$\overline{RGR} = \frac{\ln \bar{W}_2 - \ln \bar{W}_1}{t_1 - t_0}$$

Ec. 3

Donde $\ln W_1$ y $\ln W_2$ indican el logaritmo natural del peso seco total de la planta al tiempo de cosecha inicial (t_0) y el tiempo final (t_1) (día⁻¹).

Tasa de asimilación neta (NAR)

La tasa de asimilación neta (NAR) es el parámetro que indica la eficiencia de los órganos de asimilación para generar nuevos tejidos. Es decir, este componente fisiológico de la RGR, se ve

reflejado en la producción de biomasa seca por unidad de área foliar por unidad de tiempo ($\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$), definida por la siguiente ecuación:

$$NAR = \frac{(\bar{W}_2 - \bar{W}_1)(\ln L_{A2} - \ln L_{A1})}{(L_{A2} - L_{A1})(t_1 - t_0)} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde \bar{W}_2 y \bar{W}_1 son las medidas de los pesos secos, L_{A2} y L_{A1} son el área foliar total inicial y final, $\ln L_{A2}$ y $\ln L_{A1}$ es el logaritmo natural de las áreas foliares.

Tasa de área foliar (LAR):

La tasa de área foliar (LAR) es un componente morfológico que indica la producción foliar e indirectamente de la eficiencia o potencial fotosintético y de respiración de las plantas entre ambos tiempo de cosecha. Se define como la proporción del área foliar total entre el peso seco total de la planta y su valor promedio en el intervalo t_0 y t_1 ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$), mediante la siguiente ecuación:

$$LAR = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{W_1}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{W_2}\right)}{2} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde L_{A2} y L_{A1} son el área foliar, W_1 y W_2 son el peso seco total de la planta y t_0 y t_1 son los tiempos de cosecha.

Área foliar específica (SLA):

Este parámetro, componente de LAR, calcula la densidad o el grosor relativo de las hojas en función del área foliar y el peso seco total de las hojas ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) entre los tiempos de cosecha t_0 y t_1 , mediante la siguiente ecuación:

$$SLA = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{L_{W1}}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{L_{W2}}\right)}{2} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde L_{A2} y L_{A1} son el área foliar total, y L_{W2} y L_{W1} son el peso seco total de las hojas; ambos en el tiempo inicial y final respectivamente (t_0 y t_1).

Proporción de peso foliar (LWR)

Se trata de un componente de LAR que indica la relación del peso seco total de las hojas con respecto al peso seco total de la planta ($g\ g^{-1}$). Este parámetro define la proporción de biomasa que es asignada a los órganos fotosintéticos entre el promedio de ambos tiempos de cosecha, y se define mediante la siguiente ecuación:

$$LWR = \frac{\left[\left(\frac{LW_1}{W_1}\right) + \left(\frac{LW_2}{W_2}\right)\right]}{2} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde LW_1 y LW_2 son la equivalencia del peso seco total de las hojas y W_1 y W_2 son el peso seco total de la planta, entre ambos tiempos de cosecha (t_0 y t_1).

Asignación de Biomasa: hoja (LWR), tallo (SWR) y raíz (RWR)

Esta proporción del peso seco de la hoja, raíz y tallo con respecto al total del peso seco de la planta, se refiere a la biomasa asignada a cada uno de los órganos que conforman a la planta completa, siendo el valor promedio para cada compartimiento de la planta sobre el intervalo de tiempo de cosecha t_0 y t_1 , se definen con las siguientes ecuaciones:

$$LWR = \frac{\left(\frac{LW_1}{W_1}\right) + \left(\frac{LW_2}{W_2}\right)}{2} \quad \text{Ec. 8}$$

$$SWR = \frac{\left(\frac{SW_1}{W_1}\right) + \left(\frac{SW_2}{W_2}\right)}{2} \quad \text{Ec. 9}$$

$$RWR = \frac{\left(\frac{RW_1}{W_1}\right) + \left(\frac{RW_2}{W_2}\right)}{2} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde LW_2 y LW_1 , S_{W2} y S_{W1} , R_{W2} y R_{W1} son las medidas del peso seco para las hojas, el tallo y la raíz respectivamente, y W_1 y W_2 son las medidas del peso seco total de la planta entre diferentes tiempos de cosecha (t_0 y t_1). Ninguno de estos componentes posee unidades al tratarse de porcentajes de biomasa.

Coefficiente Alométrico

El Coeficiente Alométrico es un índice que permite saber la relación morfológica entre el crecimiento de la raíz y el brote, mediante la siguiente ecuación:

$$R/S = \frac{RW}{(SW+LW)} \quad \text{Ec. 11}$$

Donde RW, SW y LW son los pesos secos de la raíz, tallo y hojas, respectivamente. Este valor, básicamente es un indicador de la asignación de recursos. Cuando los valores de este índice tienen un valor igual a la unidad significa que hay un balance en el crecimiento entre raíz y parte aérea, cuando el valor es <1, significa que el crecimiento es mayor hacia la parte aérea, y cuando el valor es >1 el crecimiento de la raíz es mayor.

5.5.3 Fluorescencia de la clorofila *a*

La actividad fotosintética se midió *-in situ-* con un fluorómetro de clorofila de excitación directa continua portátil Handy PEA (Hansatech, UK ®) (Figura 11). Antes de cada medición, se seleccionaron dos hojas que fueron sometidas a un periodo de adaptación a la oscuridad por 40 minutos, con unas pinzas o clips dispuestas en la parte media abaxial de las mismas, para permitir la oxidación de los centros de reacción del Fotosistema II (PSII). Posterior a la adaptación, el fluorómetro emitió un haz luminoso de 650 nm de longitud de onda con una intensidad de 3000 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante un segundo (Apéndice III). La lectura se tomó a los 34, 47, 61, 76 y 90 días de vida de las plantas (Figura 12), se midieron cinco plantas por tratamiento, se registraron dos hojas por cada planta.

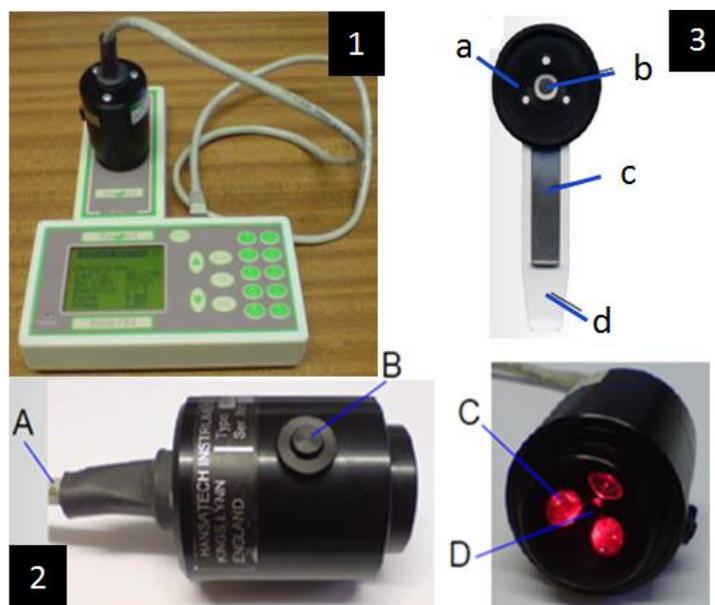


Figura 11. Componentes del sistema Handy PEA: (1) Unidad de control; (2) Sensor de calor, (A) Unidad de control/cable de conexión, (B) Botón disparador remoto, (C) Juego de LED de alta intensidad (centrado en 650 nm) con filtro de luz de onda corta NIR, y (D) Foto-sensor con filtro de baja longitud Kopp Coming RG9; (3) Clip para las hojas (a) Anillo de fijación, (b) Obstrucción retraible que muestra el área de iluminación de la muestra, (c) Hoja del obstructor, y (d) Cuerpo del clip de las hojas (HIL, 2006).

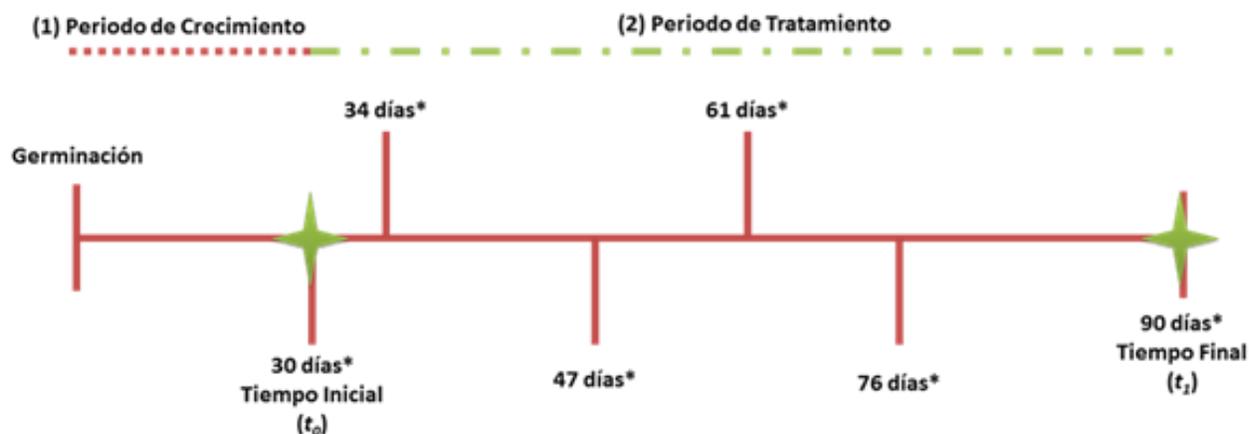


Figura 12. Periodos (1) de crecimiento y (2) de tratamiento [tiempos de cosecha para el análisis de crecimiento clásico (t_0 y t_1)]. N= 10 por tratamiento. *Días en los que se tomó la fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*). N=5 por tratamiento.

Las variables que se registraron para conocer la eficiencia fotosintética de *Baccharis sarothroides*, bajo los tratamientos con Cu, fueron la Producción Cuántica Máxima de la Fotoquímica Primaria (Fv/Fm), y el índice de desempeño fotosintético (PI_{ABS} , index performance on absorption basis).

Ambos parámetros evalúan la eficiencia del PSII o fotoquímica primaria. La proporción de la Fv/Fm refleja la eficiencia máxima de captura de la energía de excitación por los centros de reacción ‘abiertos’ del PSII. Un decremento en este parámetro indica una disminución en la regulación de la fotosíntesis o fotoinhibición durante el estrés por Cu (Maxwell & Johnson, 2000; Yruela, 2005).

En contraste, el PI_{ABS} depende de tres procesos relacionados: (1) a la fotoquímica primaria, (2) el transporte de electrones, y (3) la concentración de los centros de reacción por clorofila. Esto significa que el PI_{ABS} es sensible a cambios en las propiedades de la antena, en la eficiencia de captura o el transporte de electrones más allá de la plastoquinona (Q_A) (Oukarroum *et al.*, 2009) (Anexo II). La disminución en el PI_{ABS} en la respuesta al incremento del Cu en el medio, está relacionado con los cambios en las propiedades de la antena del fotosistema y a la disminución de la eficiencia fotoquímica en el transporte de electrones fotosintéticos en las plantas bajo este estrés (González *et al.*, 2008).

El índice de desempeño PI es uno de los parámetros de la fluorescencia de clorofila que proporciona información útil y cuantitativa acerca del estado de las plantas y su vitalidad. La expresión para el índice de desempeño es derivada de la analogía a la ecuación de Nernst que es utilizada para determinar el potencial rédox de un sistema:

$$PI_{ABS} = \left[\frac{\gamma_0}{1 - \gamma_0} \right] \left[\frac{\varphi_{P0}}{1 - \varphi_{P0}} \right] \left[\frac{\Psi_0}{1 - \Psi_0} \right]$$

El símbolo γ_0 representa la tasa de clorofilas de los centros de reacción y la clorofila total del PSII. El símbolo φ_{P0} representa la producción máxima de la fotoquímica primaria ($\varphi_{P0} = Fv/Fm$). El símbolo Ψ_0 representa la cadena del transporta de electrones (Maxwell & Johnson, 2000; Strasser *et al.*, 2000).

5.5.4 Análisis de elementos químicos: Hojas y Raíces

Una vez que se registró el peso seco de hojas y raíces de las plantas, para todos los tratamientos, éstos se molieron en un mortero de ágata para evitar la contaminación de cualquier tipo de elemento químico. Después de homogeneizar las muestras se montaron comprimidos o pastillas con una prensa hidráulica de 12 toneladas (TRUPER®, México), en el Laboratorio de preparación de muestras en el Instituto de Física de la UNAM, para poder determinar la concentración del Cu en ambos órganos.

El análisis de los elementos químicos en raíz y hoja de *B. sarothoides* se llevó a cabo mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X (XRF) por dispersión de energía, empleando el sistema SANDRA (Sistema de Análisis no Destructivo por Rayos-X) en el departamento de Física experimental del Acelerador Peletrón en el Instituto de Física de la UNAM. El sistema SANDRA está formado de un tubo de rayos-X de Mo ($17.5 K_{\alpha}$ de keV) de 1.5 mm de diámetro. Las pastillas del tejido seco de *B. sarothoides* se colocaron aproximadamente a 8 mm del colimador de salida de rayos-X, y la región a distancia se determinó por la intersección de dos láseres. El área analizada consistió en 3 puntos para cada pastilla, la cual correspondía a cada una de las plantas de los diferentes tratamientos, es decir, 10 pastillas por tratamiento para cada órgano de cada población. El tiempo de lectura en cada punto de la muestra fue de 3 minutos, tiempo adecuado para determinar todos los elementos detectables por esta técnica con un error estadístico menor al 5% (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010) (Figura 13).

El proceso de análisis consistió en hacer incidir el haz de rayos-X sobre la superficie de las pastillas, provocando que los átomos capaces de absorber los rayos-X pasaran del estado basal al estado excitado (o de mayor energía) debido a la salida de electrones de las capas internas del átomo. Como los estados excitados son inestables, el átomo tiende a volver al estado basal, se inician diferentes estados de transición de los electrones desde los niveles más externos hacia los niveles más internos, hasta ocupar los huecos producidos en las capas electrónicas. Este proceso da lugar a la emisión de energía en forma de radiación de rayos-X secundaria, llamada fluorescencia de rayos X, la cual es característica para cada elemento químico.

Los rayos-X característicos se midieron con un detector de rayos-X Si-PIN, ventana de $0.5 \mu\text{m}$ de Be, superficie de 6 mm^2 y espesor de $500 \mu\text{m}$ de Amptek. Las intensidades de rayos-X

(número de cuentas o fotones detectables), son proporcionales a la concentración del elemento en las pastillas. Las señales del detector se procesaron en un amplificador PX4 de Amptek conectado a una computadora (Vekemans *et al.*, 1994) para determinar las intensidades de los picos de rayos-X. La concentraciones elementales se determinaron siguiendo el modelo descrito por Rousseau *et al.* (1996), Tsutsumimoto & Tsuji (2007), y con base al espectro de material de referencia de hojas de jitomate (NIST, SRM, 1573a). El análisis permitió el cálculo puntual total de P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn en biomasa seca de hojas y raíz de *B. sarothroides*.

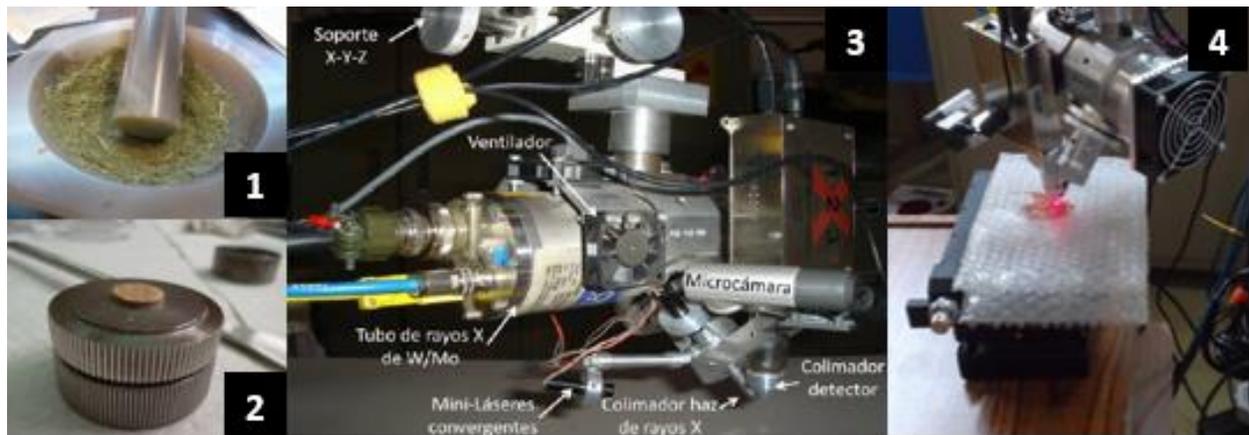


Figura 13. Análisis de los elementos químicos con la técnica XRF. (1) Molienda de hoja en mortero de ágata. (2) Pastilla del tejido de raíz. (3) Componentes del Sistema SANDRA (Sánchez, 2012). (4) Intersección del haz de rayos-X.

5.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de todos los bloques experimentales se utilizó el paquete *Statistica 7*® (Statsoft Inc., 2006).

En el área y peso de las semillas se realizó la prueba de normalidad para una media poblacional. Se analizó estadísticamente con una prueba de comparación de muestras independiente, *t* de *Student* ($\alpha = 0.05$), para evaluar la diferencia morfológica entre las semillas de la población de Hermosillo y Nacozari de García.

En la biomasa seca de las plántulas se utilizó el análisis de varianzas de una vía (ANOVA) con una significancia del 5%, donde se evaluó la diferencia en la biomasa seca entre los tratamientos con Cu y el control; además de evaluar la diferencia en la biomasa seca entre ambas poblaciones.

Para los datos de las plantas jóvenes de la F_v/F_m , PI_{ABS} , biomasa seca total, AGR, RGR, NAR, RWR, LWR, SWR, LAR, SLA, LWR y el Coeficiente Alométrico se utilizó el análisis de varianzas de una vía (ANOVA) con una significancia del 5%, y una prueba de comparación múltiple de medias (Tukey HSD, $\alpha = 0.05$) para evaluar la diferencia entre los tratamientos con Cu y el control; además de evaluar la diferencia entre poblaciones.

Finalmente, para el análisis de la proporción de cobre y otros elementos esenciales en hoja y raíz de *B. sarothroides* se utilizó un análisis de varianzas de una vía (ANOVA) con una significancia del 5%. Asimismo, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación de medias poblacionales, alternativa a la prueba ANOVA, al no cumplirse el supuesto de normalidad ($\alpha = 0.05$) para algunos de los elementos.

En las gráficas los valores de cada tratamiento se expresaron con promedios y con los errores estándar.

6. Resultados

Bloque I: Determinación del peso y el área de las semillas de *B. sarothroides*

En el estudio comparativo entre la población de Hermosillo y Nacozari, en su peso y área de las semillas, utilizando la prueba *t* de Student, se mostraron diferencias significativas entre las semillas, donde el peso presentó un valor de $t = 21.33023$ y una $p = 0.000000$; y el área un valor de $t = 2.237882$ y una $p = 0.029084$.

Las semillas de *B. sarothroides* de la población de Hermosillo (sitio no contaminado) fueron significativamente más grandes en área y peso que las semillas de la población de Nacozari (sitio contaminado) (Figura 14 y 15).

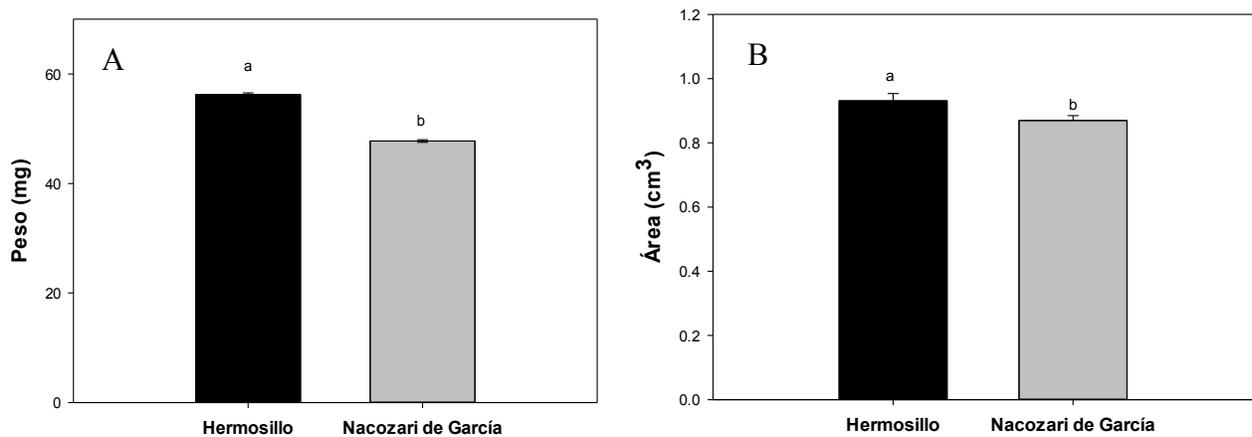


Figura 14. (A) Peso de las semillas. N= 6 lotes de 250 semillas cada uno. (B) Área de las semillas. N= 30. Se observaron diferencias significativas entre las poblaciones de Hermosillo y Nacozari en peso y área de las semillas, las barras representan el error estándar (EE). Las letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$).

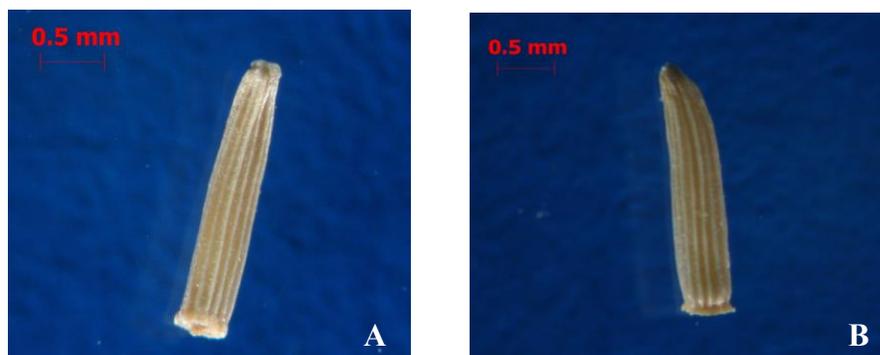


Figura 15. Fotos tomadas al microscopio óptico a 5x de las semillas (aquenio) de la población (A) Hermosillo y (B) Nacozari de García. Escala de 0.5 mm.

Bloque II: Efecto del cobre en la Biomasa de *B. sarothroides* en plántulas de 4 días de edad

Respecto a la biomasa seca de las plántulas de *B. sarothroides*, la población de Hermosillo no presentó efectos significativos de los tratamientos con respecto al control en la prueba ANOVA ($p = 0.2271$, $F_{(6, 14)} = 1.5718$); lo mismo para la población de Nacozari de García ($p = 0.1980$, $F_{(6, 14)} = 1.6815$). Es decir, las plántulas de ambas poblaciones tuvieron una biomasa similar bajo las diferentes concentraciones de Cu (0, 0.4, 2, 4, 10, 50 y 100 μM) (Figura 16 A y B).

Finalmente, en la comparación de la biomasa seca entre la población de Hermosillo y Nacozari tampoco se observó diferencias significativas ($p = 0.0878$, $F_{(1, 40)} = 3.0611$).

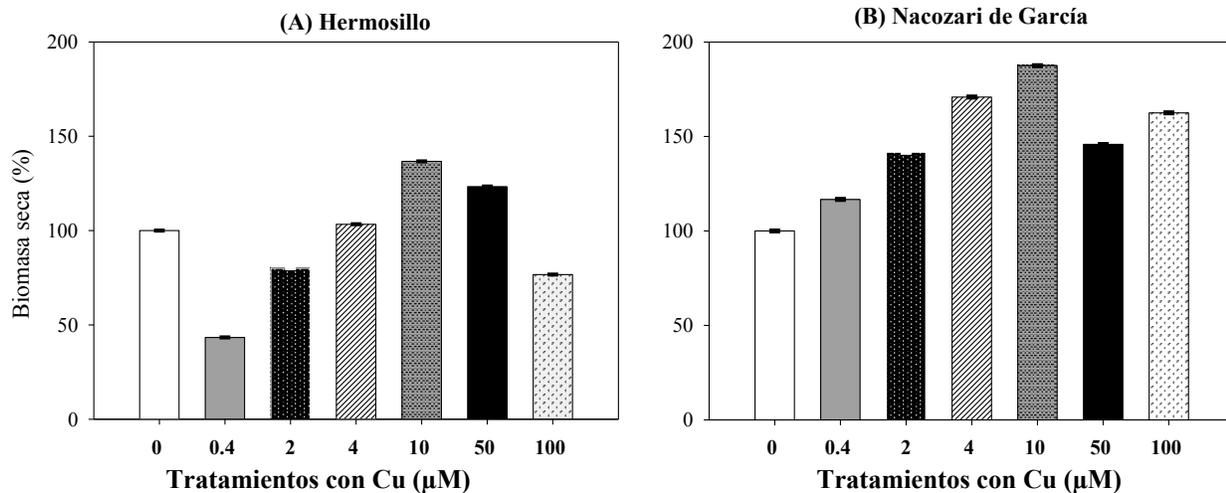


Figura 16. Porcentaje de biomasa seca de *B. sarothroides* en la población de (A) Hermosillo y (B) Nacozari de plántulas tratadas por 8 días con CuSO_4 (μM). $N=60$ plántulas por tratamiento, las barras representan el EE.

Bloque III: (1) Efecto del cobre en el crecimiento de *B. sarothroides* en plantas de 30 días de edad

Efecto del Cu en la biomasa seca

Al comparar la biomasa seca de ambas poblaciones se observaron diferencias significativas en la prueba ANOVA ($p = 0.0004$, $F_{(3, 78)} = 13.2206$). La población de Nacozari tuvo los valores más bajos en la biomasa seca (Anexo III). Sin embargo, eso no intervino en la respuesta de las plantas jóvenes de *B. sarothroides* al incremento del Cu, ya que la biomasa seca de las plantas tratadas con Cu, con respecto al control, no presentaron diferencias significativas en la prueba

ANOVA, tanto para la población de Hermosillo ($p = 0.7726$, $F_{(3, 36)} = 0.3735$) como para la población de Nacozari de García ($p = 0.2300$, $F_{(3, 36)} = 1.5038$). Estos resultados sugieren que el incremento de Cu no repercutió negativamente en la biomasa seca de *B. sarothroides* (Figura 17).

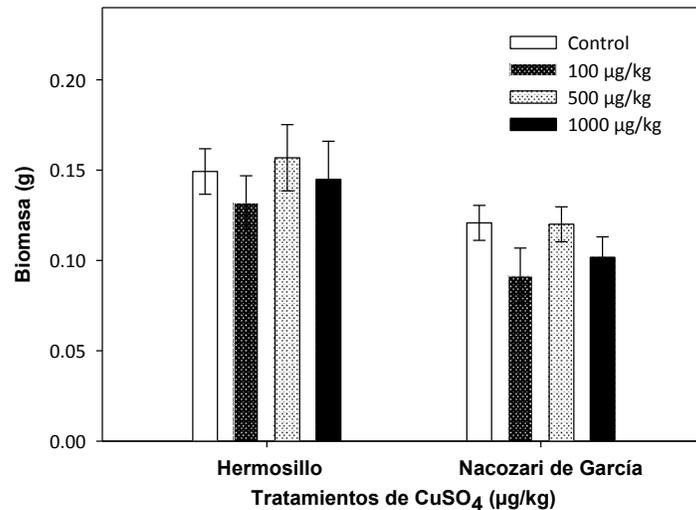


Figura 17. Biomasa seca de *B. sarothroides* para la población de Hermosillo (izquierda) y Nacozari (derecha) tratadas por 60 días con CuSO_4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$). $N= 10$, las barras representan el EE.

Efecto del Cu en el crecimiento de *B. sarothroides*

Las plantas de *B. sarothroides*, de ambas poblaciones, no presentaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento ($p > 0.05$) (AGR, RGR, NAR, LAR, SLA, LWR, RWR, SWR y el Coeficiente Alométrico) por el incremento de la concentración de Cu en los tratamientos de acuerdo a la prueba ANOVA.

De acuerdo a los valores obtenidos en la Tasa de Crecimiento Absoluto (AGR), las plantas tratadas con 100, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Cu tuvieron una tasa de cambio en talla similar a las plantas control, en la población de Hermosillo ($p = 0.6597$, $F_{(3, 36)} = 0.5374$) y en la población de Nacozari ($p = 0.3376$, $F_{(3, 36)} = 1.1621$). Además, las plantas de ambas poblaciones no fueron significativamente diferentes entre sí en este parámetro ($p = 0.7070$, $F_{(3, 78)} = 0.1423$) (Figura 18).

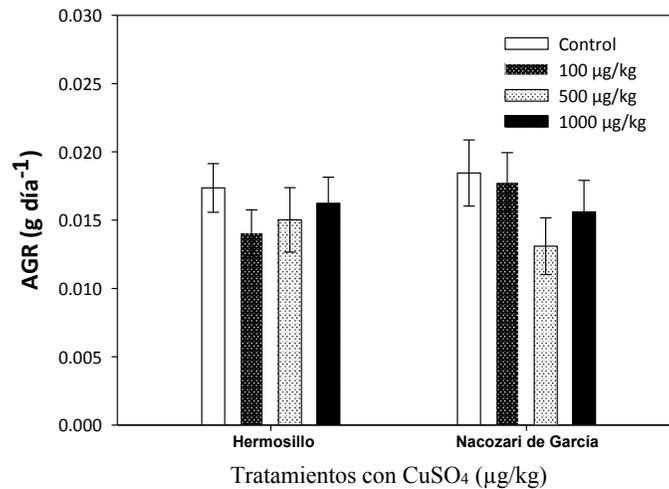


Figura 18. Tasa de Crecimiento Absoluta (AGR) de *B. sarothroides* para la población de Hermosillo y Nacozari. N= 10, las barras representan el EE.

Por su parte, en la Tasa de Crecimiento Relativa (RGR) las plantas tratadas con Cu de ambas poblaciones no presentaron diferencias significativas con las plantas control. Es decir, la velocidad de cambio en la biomasa seca de la población de Hermosillo ($p = 0.6648$, $F_{(3, 36)} = 0.5300$) y la población de Nacozari ($p = 0.4073$, $F_{(3, 36)} = 0.9920$), no se vio afectada por el incremento de la concentración de Cu. De igual forma, ambas poblaciones tuvieron una RGR similar ($p = 0.6695$, $F_{(3, 78)} = 0.1830$) (Figura 19 A).

En la Tasa de Asimilación Neta (NAR), el componente fisiológico de la RGR, se observaron diferencias significativas entre las plantas de las dos población de *B. sarothroides* ($p = 0.0045$, $F_{(3, 78)} = 8.5579$). De tal manera que las plantas de la población de Nacozari presentaron los valores más altos en la eficiencia de los órganos fotosintéticos para generar nuevo crecimiento, en comparación con la población de Hermosillo (Figura 19 B).

Sin embargo, las plantas de ambas poblaciones no se vieron afectadas por el incremento de la concentración de Cu en la NAR, la población de Hermosillo ($p = 0.5459$, $F_{(3, 36)} = 0.7211$) y la población de Nacozari ($p = 0.4032$, $F_{(3, 36)} = 1.0016$) (Figura 19 B).

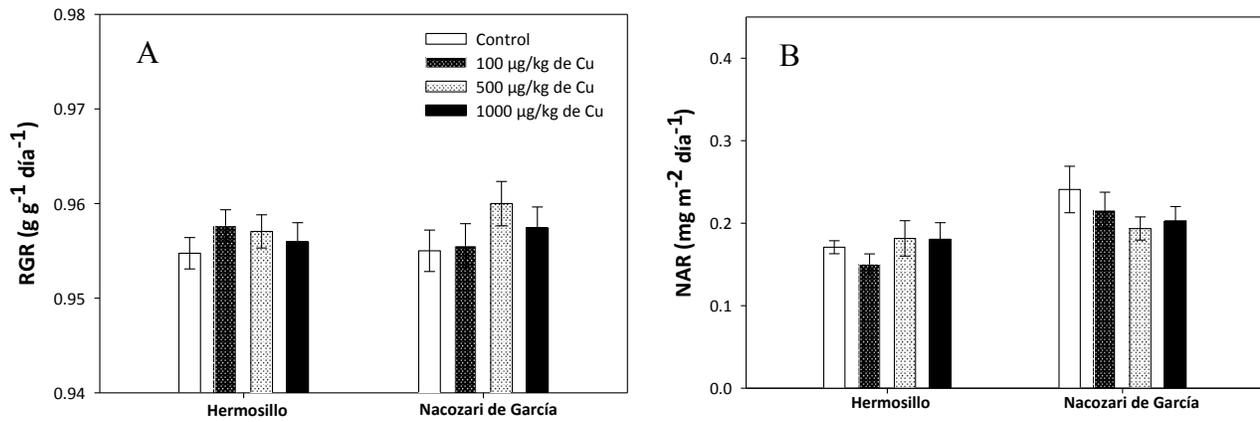


Figura 19. (A) Tasa de Crecimiento Relativo (RGR) y (B) Tasa de Asimilación Neta (NAR) de *B. sarothroides* para la población de Hermosillo y Nacozari. N= 10, las barras representan el EE.

La Proporción de Área Foliar (LAR), el Área Foliar Específica (SLA) y la Proporción de Biomasa Foliar (LWR), igual que los valores de la RGR, tampoco mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con 100, 500 y 1000 µg/kg de Cu, con respecto al control, en la población de Hermosillo (LAR: $p = 0.2486$, $F_{(3, 36)} = 1.4350$; SLA: $p = 0.2486$, $F_{(3, 36)} = 1.4350$; y LWR: $p = 0.7184$, $F_{(3, 36)} = 0.4510$) y en la población de Nacozari (LAR: $p = 0.8667$, $F_{(3, 36)} = 0.2420$; SLA: $p = 0.8666$, $F_{(3, 36)} = 0.2420$; y LWR: $p = 0.1643$, $F_{(3, 36)} = 1.8010$). Es decir, la asignación de biomasa destinada a los órganos fotosintéticos de *B. sarothroides* no se vio afectada por el incremento de la concentración de Cu (Figura 20).

Por otro lado, las diferencias significativas presentes entre las poblaciones de Hermosillo y Nacozari, reflejadas en los parámetros LAR, SLA y LWR, demuestran que las plantas de la población de Hermosillo presentan una mayor superficie fotosintética (LAR: $p = 0.000000$, $F_{(3, 78)} = 50.833$) y densidad de hojas (SLA, $p = 0.000000$, $F_{(3, 78)} = 80.010$), al igual que una mayor producción de hojas (LWR, $p = 0.003143$, $F_{(3, 78)} = 9.291$), en comparación con las de la población de Nacozari (Anexo III).

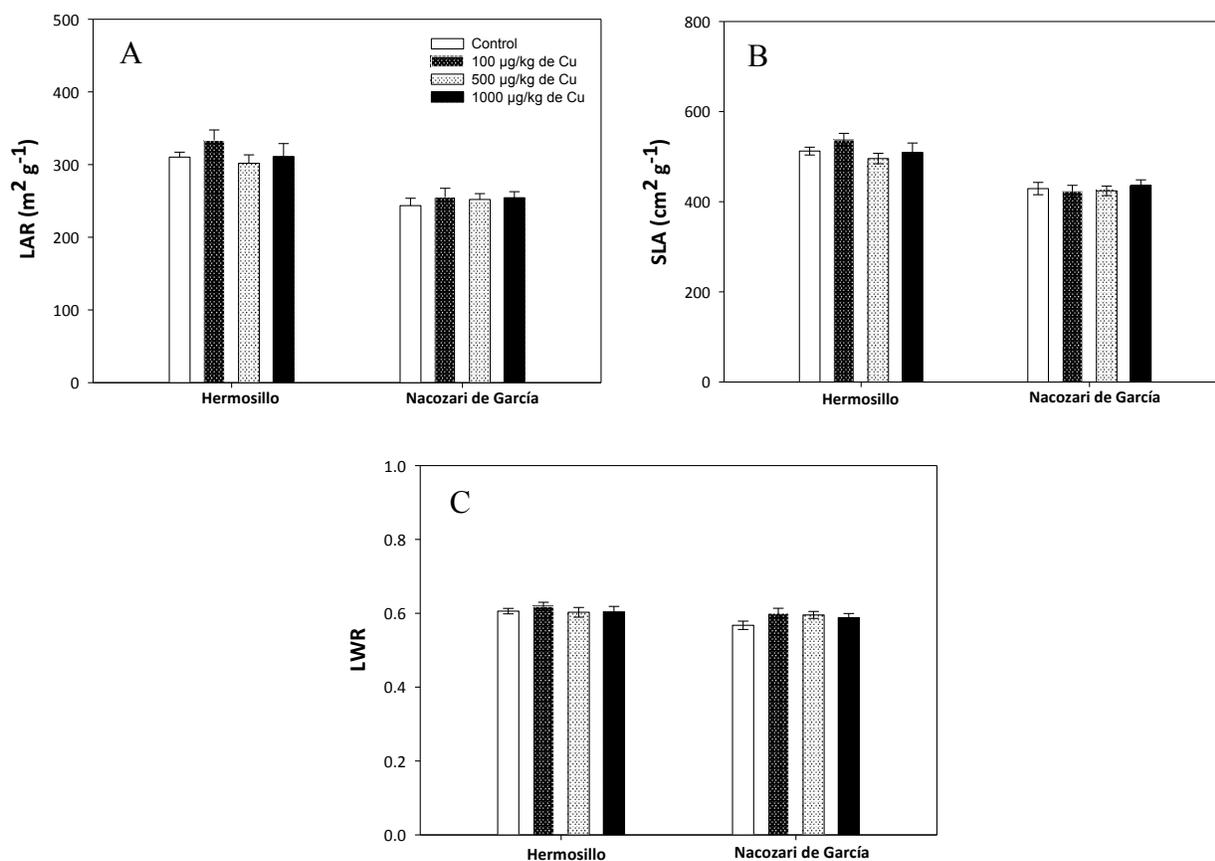


Figura 20. (A) Proporción de Área Foliar (LAR) (B) Área Foliar Específica (SLA) (C) Proporción De Biomasa Total (LWR) de *B. sarothroides* para la población de Hermosillo y Nacozari. N= 10, las barras representan el EE.

Al analizar la biomasa seca de las hojas y el área foliar no se observaron diferencias significativas entre las plantas de los tratamientos con 100, 500 y 1000 µg/kg de Cu con respecto al control, para la población de Hermosillo (Hojas: $p = 0.4868$, $F_{(3, 36)} = 0.8286$; y Área Foliar: $p = 0.3583$, $F_{(3, 36)} = 1.1086$) y para la población de Nacozari (Hojas: $p = 0.2789$, $F_{(3, 36)} = 1.3328$; y Área Foliar: $p = 0.3337$, $F_{(3, 36)} = 1.1726$). Además ambas poblaciones tuvieron una biomasa seca de hojas similar ($p = 0.3701$, $F_{(3, 78)} = 0.8126$), sin embargo, el área foliar de la población de Hermosillo fue significativamente más grande que el área foliar de la población de Nacozari ($p = 0.0073$, $F_{(3, 78)} = 7.5791$) (Figura 21 A y B).

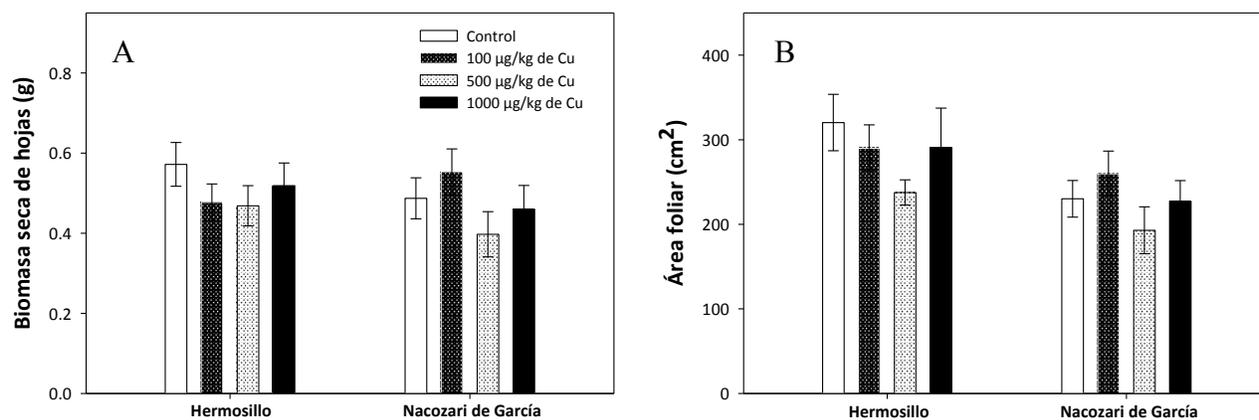


Figura 21. (A) Biomasa seca de hojas (B) Área foliar, de *B. sarothroides* de la población de Hermosillo y de Nacozari. N= 10, las barras representan el EE.

La Asignación de biomasa a raíz (RWR), tallo (SWR) y hojas (LWR) de *B. sarothroides* no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en la población de Hermosillo (RWR: $p = 0.770118$, $F_{(3, 36)} = 0.3770$; SWR: $p = 0.768759$, $F_{(3, 36)} = 0.379$; LWR: $p = 0.718469$, $F_{(3, 36)} = 0.451$) y de Nacozari (RWR: $p = 0.222381$, $F_{(3, 36)} = 1.534$; SWR: $p = 0.211930$, $F_{(3, 36)} = 1.577$; LWR: $p = 0.164363$, $F_{(3, 36)} = 1.801$). Sin embargo, ambas poblaciones fueron significativamente diferentes entre sí en los parámetros de asignación de biomasa en RWR ($p = 0.001286$, $F_{(3, 78)} = 11.158$), SWR ($p = 0.004640$, $F_{(3, 78)} = 8.497$) y LWR ($p = 0.003143$, $F_{(3, 36)} = 9.291$).

En cuanto a la relación morfológica entre la raíz y el brote de ambas poblaciones (o Coeficiente Alométrico) tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control (Hermosillo, $p = 0.772626$, $F_{(3, 36)} = 0.3735$; Nacozari, $p = 0.230058$, $F_{(3, 36)} = 1.5038$). Sin embargo, ambas poblaciones tuvieron diferencias significativas en esta relación entre la raíz y el brote ($p = 0.001021$, $F_{(3, 78)} = 11.650$).

Por último, el valor del Coeficiente Alométrico para *B. sarothroides* fue menor a 1, de tal manera que esta especie destina más recursos al crecimiento hacia la parte aérea (hojas y tallo), y principalmente a las hojas, en comparación con la raíz (Figura 22 A y B, Anexo III).

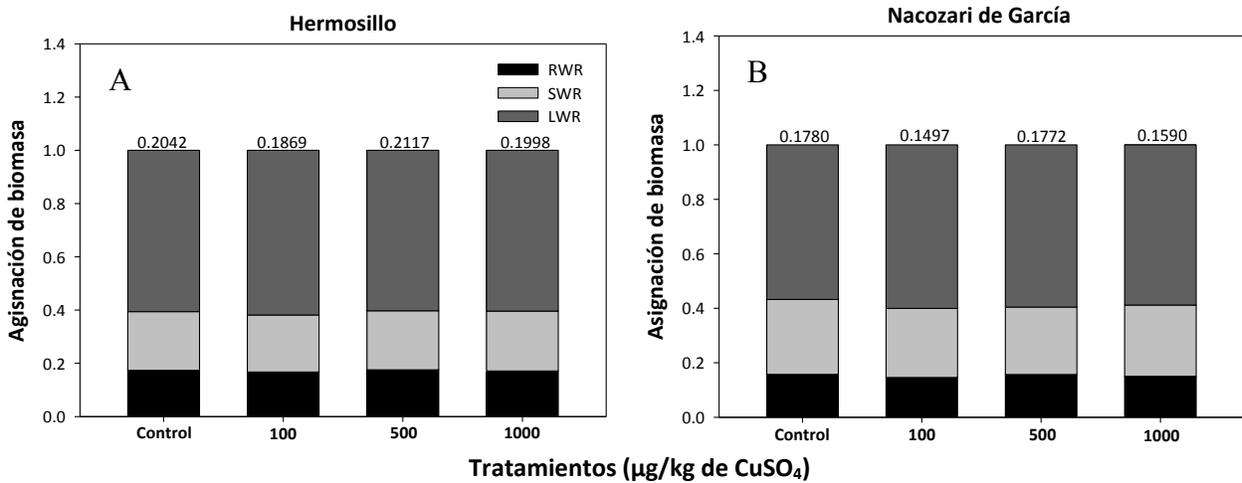


Figura 22. Asignación de Biomasa a Raíz (RWR), Tallo (SWR) y Hojas (LWR) de *B. sarothroides* de la población de (A) Hermosillo y de (B) Nacozari. N=10. El valor numérico sobre cada barra corresponde al Coeficiente Alométrico R/S.

Bloque III: (2) Efecto del Cu en la Fluorescencia de la clorofila *a* de *B. sarothroides* en plantas de 30 días de edad

Los valores obtenidos en la Producción Cuántica Máxima de la Fotoquímica Primaria (F_v/F_m) para la población de Hermosillo reflejaron diferencias significativas relacionadas con el incremento en la concentración del Cu en el sustrato con respecto al control ($p = 0.010808$, $F_{(3, 180)} = 4$), sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron en el tiempo de acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA ($p = 0.486256$, $F_{(12, 180)} = 1$) (Figura 23 A).

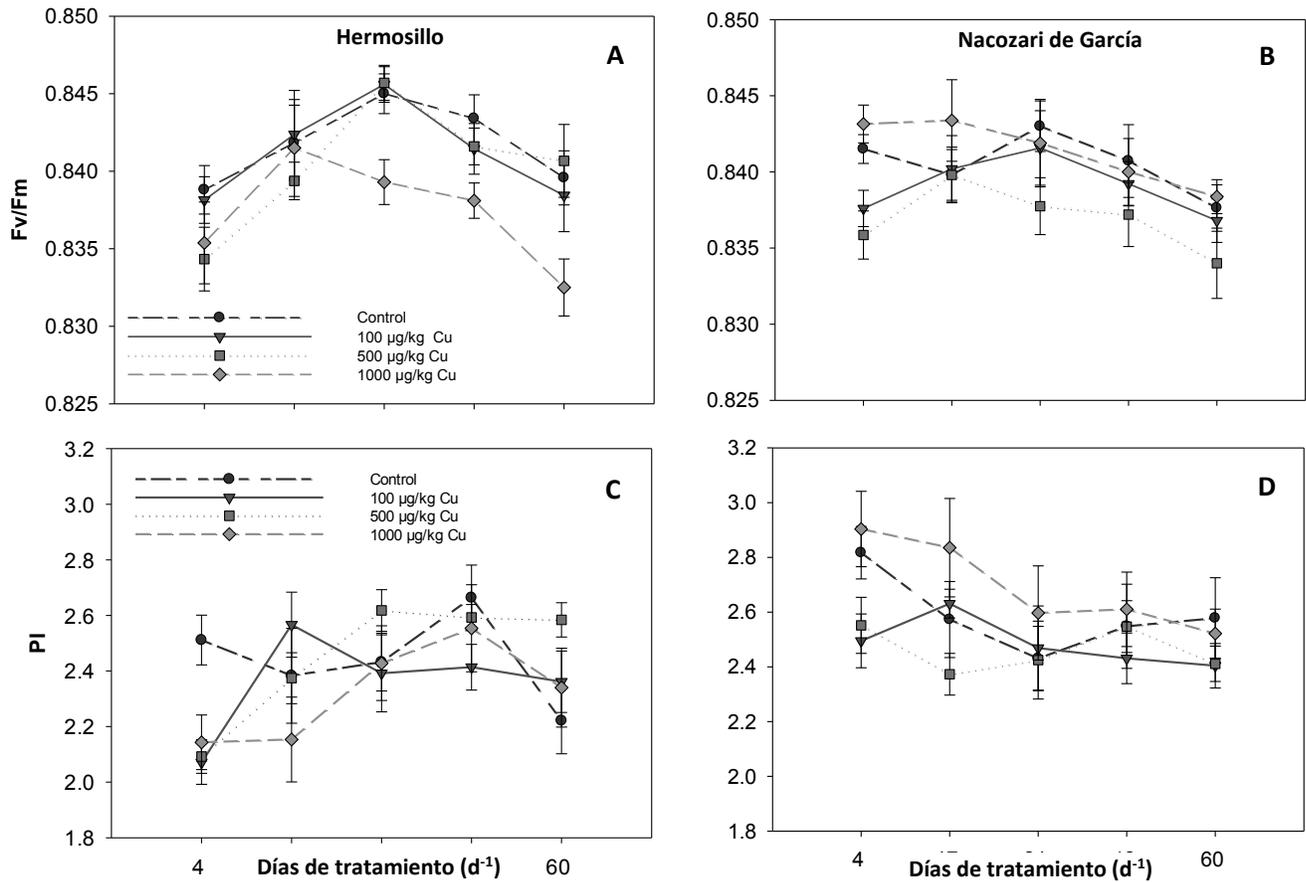


Figura 23. (A y B) Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria F_v/F_m , (C y D) Índice de desempeño PI_{ABS} , de las plantas de *B. sarothroides* de la población de Hermosillo y Nacoziari. Tratamientos con $CuSO_4$: (●) Control, (▼) 100 µM, (■) 500 µM y (◆) 1000 µM de Cu. N= 5, las barras representan el EE.

Para la población de Nacozari de García, los valores de la F_v/F_m no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control ($p = 0.171368$, $F_{(3, 180)} = 1.7$), resultado que se mantuvo a lo largo del tiempo ($p = 0.134912$, $F_{(12, 180)} = 1.5$) (Figura 23 B).

Comparando los valores de la F_v/F_m entre la población de Hermosillo y Nacozari no se observaron diferencias significativas ($p = 0.339980$, $F_{(3, 360)} = 1$). Además, en ambas poblaciones se mantuvieron los valores de la F_v/F_m en el tiempo independiente de la concentración de Cu a la cual estuvieron expuestas ($p = 0.166158$, $F_{(12, 360)} = 1$). Es decir, en las plantas de ambas poblaciones no se observaron efectos adversos en el $PSII$ relacionados con el incremento de la concentración de Cu en el tiempo ($p = 0.188318$, $F_{(12, 360)} = 1$).

Las plantas del control, tanto para la población de Hermosillo como de Nacozari de *B. sarothroides*, mostraron durante todo el periodo experimental una media de la F_v/F_m de 0.83 y 0.84, respectivamente (Anexo III).

Por otro lado, en este trabajo además de analizar el parámetro de la F_v/F_m , el cual refleja los efectos del Cu en la fotoquímica primaria del $PSII$, también se registró y analizó el índice de eficiencia fotosintética (PI_{ABS}). Dicho parámetro indica 3 procesos importantes de la fotosíntesis: (1) las reacciones fotoquímicas primarias, (2) la eficiencia de la conversión de energía durante la fijación del carbón en el ciclo de Calvin y (3) la densidad de centros de reacción activos en la clorofila (Strasser *et al.*, 2000).

El parámetro del PI_{ABS} de la población de Hermosillo no mostró diferencias significativas relacionadas con el incremento en la concentración del Cu en el sustrato con respecto al control ($p = 0.115020$, $F_{(3, 180)} = 2.004$), no obstante, durante el tiempo dicho parámetro fue cambiando de forma significativa ($p = 0.040754$, $F_{(12, 180)} = 1.870$) (Figura 23 C).

Finalmente, en las plantas de la población de Nacozari de García no hubo diferencias significativas en el PI_{ABS} relacionadas con el incremento en la concentración del Cu en el sustrato con respecto al control ($p = 0.811232$, $F_{(3, 180)} = 0.320$), resultado que se mantuvo a lo largo del tiempo ($p = 0.762211$, $F_{(12, 180)} = 0.687$) (Figura 23 D).

En los valores de la PI_{ABS} entre la población de Hermosillo y Nacozari no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con Cu ($p = 0.568003$, $F_{(3, 360)} = 0.67$). Además, en ambas poblaciones se mantuvieron los valores de la PI_{ABS} en el tiempo independiente de la concentración del metal a la cual estuvieron expuestas ($p = 0.094066$, $F_{(12, 360)} = 1.58$).

En las plantas de ambas poblaciones no se observaron efectos adversos relacionados con el incremento de la concentración de Cu en el tiempo ($p = 0.715993$, $F_{(12, 360)} = 0.74$). Es decir, ambas poblaciones no presentaron síntomas de toxicidad o algún efecto adverso del Cu en el aparato fotosintético primario, por lo que ambas poblaciones presentan un mecanismo de tolerancia a este metal.

Bloque III: (3) Proporción de cobre y otros elementos esenciales en tejido seco de hoja y raíz de *B. sarothroides* en plantas de 30 días de edad tratadas con $CuSO_4$

Acumulación del Cu en la parte aérea y raíces; y su efecto en la absorción de elementos minerales.

Las proporciones relativas calculadas a partir de la fluorescencia de los elementos por emisión de rayos X (XRF) correspondieron a: Cu, P, S, Mn, K, Fe, Zn, Ca y Cl.

A continuación se presentan los resultados del análisis estadístico de cada elemento:

Cobre.

La concentración del Cu en el tejido seco de las hojas, mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control para ambas poblaciones (Hermosillo: $p = 0.0001$, $H_{(3, 40)} = 20.28922$; Nacozari: $p = 0.0000$, $H_{(3, 40)} = 28.00733$). En las hojas de las plantas con el tratamiento de 500 y 1000 μg de Cu / kg de suelo la concentración en peso seco (ppm) fue mayor a los valores del control y el tratamiento con 100 μg de Cu / kg de suelo (Figura 24 A).

Por otro lado, en el tejido seco de la raíz de la población de Hermosillo se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control ($p = 0.002695$, $F_{(3, 36)} = 5.6915$), contrario a la población de Nacozari ($p = 0.0711$, $H_{(3, 40)} = 7.025854$) (Figura 24 B).

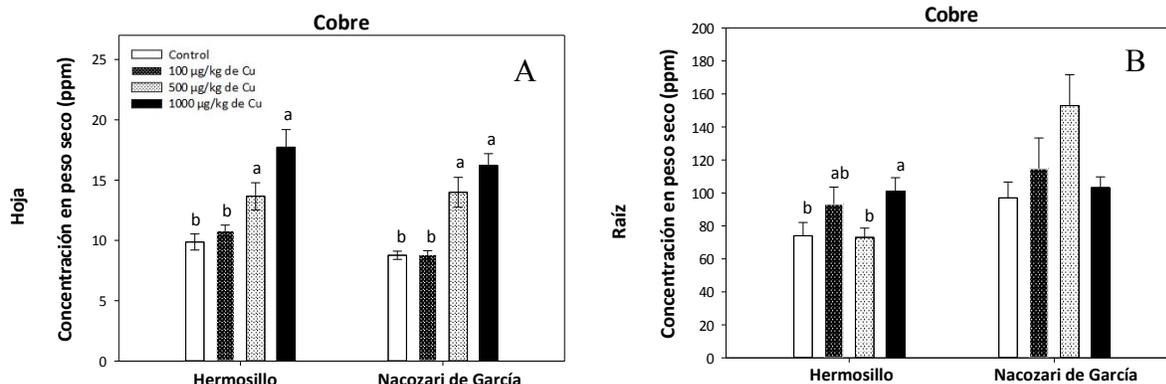


Figura 24. Proporción relativa de Cu en (A) hojas y en (B) raíces de *B. sarothroides* con 90 días de vida. N= 10, las barras representan el EE. Las letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) (Ver pruebas estadísticas en la sección de Materiales y Métodos).

En el análisis comparativo de la concentración de Cu en el tejido seco de la raíz entre ambas poblaciones mostró diferencias significativas ($p = 0.0001$, $H_{(3, 80)} = 16.10083$), sin embargo a nivel del tejido de la hoja estas diferencias no se reflejaron ($p = 0.1530$, $H_{(3, 80)} = 2.042019$).

Fósforo.

La concentración de P en ambas poblaciones, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de la hoja (Hermosillo, $p = 0.865180$, $F_{(3, 36)} = 0.2438$; Nacozari, $p = 0.174613$, $F_{(3, 36)} = 1.7479$) y la raíz (Hermosillo, $p = 0.4244$, $H_{(3, 40)} = 2.794555$; Nacozari, $p = 0.8692$, $H_{(3, 40)} = 0.7169091$) (Figura 25 A y B).

Asimismo, la concentración del P fue significativamente diferente entre poblaciones para el tejido seco de la hoja ($p = 0.000153$, $F_{(1, 78)} = 15.8431$) y la raíz ($p = 0.0000$, $H_{(3, 80)} = 22.78620$), siendo mayor su concentración en hoja y raíz de la población de Nacozari.

Azufre.

La concentración de S en ambas poblaciones, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de la hoja (Hermosillo, $p = 0.319689$, $F_{(3, 36)} = 1.211$; Nacozari, $p = 0.493885$, $F_{(3, 36)} = 0.815$) y la raíz (Hermosillo, $p = 0.178687$, $F_{(3, 36)} = 1.7275$; Nacozari, $p = 0.1931$, $H_{(3, 40)} = 4.724866$) (Figura 25 C y D).

En el análisis comparativo de la concentración de S en el tejido seco de la hoja entre poblaciones no mostró diferencias significativas ($p = 0.114924$, $F_{(1, 78)} = 2.542$) pero si para el tejido seco de la raíz ($p = 0.0073$, $H_{(1, 80)} = 7.207922$) donde la población de Hermosillo presentó los valores más altos con promedio de 7332.5 ppm.

Manganeso.

La concentración del Mn en ambas poblaciones, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de la hoja (Hermosillo, $p = 0.321675$, $F_{(3, 36)} = 1.205$; Nacozari, $p = 0.307584$, $F_{(3, 36)} = 1.2455$) y la raíz (Hermosillo, $p = 0.658839$, $F_{(3, 36)} = 0.539$; Nacozari, $p = 0.938770$, $F_{(3, 36)} = 0.1346$) (Figura 26 A y B).

No obstante, entre ambas poblaciones se encontraron diferencias significativas en la concentración de Mn en el tejido seco de la hoja ($p = 0.000032$, $F_{(1, 78)} = 19.495$) y de la raíz ($p = 0.000103$, $F_{(1, 78)} = 16.751$), donde la población de Nacozari tiene una mayor concentración del mineral con un promedio de 327.5 y 94.5 ppm, respectivamente.

Potasio.

La concentración del K en ambas poblaciones, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de la hoja (Hermosillo, $p = 0.104495$, $F_{(3, 36)} = 2.203$; Nacozari, $p = 0.077005$, $F_{(3, 36)} = 2.476$) y la raíz (Hermosillo, $p = 0.085129$, $F_{(3, 36)} = 2.386$; Nacozari, $p = 0.158804$, $F_{(3, 36)} = 1.8320$) (Figura 26 C y D).

Asimismo, entre ambas poblaciones no se observó diferencias significativas en la concentración de K en el tejido seco de la hoja ($p = 0.513107$, $F_{(1, 78)} = 0.432$) y de la raíz ($p = 0.402583$, $F_{(1, 78)} = 0.708$).

Hierro.

La concentración de Fe en ambas poblaciones, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de las hojas (Hermosillo: $p = 0.200493$, $F_{(3, 36)} = 1.6256$; Nacozari: $p = 0.8099$, $H_{(3, 40)} = 0.9642958$) (Figura 27 A y B).

En el tejido seco de la raíz para la población de Nacozari, la concentración de Fe tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control ($p = 0.5034$, $H_{(3, 40)} = 2.348123$). No obstante, la población de Hermosillo si mostró diferencias significativas ($p = 0.000478$, $F_{(3, 36)} = 7.5622$), donde el control tuvo la mayor concentración del Fe con 313 ppm.

Por último, al comparar ambas poblaciones en la concentración de Fe en el tejido seco de la hoja se encontraron diferencias significativas ($p = 0.0063$, $H_{(3, 36)} = 7.468761$), caso contrario del tejido seco de la raíz ($p = 0.1213$, $H_{(1, 80)} = 2.400177$) donde no se observó diferencias significativas.

Zinc.

La concentración del Zn presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de las hojas en la población de Nacozari ($p = 0.003525$, $F_{(3, 36)} = 5.416$), siendo el tratamiento con 100 μg de Cu / kg de suelo el de menor concentraciones del mineral. Para la población de Hermosillo no se mostró efectos por el incremento del Cu en el sustrato en la concentración del Zn ($p = 0.1834$, $H_{(3, 40)} = 4.846829$) (Figura 27 D).

En el tejido seco de la raíz en ambas poblaciones, no se mostró diferencias significativas en la concentración del Zn entre los tratamientos con Cu con respecto al control (Hermosillo: $p = 0.128573$, $F_{(3, 36)} = 2.0191$; Nacozari: $p = 0.2736$, $H_{(3, 40)} = 3.889756$) (Figura 27 C).

Al comparar ambas poblaciones se observó que la concentración de Zn en el tejido seco de la hoja y de la raíz fueron significativamente diferentes (Hoja: $p = 0.0000$, $H_{(1, 80)} = 36.28567$; Raíz: $p = 0.0003$, $H_{(1, 80)} = 13.19533$). En el tejido seco de la hoja, población de Hermosillo presentó concentraciones más altas de Zn que la población de Nacozari; contrario, el tejido seco de la raíz la población de Nacozari tuvo la concentración más alta de Zn.

Calcio.

La concentración del Ca en ambas poblaciones, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control en el tejido seco de la hoja (Hermosillo, $p = 0.282983$, $F_{(3, 36)} = 1.320$; Nacozari, $p = 0.643164$, $F_{(3, 36)} = 0.563$) (Figura 28 B).

Para el tejido seco de la raíz de la población Hermosillo ($p = 0.007124$, $F_{(3, 36)} = 4.7092$) se presentaron diferencias significativas en la concentración de Ca, donde el tratamiento con 500 μg de Cu / kg de suelo fue el de menor concentración. Este efecto no fue reflejado en la población de Nacozari, debido a que no se observaron efectos en este mineral por el incremento del Cu en el sustrato ($p = 0.0946$, $H_{(3, 40)} = 6.377027$) (Figura 28 A).

En el tejido seco de la raíz la concentración de Ca fue significativamente diferente en ambas poblaciones ($p = 0.0009$, $H_{(1, 80)} = 11.02148$), teniendo que la concentración de Ca en la población de Nacozari fue mayor que en la población de Hermosillo. Para el tejido seco de la hoja ambas poblaciones no presentaron diferencias significativas ($p = 0.184782$, $F_{(1, 78)} = 1.790$).

Cloro.

La concentración de Cl en el tejido seco de la hoja para la población de Hermosillo no presentó diferencias significativas ($p = 0.565329$, $F_{(3, 36)} = 0.6879$), sin embargo, la población de Nacozari si mostró diferencias significativas entre los tratamientos con Cu con respecto al control ($p = 0.036850$, $F_{(3, 36)} = 3.1453$) donde el tratamiento con 100 μg de Cu / kg de suelo tuvo el mayor valor en la concentración del Cl (Figura 28 D).

En el tejido seco la raíz no se observaron diferencias significativas en ambas poblaciones entre los tratamientos con Cu con respecto al control en la concentración de Cl (Hermosillo, $p = 0.738340$, $F_{(3, 36)} = 0.4220$; Nacozari, $p = 0.2673$, $H_{(3, 40)} = 3.946829$).

Finalmente, la concentración de Cl en el tejido seco de la raíz fue significativamente diferente entre ambas poblaciones ($p = 0.0000$, $H_{(1, 80)} = 18.25355$), siendo mayor la concentración de Cl en la población de Nacozari. Sin embargo, para el tejido de la hoja no se observaron estas diferencias significativas ($p = 0.219681$, $F_{(1, 78)} = 1.5310$).

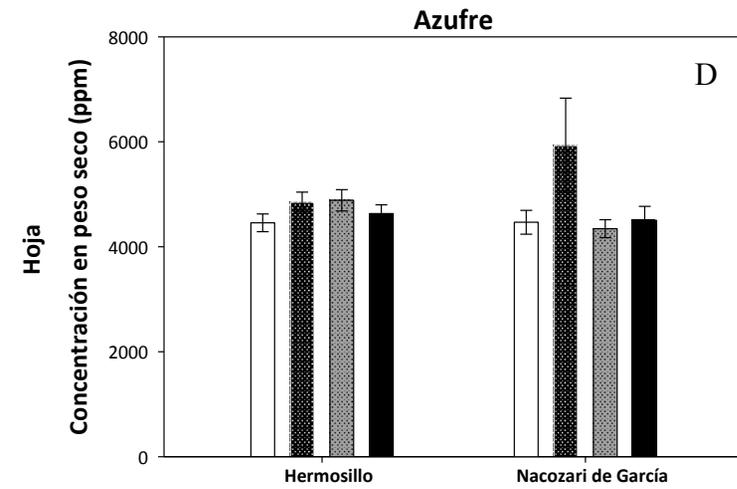
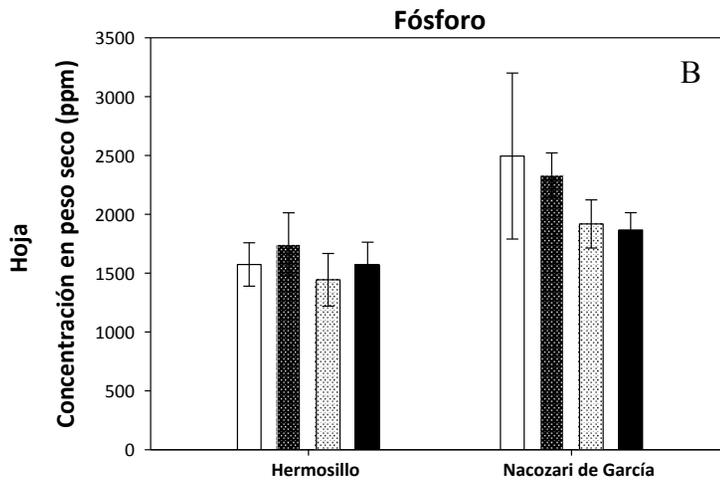
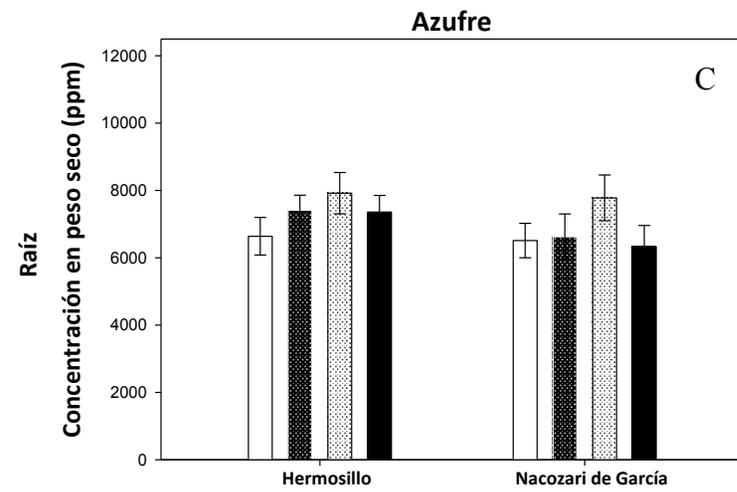
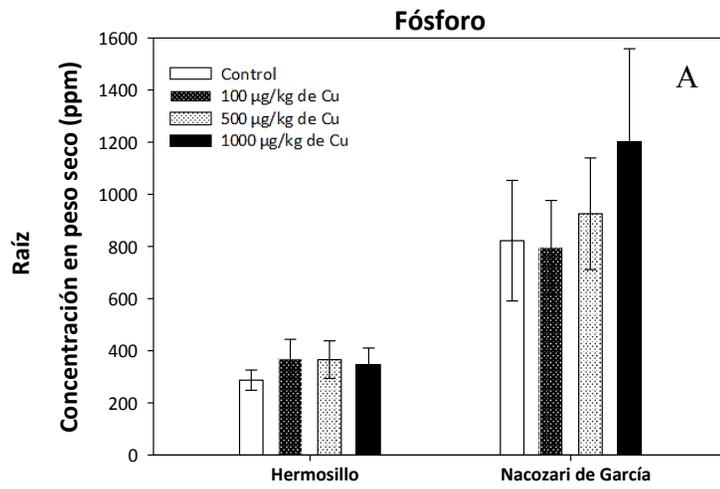


Figura 25. Proporción relativa de P (A y B) y S (C y D) en raíces y en hojas de *B. sarothroides* con 90 días de vida. N= 10, las barras representan el EE.

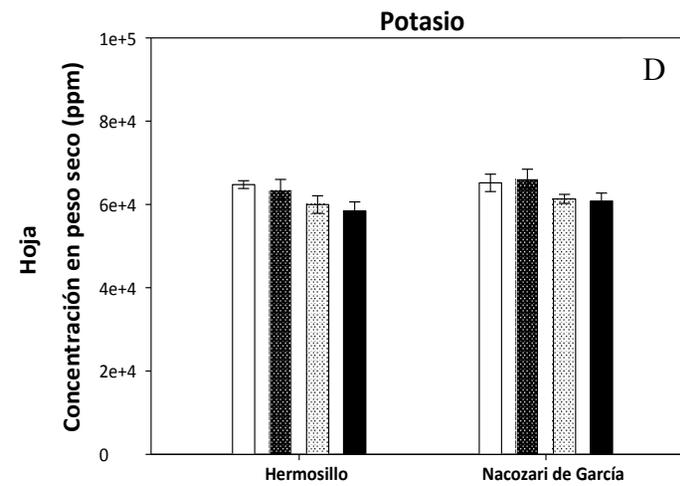
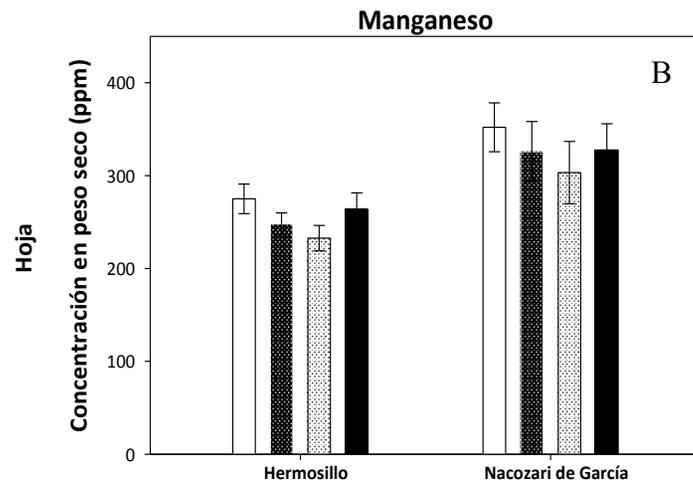
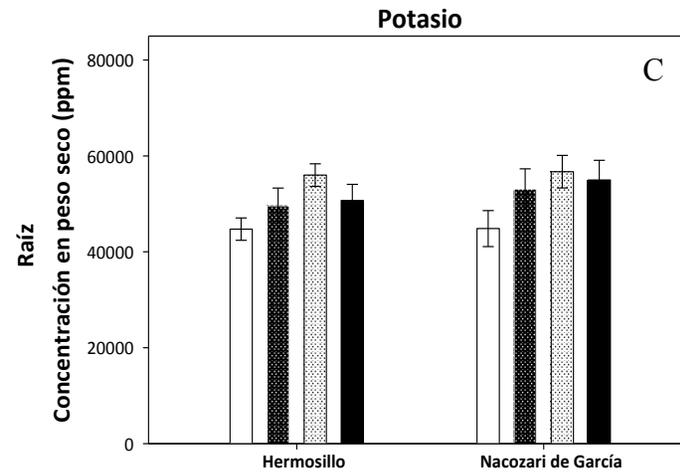
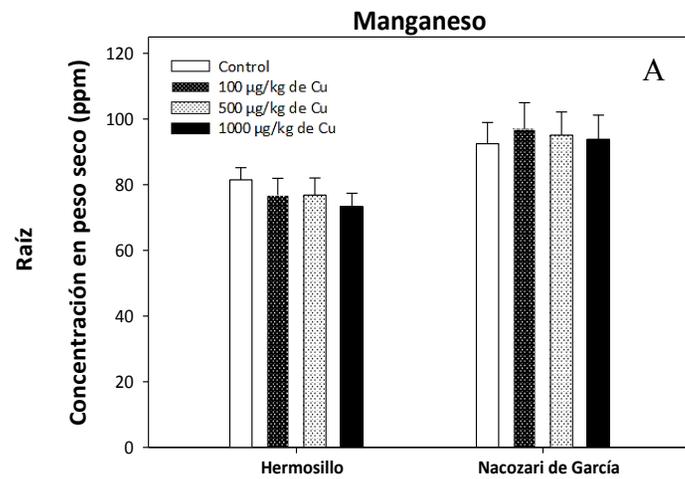


Figura 26. Proporción relativa de Mn (A y B) y K (C y D) en raíces y en hojas de *B. sarothroides* con 90 días de vida. N= 10, las barras representan el EE.

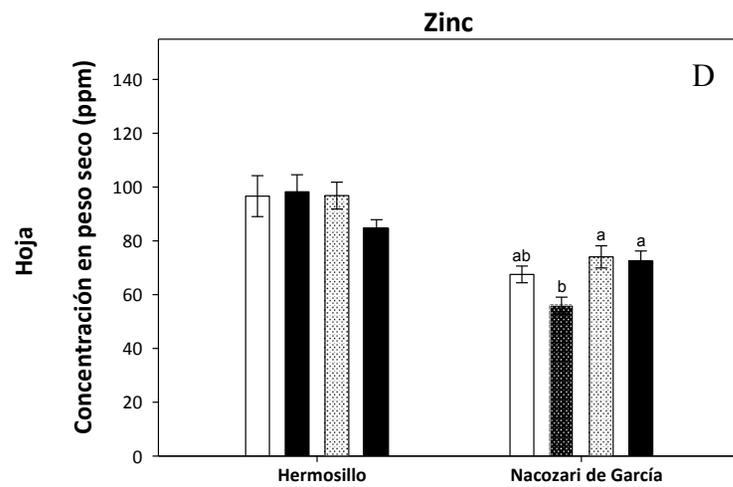
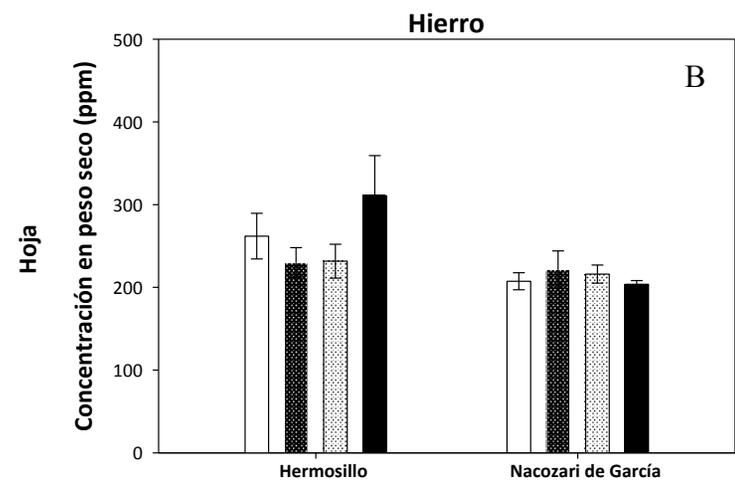
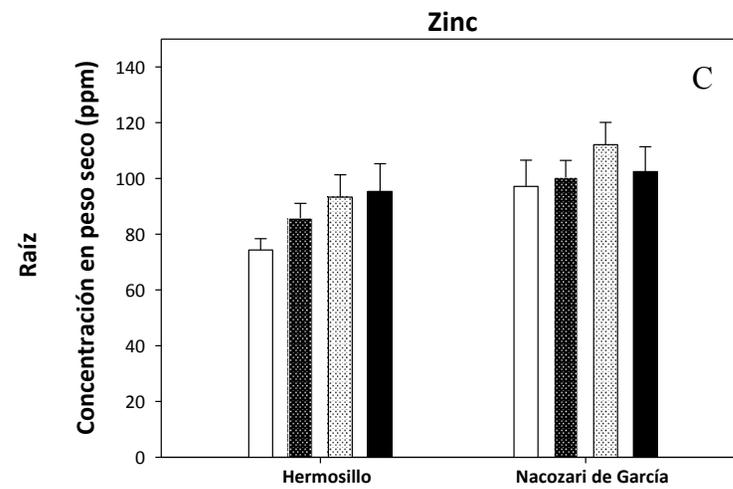
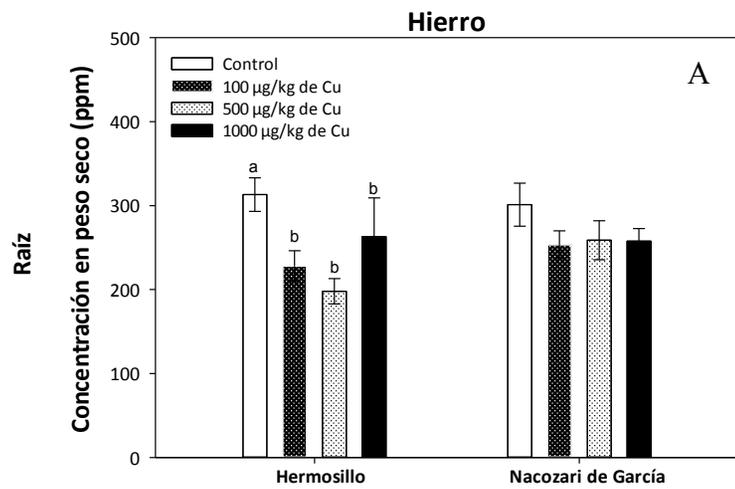


Figura 27. Proporción relativa de Fe (A y B) y Zn (C y D) en raíces y en hojas de *B. sarothroides* con 90 días de vida. N=10, las barras representan el EE. Las letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) (Ver pruebas estadísticas en la sección de Materiales y Métodos).

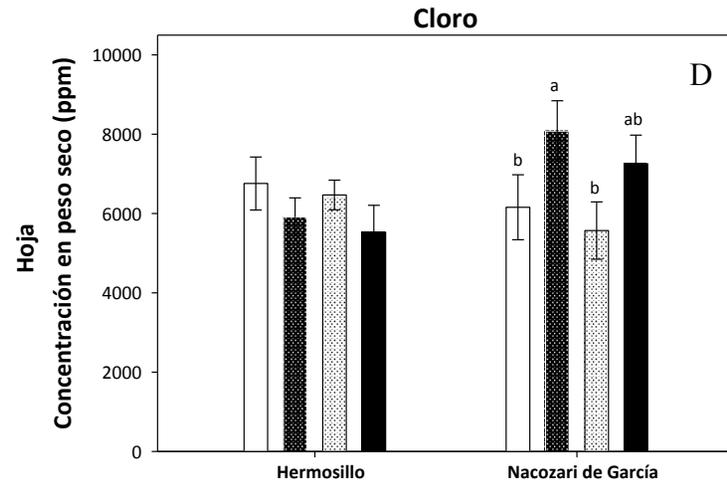
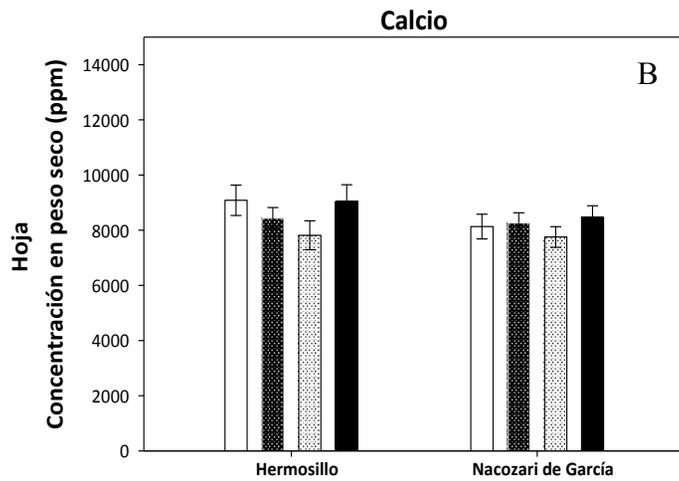
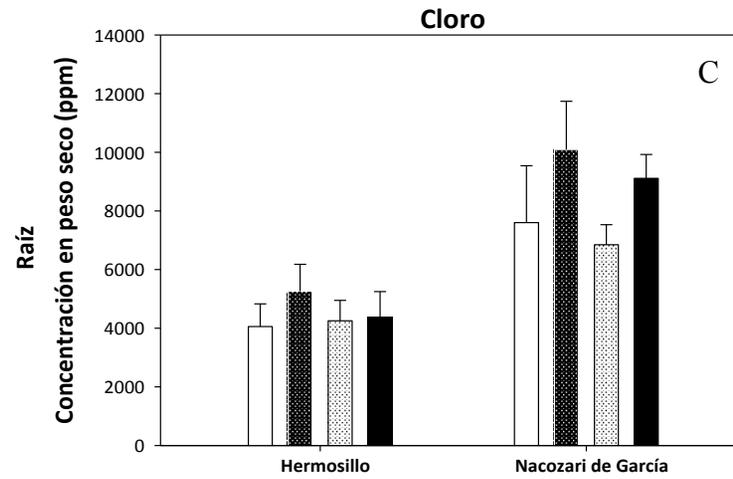
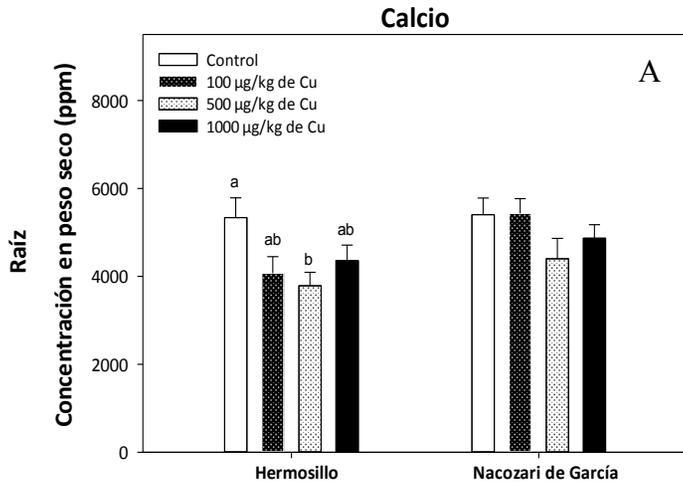


Figura 28. Proporción relativa de Ca (A y B) y Cl (C y D) en raíces y en hojas de *B. sarothroides* con 90 días de vida. N= 10, las barras representan el EE. Las letras representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) (Ver pruebas estadísticas en la sección de Materiales y Métodos).

7. Discusión

A continuación se presenta el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la concentración de Cobre (Cu) en varios aspectos del desempeño fisiológico de *B. sarothroides* de dos poblaciones provenientes de un sitio contaminado (Nacozari) y un sitio no-contaminado (Hermosillo), esto para probar su umbral de tolerancia al metal y además evaluar su capacidad intrínseca como especie de tolerar el Cu a través de la comparación de ambas poblaciones.

Diferencias en tamaño de las semillas y efecto del Cu⁺² en la biomasa seca de plántulas de 4 días de *B. sarothroides*

Con respecto a la diferencia en tamaño de las semillas de *B. sarothroides*, en el presente estudio se mostró que las semillas de la población de Hermosillo tuvieron una mayor área y peso que las semillas de la población de Nacozari de García. Dicha diferencia, podría estar determinada por las condiciones bióticas y abióticas de la planta madre para ambos sitios. Ginwal *et al.* (2005) reportan que en las plantas pueden existir variaciones en las semillas en una especie debido a las condiciones fisiológicas de la planta madre, estas diferencias se observan a nivel morfológico (color, tamaño y peso) o en la germinación de las semillas.

En este experimento los resultados obtenidos indican que las diferencias significativas en el peso y tamaño de las semillas, entre ambas poblaciones de *B. sarothroides* (Figura 14), no repercutieron en la tolerancia al Cu en las plántulas tratadas bajo las concentraciones de 0, 0.4, 2, 4, 10, 50 y 100 μM de Cu.

Cabe señalar, que estas concentraciones se consideran tóxicas para cualquier otra planta no tolerante a este metal, y que de ser el caso, pudieron causar en *B. sarothroides* una menor asignación de biomasa en las plántulas con el aumento de Cu en el sustrato (Tabla 6) (Raven *et al.*, 1992; Yruela, 2005). Sin embargo, lo que se observó es que *B. sarothroides* posee de manera intrínseca la capacidad de tolerar el Cu a nivel de plántula.

Xue *et al.* (2005) observaron esta misma respuesta en dos poblaciones de *Phytolacca acinosa* Roxb. de un sitio contaminado con Mn y de un sitio no contaminado, donde ambas poblaciones de plántulas sembradas en condiciones de invernadero tuvieron la misma respuesta de tolerancia a la aplicación de 5, 1,000, 2,000, 5,000 y 8,000 mol/L de Mn, sugiriendo mecanismos de hiperacumulación del Mn como una propiedad constitutiva de la especie.

Asimismo, en el presente trabajo, no se encontraron diferencias en la biomasa de las plántulas de *B. sarothroides* para ambas poblaciones por el incremento de Cu con respecto al control. No obstante, en la Figura 16 se muestra que las plántulas de la población de Hermosillo bajo los tratamientos con 10 y 50 μ M de Cu presentaron un estímulo en el crecimiento que se ve reflejado en la biomasa seca, teniendo respectivamente, un 36 y 23 % más de biomasa que las plántulas del control.

De la misma forma, en las plántulas de la población de Nacozari de García se observó que los tratamientos 2, 4, 10, 50 y 100 μ M de Cu la biomasa era 41, 80, 87, 45 y 62 % mayor que el control, respectivamente. Este proceso, conocido como hormesis, consiste en que a bajas concentraciones el cobre puede llegar a estimular el crecimiento, es decir, el crecimiento puede estar inducido por la baja en concentración del metal tóxico sin una respuesta negativa de las plantas (Calabrese & Baldwin, 2003).

La hormesis se trata de una respuesta adaptativa al estrés, Calabrese & Baldwin (2003) mencionan que este proceso puede darse en respuesta a un “proceso de compensación adaptativa” posterior a la interrupción de la homeostasis o el cambio en la interacción de los receptores de algunas sustancias tóxicas. Los iones metálicos pueden actuar como elicitores de una respuesta de defensa que repercute en el estímulo del crecimiento de las plantas, particularmente bajo condiciones de estrés.

Por último, es importante mencionar que aún falta conocer los mecanismos moleculares responsables del estímulo del crecimiento para muchas especies, y en particular de especies reportadas como plantas tolerantes al Cu como *B. sarothroides* (Haque *et al.*, 2008).

Efecto del exceso de Cu²⁺ en el crecimiento, la fotoquímica primaria y en la acumulación del Cu en hojas y raíces de *B. sarothroides*

Con respecto al umbral de tolerancia por Cu en *B. sarothroides*, en este experimento no se observaron efectos adversos en el crecimiento de las plantas de 30 días de edad para la población de Hermosillo y de Nacozari de García, tratadas con las diferentes concentraciones de Cu (100, 500 y 1000 µg/kg).

Por tal razón, no se pudo observar un umbral de tolerancia en *B. sarothroides* mismo que ha sido reportado en diferentes estudios donde las plantas tolerantes a los metales pesados también muestran un rango de tolerancia, sobre todo en aquellas plantas que tienen como mecanismo la exclusión de los metales pesados a través de ácidos orgánicos (Ernst, 2006; Bibi & Hussain, 2005), y en las que se observa efectos de tolerancia-fitotoxicidad que resultan en la disminución de la biomasa (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013).

Por otra parte, Pérez (2013) reporta que las plántulas de *B. sarothroides* provenientes de dos sitio contaminados (La Caridad y Nacozari de García) y un sitio no contaminado (Hermosillo) por Cu en el estado de Sonora, no presentan efectos inhibitorios en el crecimiento bajo concentraciones de 100, 250, 500 y 1,000 µM de Cu, sin embargo, observó una disminución significativa en el peso seco de las plántulas tratadas con Cu con respecto al control de la población de La Caridad y de Hermosillo, pero no de las plantas provenientes de Nacozari de García.

Referente a la biomasa seca de las plantas en el presente trabajo, se observó que ambas poblaciones de plantas no presentaron diferencias significativas por el incremento del Cu en el medio, sin embargo, la población de Nacozari de García presentó una menor asignación de biomasa seca, lo que sugiere que la diferencia observada puede tener origen desde el sitio de donde provienen las semillas. Tal como lo reporta Haque *et al.* (2009), quienes observaron en plantas tolerantes al Cu una respuesta diferencial al metal como resultado de una fuerte presión de selección, ejercida por el exceso del metal disponible para las plantas de los suelos

contaminados por minería de Cu. Estos autores reportaron que en las plantas del mezquite (*Prosopis* sp.), provenientes de semillas de un sitio contaminado por minería de Cu y de semillas comerciales, fueron capaces de crecer en concentraciones de 0.1, 5 y 10 mg/L de Cu, independientemente de la procedencia de las semillas. Además, demostraron que las semillas provenientes del sitio contaminado toleraron concentraciones mayores de Cu (5 y 10 mg/L) que las semillas provenientes de semillas comerciales, las cuales murieron en un 90 % bajo estas concentraciones.

Por otro lado, en los parámetros de crecimiento evaluados en las plantas de *B. sarothroides* tratadas con las diferentes concentraciones de Cu, no se observaron diferencias significativas como consecuencia del incremento del metal. Pese a ello, ambas poblaciones mostraron diferencias significativas entre ellas en los parámetros LAR (Tasa de Área Foliar) y LWR (Proporción de Peso Foliar), donde se observó que la población de Nacozari de García tuvo una menor superficie fotosintética, una menor producción de hojas y una menor área foliar (Figura 20 y 21).

En cuanto al parámetro morfológico SLA (Área Foliar Específica) y el área foliar se observó que la población de Nacozari presentó un mayor grosor en las hojas y una menor área foliar, que las plantas de la población de Hermosillo. Resultado contrario, las plantas de la población de Hermosillo mostraron una mayor biomasa seca de hojas. Dicho resultado concuerda con lo reportado por Fonseca *et al.* (2000) quienes reportan que las hojas con valores bajos de SLA tienen hojas más gruesas y con menor área foliar, es decir, con una mayor concentración de cloroplastos y enzimas fotosintéticas por unidad de área foliar, por lo tanto, poseen una mayor capacidad fotosintética pero una menor captación de luz por unidad de biomasa. En contraste hojas con mayor SLA y área foliar tienen una mayor tasa de respiración y una menor tasa fotosintética.

Este crecimiento aparentemente menor de los órganos fotosintéticos en la población de Nacozari de García se vio reflejado en una mayor eficiencia fotosintética, comparando las plantas de los tratamientos con las plantas del control.

Respecto a la eficiencia fotosintética, la F_v/F_m (Producción Cuántica Máxima de la Fotoquímica Primaria) y el PI_{ABS} (Índice de Desempeño Fotosintético) de ambas poblaciones de plantas de *B. sarothroides*, no se observó ningún efecto adverso por el incremento del Cu en la fotoquímica primaria del *PSII* (Figura 23). Cabe señalar que ambas poblaciones presentaron fluctuaciones en la eficiencia fotosintética, que si bien no fueron significativas, estos cambios son propios de los ajustes metabólicos en el crecimiento de las plantas y no por el incremento del metal. Sin embargo, lo reportado por Maksymiec & Bazynski (1998) en plantas de frijol (*Phaseolus coccineus* L.) indica que las plantas expuestas a altas concentraciones de Cu en etapas de crecimiento de intermedio a avanzado no presentan diferencias en la fotoquímica primaria, en cambio, para etapas de crecimiento de hojas avanzado el aparato fotosintético de las plantas del frijol era considerablemente más sensible al exceso de Cu. Es decir, los aparatos fotosintéticos en la fase de crecimiento inicial presentan una alta estabilidad la cual se pierde a lo largo del crecimiento de las plantas, como consecuencia disminuye la actividad del aparato fotosintético, por lo tanto, las plantas se vuelven más sensibles a la unión del Cu a los sitios funcionales de proteínas. Esto, finalmente, genera un desequilibrio en el transporte de electrones que conlleva a una posible inhibición del Ciclo de Calvin de la fotosíntesis.

En conclusión, con referencia a los resultados obtenidos en la fotoquímica primaria de *B. sarothroides*, se tiene que las plantas de esta especie poseen la maquinaria necesaria para tolerar altas concentraciones de Cu. También se puede observar que la progenie derivada de los individuos de *B. sarothroides* que crecen naturalmente en sitios contaminados por minería de Cu tienen una respuesta más rápida a la presencia del exceso de Cu en la fotoquímica primaria, debido probablemente a que esta tolerancia es de carácter hereditario. Tal como hace mención Nielsen *et al.* (2003) en un estudio comparativo, donde reporta que las poblaciones de algas de la especie *Fucus serratus* L. expuestas naturalmente a concentraciones elevadas de Cu respondieron más eficientemente en su fotoquímica primaria (F_v/F_m) que las poblaciones de *F. serratus* donde el Cu presente en el medio era menor. Este evento se lo atribuyen a que la tolerancia al Cu es un factor hereditario y se basa, por lo menos en esta especie, en limitar el paso del metal al tejido del alga.

Respecto a la variabilidad genética de plantas tolerantes a metales pesados, Nordal *et al.* (1999) mediante el análisis comparativo de polimorfismos de las isoenzimas obtuvieron que las plantas de *Lychnis alpina* L. de un sitio contaminado por minería de Cu presentaron menor variabilidad genética, en contraste a las plantas de la población del sitio no contaminado. Los autores mencionan que la presencia del metal en los sitios contaminados es una fuerza selectiva de ecotipos tolerantes, y que estas diferencias vistas en esta y otras especies pueden deberse al tamaño efectivo de las poblaciones, el sistema de apareamiento y el flujo de genes.

En este panorama, los resultados del presente trabajo indican que ambas poblaciones de *B. sarothroides* presentaron ajustes metabólicos y toleraron altas concentraciones de Cu gracias a mecanismos de tolerancia relacionados con la acumulación del metal en tejido.

Haque *et al.* (2008) reportaron a *B. sarothroides* como una planta hiperacumuladora de Cu, a través del estudio del tejido de hojas y raíces extraídos de individuos adultos de un sitio contaminado por minería de Cu. Ellos determinaron que la concentración final en las raíces y en las hojas del Cu era de 818.3 y 1214.1 mg/kg, respectivamente.

Finalmente, en el presente estudio se corroboró la acumulación del Cu en hojas y raíces través del análisis de fluorescencia de Rayos-X. Este análisis reveló que el Cu a pesar de ser también acumulado en las hojas, se concentra mayoritariamente en las raíces. De tal manera, las plantas de *B. sarothroides* limitan efectivamente el transporte del Cu a las hojas. Cabe recalcar que las concentraciones de Cu detectadas en este experimento son mayores a las reportadas para muchas plantas, el cual varía entre 4-30 ppm (Raven *et al.*, 1992), sin embargo, la concentración fue mucho menor (en raíces 73-153 ppm; en hojas 9-18 ppm) a la concentración mínima característica de una planta hiperacumuladora (1000 mg/kg de Cu) (Haque *et al.*, 2008) (Anexo III). Existen evidencias de que la tasa de transpiración afecta la asimilación de los nutrientes dada la humedad relativa en el medio, tal como se vio en este experimento (Raven *et al.*, 1992).

Los resultados indican que las plantas de ambas poblaciones de *B. sarothroides* tuvieron un desplazamiento eficiente del Cu a las hojas, con respecto al control, a pesar de que el metal estaba

siendo retenido en la raíz, probablemente en el apoplasto y en la pared celular, tal como se ha reportado para otras especies de plantas (Ouzounidou *et al.*, 1992; Wójcik & Tukiendorf, 2005; Alaoui-Sossé *et al.* 2004).

Ke *et al.* (2007) reportan que las interacciones del Cu con otros elementos minerales son muy complejas, y se esperaría que a una mayor translocación del Cu se presente una disminución de ciertos nutrientes, como el Zn, Ca, Mn y el Fe. A pesar de ello, Ernst *et al.* (2008) reportan que en plantas como *Vitis vinífera* L. el incremento del Cu tisular no afectó de manera significativa las concentraciones de nutrientes, como el N, P, S, Ca, Fe, K, Mg y Na, cuando el Cu se añadió a una concentración de 587 mg/L. Sin embargo, también observaron que a una concentración de 1,500 mg/L de Cu, en la raíz causa el aumento del S, esto como consecuencia del aumento en la síntesis de compuestos ricos en S involucrados en la tolerancia al metal, como: glucosinolatos, metalotioneínas y fitoquelatinas. Por último, Tyler (1976) observó que una reducción del P en la planta, que relacionaron con la inhibición de la actividad de la fosfatasa por el exceso de Cu, provocó una disminución en la disponibilidad del nutriente.

En el presente trabajo, los resultados mostraron que la población de Hermosillo tuvo una mayor área fotosintética, sin embargo, esto no resultó en una mayor translocación del Cu a las hojas en comparación con la población de Nacozari. Contrario a este resultado, en el tejido seco de la raíz la población de Nacozari mostró una mayor concentración del metal que las plantas de la población de Hermosillo.

Respecto a este cambio de concentración del Cu en las hojas y en la raíz para ambas poblaciones no se reflejó en efectos adversos en la homeostasis de alguno de los microelementos evaluados en este experimento.

A nivel del tejido seco de hoja, los minerales P, S, Mn, K, Fe y Ca no mostraron diferencias significativas por el incremento del Cu en el sustrato, sin embargo, el Zn y el Cl si mostraron diferencias. En cuanto a la diferencia entre poblaciones en el tejido seco de la hoja, la población

de Nacozari mostró una mayor concentración de P y Mn, y la población de Hermosillo mostró una mayor concentración de Fe y Zn.

A nivel del tejido seco de la raíz, los minerales P, S, Mn, K, Zn y Cl no mostraron diferencias significativas por el incremento del Cu en el sustrato, sin embargo, el Fe y el Ca si mostraron diferencias. En cuanto a la diferencia entre poblaciones en el tejido seco de la raíz, la población de Nacozari mostró una mayor concentración de P, Mn, Z, Ca y Cl, y la población de Hermosillo mostró una mayor concentración de S.

El efecto del Cu en el balance de nutrientes minerales fue diferente en los órganos (hojas y raíces) y para ambas poblaciones. En las hojas el incremento del Cu en el tejido seco produjo en la población de Nacozari un incremento en Zn y Cl. En las raíces, con el aumento del Cu se produjo un decremento de Fe y Ca.

De acuerdo a lo reportado por Domínguez-Solis *et al.* (2001) la compartimentalización del Cu dentro del tejido seco de las plantas funciona como neutralizador del efecto tóxico del metal que podría derivar en la modificación de la homeostasis en algunos nutrientes minerales como el S. En este experimento, como se pudo observar en el tejido seco de las plantas de *B. sarothroides* el incremento de Cu no afecto la concentración de este mineral.

Lequeux *et al.* (2010) reportaron que las plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con Cu presentan una inesperada acumulación de Zn en las raíces, ya que las vías de adquisición del Zn y el Cu se encuentran relacionadas, a pesar de, esto podría ser parcial. Esto concuerda con los resultados obtenidos en *B. sarothroides* para ambas poblaciones, donde se pudo observar que en algunos tratamientos hubo un aumento en la concentración del Zn en relación al aumento del Cu dentro de tejido de hojas.

En cuanto a la concentración de Ca y Mn tampoco se observaron efectos adversos por el incremento de Cu en el sustrato. Esto indica, una vez más, que el Cu es neutralizado a nivel de tejido. Este hecho es evidente ya que en diversos estudios se ha reportado en plantas no tolerantes al Cu, como son *Vitis vinifera* L. y de *Spinacia oleracea* L. (Han & Sakae., 1993; Llorens *et al.*,

2000), que el Ca y el Mn están involucrados en la actividad fotosintética y en el mantenimiento estructural del aparato fotosintético (Homann, 2002). Otros trabajos ya han demostrado que las concentraciones externas de Cu mayores a 20 mg/L inhiben los procesos de la fotosíntesis en las plantas de *Vigna mungo* L. (Bibi & Hussain, 2005) y de *Hordeum vulgare* L. (Vassilev *et al.*, 2002).

Por lo anterior, cabe señalar que la concentración de Mn y Zn entre poblaciones mostraron diferencias significativas tanto en el tejido seco de las hojas como de las raíces, donde la población de Nacozari presentó una mayor concentración de Mn en hoja y raíz, sin embargo, la población de Hermosillo presentó una mayor concentración de Zn en hoja y una menor concentración en raíz con respecto a la población de Nacozari. En este sentido, se ha encontrado que las variaciones de minerales como S, Mg, Fe y Zn varían dependiendo de la especie de planta (Ke *et al.*, 2007). Shiavon *et al.* (2007), encontraron que las plantas con mayor tolerancia al Cu mostraban una menor reducción en el contenido de S, Fe y Mn, lo que sugiere que la tolerancia al Cu puede estar correlacionada con el mantenimiento de la homeostasis de nutrientes.

Referente a la concentración de Fe en el tejido seco de la hoja y la raíz, en este trabajo no se mostró diferencias aparentes por el incremento del Cu en el sustrato. De acuerdo con Lequeux *et al.*, 2010, cuando se presentan síntomas de toxicidad el Cu actúa como antagonista en la absorción de Fe, esto se ve reflejado en una clorosis intervenal, el cual es un síntoma típico de una deficiencia de hierro (Taylor & Foy, 1985).

Por último, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en los parámetros de crecimiento se demostró que *B. sarothroides* a nivel de planta joven tiene mayor asignación de biomasa a los órganos aéreos, principalmente a las hojas. De igual manera, ambas poblaciones de plantas tuvieron la capacidad de tolerar el incremento del Cu (con concentraciones de 100, 500 y 1000 µg/kg). Sin embargo, ambas poblaciones de *B. sarothroides* presentaron diferencias en el crecimiento de los órganos fotosintéticos, donde las hojas de la población del sitio contaminado (Nacozari) tuvieron una menor producción de biomasa, una menor área foliar y una mayor densidad o grosor. Dichas diferencias repercutieron en el parámetro fisiológico NAR y los

valores de F_v/F_m y PI_{ABS} donde las plantas de Nacozari de García tuvieron una respuesta más eficiente en la fotosíntesis.

Se observó que las plantas de ambas poblaciones presentaron variaciones durante el tiempo en la eficiencia fotosintética, producto del aumento en tamaño de las hojas que conlleva a ajustes metabólicos. Las plantas de *B. sarothroides* mostraron un aumento en la concentración del Cu en el tejido de hojas y raíces como consecuencia del incremento del Cu en el medio. Ambas poblaciones tuvieron una mayor concentración de este metal en las raíces. La población de Nacozari tuvo una mayor concentración de Cu en la raíz que la población de Hermosillo. Posiblemente porque el balance de este metal depende de la demanda nutrimental de los órganos aéreos, es decir, cuando se posee una mayor área fotosintética hay una mayor translocación de minerales esenciales.

La tolerancia de *B. sarothroides* al Cu no depende del sitio de origen de las plantas (sitio contaminado y sitio no-contaminado) sino a características constitutivas que le permiten a esta especie tolerar altas concentraciones de Cu dentro y fuera de los tejidos sin efectos adversos bajo las concentraciones aquí aplicadas.

8. Conclusiones

- Este trabajo es el primero en evaluar la respuesta de tolerancia de *Baccharis sarothroides* al Cu, proveniente de dos sitios en el estado de Sonora [Hermosillo (sitio no-contaminado) y Nacozari de García (sitio contaminado por Cu)], a nivel de plántula y de planta joven. Se evaluó la tolerancia de las plantas a través de un análisis integral en el crecimiento, la eficiencia fotosintética y la acumulación del Cu en el tejido de hojas y raíces.
- Las semillas de *B. sarothroides* provenientes de la población de Hermosillo fueron significativamente más grandes que las semillas de la población de Nacozari de García. Lo cual sugiere un cambio morfológico, en peso y tamaño de las semillas, determinado por las condiciones bióticas y abióticas de las plantas madre, de ambas poblaciones.

- La diferencia en el tamaño de la semilla de ambas poblaciones no repercutió en su tolerancia al Cu a nivel de plántula, no obstante se pudo observar que las plántulas de la población de Nacozari de García tuvieron una mayor asignación de biomasa que las plántulas de la población de Hermosillo.
- A nivel de planta joven no se detectaron diferencias significativas entre las poblaciones en el crecimiento y eficiencia fotosintética con el incremento del Cu. Dicho resultado sugiere que la tolerancia de *B. sarothroides* no depende del sitio de origen de las plantas sino de características constitutivas de la especie, que les permitió a ambas poblaciones tolerar altas concentraciones de Cu dentro y fuera de los tejidos sin presentar efectos adversos.
- Las plantas de ambas poblaciones de *B. sarothroides* tuvieron diferencias significativas en el crecimiento de los órganos fotosintéticos, donde las hojas de la población de Nacozari de García tuvieron una menor producción de biomasa, una menor área foliar y una mayor densidad o grosor de hojas. Dichas diferencias repercutieron en el parámetro fisiológico NAR y los valores de F_v/F_m y PI_{ABS} donde las plantas de Nacozari de García tuvieron una respuesta más eficiente en la fotosíntesis.
- Los órganos fotosintéticos en la población de Nacozari de García fueron de menor tamaño y esto se vio reflejado en una mayor eficiencia fotosintética y un mejor balance de los nutrientes minerales en hojas y raíz.
- Las plantas de ambas poblaciones presentaron variaciones durante el tiempo en la eficiencia fotosintética, producto del aumento en tamaño de las hojas.
- Las plantas mostraron un aumento en la concentración del Cu en el tejido de hojas y raíces como consecuencia del incremento del Cu en el medio, siendo significativamente mayor la concentración de Cu en la raíz. Ambas poblaciones tuvieron una mayor concentración de este metal en las raíces. La población de Nacozari tuvo una mayor concentración de Cu en la raíz que la de Hermosillo.
- En la asimilación y asignación de nutrientes minerales no se observó un desbalance que afectara la tasa de crecimiento para ambas poblaciones, lo que indica un ajuste metabólico eficiente en *B. sarothroides* en ambas poblaciones.

9. Perspectivas

- Las diferencias en peso y tamaño que se observaron en las semillas no repercutieron en la tolerancia al Cu de las plantas de *B. sarothroides* provenientes de un sitio contaminado (Nacozari de García) y el sitio no-contaminado (Hermosillo). No obstante, sería sustancial reconocer el papel de los cambios frecuentes en ambos sitios en la humedad, cantidad de luz, disponibilidad de agua y disponibilidad de ciertos nutrientes que pudieran modificar los ajustes metabólicos y de tolerancia al Cu de esta especie. Por lo tanto, si efectivamente las plantas de ambos sitios de *B. sarothroides* no presentan diferencias significativas ante el incremento del Cu, se podría complementar estos resultados con experimentos en invernadero, en campo y/o en experimentos recíprocos con suelo contaminado y no-contaminado.
- Debido a que en el análisis de biomasa seca en plántulas de *B. sarothroides* no se observaron síntomas de toxicidad por el incremento del Cu (0, 0.4, 2, 4, 10, 50 y 100 μM), sería conveniente probar concentraciones superiores para obtener la gráfica de dosis-respuesta para esta especie, y así conocer su umbral de tolerancia.
- La medición de la eficiencia fotosintética *in situ* fue una herramienta conveniente para el estudio de las alteraciones funcionales de *B. sarothroides* en condiciones controladas, y podría complementarse con la medición de la eficiencia fotosintética en invernadero y/o en campo con el mismo sistema, el cual permite detectar el estrés por Cu en diferentes tiempos sin el riesgo de comprometer el tejido de las plantas.
- También sería útil complementar la eficiencia de la fotosíntesis con estudios de la asimilación neta de CO_2 en las hojas a diferentes tiempos, para detectar diferencias en las propiedades fotosintéticas de las hojas.
- En este estudio se registró que el Cu fue acumulado en los tejidos de las plantas pero no se analizó la movilización del metal en los diferentes tejidos, por esta razón se podrían utilizar técnicas histológicas en estudios posteriores para saber más acerca del comportamiento de este ión metálico dentro de las células de los diferentes tejidos.
- Determinar el balance nutrimental de los elementos esenciales en los tejidos vegetales de *B. sarothroides* a diferentes edades podría ser de utilidad para conocer los cambios en la

asignación de nutrientes durante su crecimiento vegetativo y observar el efecto del Cu sobre dicho balance, bajo condiciones controladas y/o en campo.

- Se podría probar de qué manera el componente genético, la contaminación del metal pesado, y las condiciones ajenas a la historia de contaminación del suelo (como la influencia de la luz, el clima y la disponibilidad de nutrientes) están afectando la respuesta bioquímica y fisiológica de *B. sarothroides* en las plantas de un sitio contaminado con Cu y un ambiente no-contaminado.
- En este estudio se observó que *B. sarothroides* (especie nativa de un sitio-contaminado por Cu y un sitio no-contaminado) tiene la capacidad de tolerar altas concentraciones de Cu en dos de sus etapas de crecimiento (plántula y planta joven) independientemente de la fuente del germoplasma. Es decir, las plantas de *B. sarothroides* tienen un gran potencial para su utilización en proyectos de restauración de suelos mineros contaminados por Cu en el estado de Sonora, México.

10. Bibliografía

Adriaensen K, Van der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2004. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytol.* 161: 549-555.

Adriano DC. 2001. Copper. En: Adriano DC. Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. Ed. 2. Berlin: Springer-Verlag. p. 500-539.

Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint ML, Epron D, Badot PM. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant. Sci.* 166: 1213-1218.

Alloway BJ. 1995. *Heavy metals in soils*. Ed. 2. Blackie Academic, Professional. Londres. p. 368.

Andrés CN. 2008. *Caracterización de transportadores de cobre en Arabidopsis thaliana: Efectos de la alteración de su expresión en plantas transgénicas*. Doctorado en Bioquímica. Universitat de Valencia. España. p. 211.

Araya M, Olivares MG, Pizarro F. 2008. El contexto del Cobre en el mundo. En: Sierralta HW (Ed.). *El Cobre y nuestra vida*. Chile. pp. 61-64.

Ariyakanon N, Winaipanich B. 2006. Phytoremediation of copper contaminated soil by *Brassica juncea* (L.) Czern and *Bidens alba* (L.) DC. Var. *radiata*. *J. Sci, Res. Chula. Univ.* 31: 49-56.

Austin FD. 2010. *Boboquivari mountain plants: Identification, Ecology and Ethnobotany*. The University of Arizona Press. Arizona. USA. p. 333.

Baker A, Walker P. 1989. Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant. En: *Heavy metal Tolerance in Plants*. Evolutionary Aspects. pp. 155-177.

Baker A, McGrath SP, Reeves DR, Smith AC. 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of ecology and physiology of Biological Resorce for Phytoremediation of metal-polluted soils. En

Terry N, Bañuelos G. (Eds.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC. Florida, USA. pp. 94-116.

Baker A, Erns W, Ent V, Malaisse F, Ginocchio R. 2010. Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America. En Batty L, Hallberg K. (Eds.). *Ecology of Industrial Pollution. British Ecological Society*. Cambridge. Cambridge University Press, UK. pp. 7-40.

Baumbach H. 2012. Metallophytes and metallicolous vegetation: evolutionary aspects, taxonomic changes and conservational status in central Europe. En: Tiefenbacher J. (Ed.) *Perspectives on Nature Conservation - Patterns, Pressures and Prospects*. InTech Europe. Croacia. pp. 93-118.

Bech J, Poschenrieder C, Barceló J, Lansac, A. 2002. Plants from Mine Spoils in the South American Area as Potential Sources of Germplasm for Phytoremediation Technologies. *Acta. Biochnol.* 22: 1-11.

Bentz JL. 2013. *Plant growth, metal uptake, and soil interactions of the heavy metal hyperaccumulator Pelargonium sp. 'frensham' and the heavy metal excluders Silene vulgaris and Agrostis capillaris grown in smelter-impacted soils*. Maestría en Ciencias. University of Saskatchewan, Canadá. 101 p.

Bibi M, Hussain M. 2005. Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigment in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper], *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 1126-1133.

Blissett AH. 1966. Copper-tolerant plants from the Upakaringa Copper Mine, Williamstown: Quarterly Geological Notes. *Geol. Surv. SA.* 18: 1-4.

Bowie S, Thornton N. 1985. Environmental Geochemistry and Health: Report to the Royal Society's British National Committee for Problems of the Environment. *Kluwer Academic Publ.*, Hingham. MA. Disponible en: www.ehu.es/sem/macla_pdf/macla10/Macla10_48.pdf

Britton LN, Brown A. 1913. Flora and plants. En: Britton LN, Brown A. (Eds.). An Illustrated Flora of the Northern United States, Canada and the British Possessions. Vol. 3. Ed. 2. New York: Charles Scribner's Sons. Disponible en: p. 95.

Brooks RR, Naidu SD, Malaisse F, Lee J. 1987. The elemental content of metallophytes from the copper/cobalt deposits of Central Africa. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 119: 179-191.

Brooks RR, Lee J, Reeves RD, Jaffre T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *J. Geochem. Explor.* 7: 49-57.

Brooks RR., Morrison RS, Reeves RD, Malaisse F. 1978. Copper and cobalt in african species of *Aeolanthus* Mart. (Plectranthinae, Labiatae). *Plant. Soil.* 50: 503-507.

Brooks RR, Reeves RD, Morrison RS, Malaisse F. 1980. Hyperaccumulation of copper and cobalt: A review. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 113: 166-172.

Brun LA, Maillet J, Hinsinger P, Pépin M. 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soil. *Environ. Pollut.* 11: 293-302.

Bunning S, McDonagh J, Rioux J. 2011. Land Degradation and SLM typologies. En: Woodfine A. (Ed.). *Land Degradation Assessment in Drylands project (LADA)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma. Italia. pp. 31-41

Calabrese EJ, Baldwin LA. 2003. The Hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.* 71: 246-250.

Campbell C, Coull M, Copper. Shand C. 2011. Trace elements: Copper. En: Campbell C, Coull M, Copper. Shand C (Eds.). *Geochemical Atlas for Scottish Topsoils*. The Macaulay Land Use Reserach Institute. Scottish. pp. 1-43.

Carrier P, Baryla A, Havaux M. 2003. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta.* 216: 939-950.

Carrillo GR, González-Chávez M.C.A. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ. Pollut.* 144: 84-92.

Chandra R, Bhargava RN, Yadav S, Mohan D. 2009. Accumulation and distribution of toxic metals in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica compestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluent. *J. Hazard. Mater.* 162: 1514 -1521.

Cheng S. 2003. Heavy metal pollution in china: Origin, pattern and control. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10: 192-198.

Chiariello NR, Money HA, Williams K. 1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissue. En: *Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation*. Pearcy RW, Ehleringer J, Money HA, Rudel PW. (Eds.). Chapman, Hall, Londres. pp. 327-365.

Chintakovid W. Visoottiviseth P, Khokiattiwong S, Lauengsuchonkul S. 2008. Potential of the hybrid marigolds for arsenic phytoremediation and income generation of remediators in Ron Phibun District, Thailand. *Chemosphere.* 70: 1532-1537.

Choi J, Pak CH, Lee CW. 1996. Micronutrient toxicity in French marigold. *J. Plant. Nut.* 19: 901-916.

Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta.* 212: 475-486.

Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. 2002. Long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS In Plant. Sci.* 7: 309-315.

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2010. *Disponibilidad media anual de agua Subterránea*. Determinación de la Disponibilidad de agua en el acuífero 2661 Cumpas, Estado de Sonora. Diario Oficial de la Federación. México. pp. 25.

Cortinas CN. 1994. Estudios para evaluar las Tecnologías contaminantes en cinco ramas industriales. En: *Bases para una estrategia ambiental para la industria en México: Evaluación*

ambiental en cinco ramas industriales. Instituto Nacional de Ecología. SEDESOL. México. pp. 49-51.

Cuevas J, Silva S, León-Lobos P, Ginocchio R. 2013. Nurse effect and herbivory exclusion facilitate plant colonization in abandoned mine tailings storage facilities in north-central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 86: 63-74.

De la O-Villanueva M, Meza-Figueroa D, Maier R, Moreno D, Gómez-Álvarez A, Río-Salas R, Mendivil H, Montijo A. 2013. Procesos erosivos en jales de la Presa I de Nacozari de García, Sonora y su efecto en la dispersión de contaminantes. *B. Soc. Geol. Mex.* 65: 27-38.

Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Vega JM, Romero LC, Gotor C. 2001. The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* 276: 9297–9302

Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S. 2004. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol. Plantarum.* 121: 66-74.

Ernst WHO. 1974. Schwermetallvegetation der Erde. 5 Ed. Vol. 8. Stuttgart: Gustav Fischer IX. *Geobot. Sel.* p. 194.

Ernst WHO. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For. Snow Landsc. Res.* 80: 251-274.

Ernst, WHO, Krauss GJ, Verkleij, JAC, Wesenberg D. 2008. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell Environ.* 31: 123-143.

Eslava F. 2009. *Pteridium aquilinum (L.) Kuhn especie hiperacumuladora de cromo hexavalente*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.

Evans GC. 1972. *The quantitative analysis of plant growth*. Blackwell scientific publications, Oxford. UK. p. 734.

Feigl G, Kumar D, Lehotai N, Tugyi N, Molnár Á, Ordög A, Szepesi Á, gémes K, Laskay G, Erdei L, Kolbert Z. 2013. Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotox. Environ.* 94: 179-189.

Figueroa FL, Gómez I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *J. Appl. Phycol.* 13: 235-248.

Fonseca CR, Overton JM, Collins B, Westoby M. 2000. Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients. *J. Ecol.* 88: 964-977.

Freire S, Urtubey E, Guiliano D. 2007. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia.* 29: 23-38.

Gabbrielli R, Pandolfini T, Vergnano O, Palandri MR. 1990. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant Soil.* 122: 271-277.

Galán E, Romero A. 2008. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Rev. Soc. Esp. Mineral.* 10: 49-60.

Ginwal HS, Phartyal SS, Rawat PS, Srivastava RL. 2005. Seed Source Variation in Morphology, Germination and Seedling Growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. *Silvae Genet.* 54: 76-80.

Goeden RD, Teerink JA. 1996. Life history and descriptions of adults and immature stages of *Aciurina semilucida* (bates) (diptera: tephritidae) on *Chrysothamnus viscidiflorus* (hooker) nuttall in southern California. *P. Entomol. Soc. Wash.* 98: 752-766.

González MS, Perales VH, O Salcedo AM. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *REB.* 27: 119-129.

- González-Mendoza D, Zapata-Pérez O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 82: 53-61.
- Goswami SD, Talukdar AS. 2013. Copper Hyperaccumulating plants from Bark Valley, South Assam, India for phytoremediation. *Int. J. Toxicol. Pharm. Res.* 5: 30-32.
- Grandlic CJ, Palmer MW, Maier R. 2009. Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol Biochem.* 41: 1734-1740.
- Gratzfeld J. 2004. *Industrias extractivas en zonas áridas y semiáridas. Planificación y gestión ambiental.* Unión Mundial para la Naturaleza. Suiza. pp. 122.
- Ginocchio R, Carvallo G, Toro I, Bustamante E, Silva Y, Sepúlveda N. 2004. Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environ. Pollut.* 127: 343-352.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine. *Claredon Press* (Eds.), Oxford, U.K. 366: 451 p.
- Han KC, Sakae K. 1993. Different localization of two calcium in spinach oxygen-evolving photosystem II membranes: Evidence for involvement of only one calcium in oxygen evolution. *Plant Cell Physiol.* 34: 585-593.
- Hansatech Instruments Ltd (HIL). 2006. *Operations Manual. Setup, Installation, Maintenance.* Handy PEA, Pocket PEA, PEA Plus Software. England. pp. 85.
- Haque N, Peralta-Videa JR, Jones GL, Gill TE, Gardea TJ. 2008. Screening the phytoremediation potential desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. *Environ. Pollut.* 153: 362-368.

- Haque N, Peralta-Videa JR, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresdey JL. 2009. Differential effect of metal/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial seeds. *Bioresource Technol.* 100: 6177-6182.
- Harrison MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 19-42.
- Haydon MJ, Cobbett CS. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174: 499-506.
- Headrick H, Goeden R. 1993. Life History and Description of Immature Stages of *Aciurina thoracica* (Diptera: Tephritidae) on *Baccharis sarothroides* in Southern California. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 68-79.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California agricultural experiment station. *U. Calif.* 347: 1-32.
- Homann PH. 2002. Chloride and calcium in photosystem II: from effects to enigma. *Photosynth. Res.* 73: 169-175.
- Hunt R. 1990. *Basic growth analysis. Plant growth analysis for beginners*. Ed. 1. Springer-Verlag. Londres. p. 112.
- Hurtado CA, Sánchez SM, Morales J. 2001. *La minería en México. Temas selectos de Geografía en México*. UNAM. México. pp. 126.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. *Estadística de la Industria minerometalúrgica. Cifras durante Agosto de 2013*. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/ind_miner/ni-im.pdf
- Jain SK, Vasudevan P, Jha NK. 1990. *Azolla pinnata* R. Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Wat. Res.* 24: 177-183.

Jardín Botánico Nacional Viña del Mar, Chile. 2010. Semillas de plantas nativas y endémicas de Chile: *Baccharis linearis* (Ruiz & Pav.) Pers. Disponible en: <http://www.flickr.com/photos/fjbn/4573165655/in/set-72157623792387478/>

Jiang W, Liu D, Li H. 2000. Effects of Cu²⁺ on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Tot. Environ.* 256, 59-65.

Karley AJ, Leigh RA, Sanders D. 2000. Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *TRENDS In Plant Sci.* 5: 465-470.

Karrfalt RP, Olson DF. 2008. *Baccharis* L. Asteraceae- Aster family. The woody plant seed manual. *Gov. Print. Off. EUA.* pp. 291-293.

Kautsky H, Appel W, Amann H. 1960. Chlorophyll fluorescenz und kohlenstoffassimilation. *Biochem. Z.* 322: 277-293.

Ke W, Xiong Z, Xie M. 2007. Accumulation, subcellular localization and ecophysiological responses to copper stress in two *Daucus carota* L. populations. *Plant Soil.* 292: 291-304.

Kidd P, Barceló J, Bernar MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R, Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 67: 243-259.

Kinraide TB, Parker DR, Zobel RW. 2005. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *J. Exp. Bot.* 56: 1853-1865.

Kupchan M, Bauerschmidt E. 1971. Cytotoxic flavonols from *Baccharis sarothroides*. *Phytochem.* 10: 664-666.

Larcher W. 2003. Plant Under stress. En *Physiological Plant Ecology*, Ed. 4. Springer-Verlag. Berlin. pp 345-452.

Lavoisier S. E. 2006. Metales pesados en la Laguna Yalahu. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D. F.

Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N. 2010. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 673-682.

Lin J, Jiang W, Liu D. 2003. Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bioresource Technol.* 86: 151-155.

Liu J, Xiung Z, Li T, Huang H. 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. *Environ. Exp. Bot.* 52: 43-51.

Llorens N, Arola L, Blade C, Mas A. 2000. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue-cultured *Vitis vinifera*. *Plant Sci.* 160: 159-163.

Macnair MR, Tilstone GH, Smith SE. 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. En: Terry N, Bañuelos G. (Eds.). Phytoremediation of contaminated soil and water. *CRC Press L.L.C*, pp. 235–250.

Maksymiec W, Baszynski T. 1998. The role of Ca ions in changes induced by excess Cu^{2+} in bean plants. Growth parameters. *Acta Physiol. Plant.* 20: 411-417.

Maldonado BE. 2006. *Preindustrial Copper Production at the Archaeological Zone of Itziparatzico, a Tarascan Location in Michoacan, Mexico*. Doctor of Philosophy in Anthropology. The Pennsylvania State University.

Martínez AY. 2013. *Efecto del aluminio en el crecimiento relativo, tasa fotosintética y asociación con cristales de oxalato durante el ciclo de vida de Fagopyrum esculentum (Polygonaceae)*. Maestría en Biología Experimental. Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.

Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Ed. 2. Academic Press. Londres. 889 p.

- Marchiol L, Assolari S, Sacco P, Zerbi G. 2004. Phytoextraction of heavy metal by canola and radish grown on multicontaminated soil. *Environ. Pollut.* 132: 21-27.
- Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L, Cambrollé J, Peres-Martin A. 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicol. Environ.* 90- 136-142.
- Maxwell K, Johnson G. 2000. Chlorophyll fluorescence-A practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, Ferjani EEI. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Sci.*, 127: 129-137.
- Meza-Figueroa D, Maier R, De la O-Villanueva M, Gómez-Álvarez A, Moreno-Zazueta A, Rivera J, Capillo A, Grandlic CJ, Anaya R, Palafox-Reyes J. 2009. The impact of unconfined mine tailings in residential areas from a mining town in a semi-arid environment: Nacozari, Sonora, México. *Chemosphere.* 77: 140-147.
- Moustakas NK, Akoumianaki-Ioannidou A, Barouchas PE. 2011. The effects of cadmium and zinc interactions on the concentration of cadmium and zinc in pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Aust. J. Crop Sci.* 5: 277-282.
- Nian H, Yang ZM, Ahn SJ, Cheng ZJ, Matsumoto H. 2000. A comparative study on the aluminium- and copper-induced organic acid exudation from wheat roots. *Physiol. Plantarum*, 116: 328–335.
- Nielsen HD, Brownlww C, Coelho SM, Brown MT. 2003. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion Blackwell Publishing Ltd. mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist.* 160: 157-165.
- Nordal I, Borse-Haraldsen K, Ergon A, Eriksen AB. 1999. Copper resistance and genetic diversity in *Lychnis alpine* (Caryophyllaceae) populations on mining sites. *Folia Geobot.* 34: 471-481.

Odjegba VJ, Fasidi IO. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*. 13: 637-646.

Ortiz-Calderón , Alcaide O, Kao JL. 2008. Copper distribution in leaves and roots of plants growing on a copper mine-tailing storage facility in northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81: 489-499.

Oukarroum A, Schansker G, Strasser J. 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiol. Plantarum*. 137: 188-199.

Ouzounidou G, Eleftheriou EP, Karatagfis S. 1992. Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). *Can. J. Bot.* 70: 947-957.

Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 53: 299-314.

Pérez FM. 2013. *Respuesta fisiológica de Baccharis sarothroides A. Gray (Asterácea) a la toxicidad por cobre de tres localidades de Sonora*. Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Huejutla, México, Hidalgo.

Persans M, Nieman K, Salt D. 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *PNAS*. 98: 9995-10000.

Peterson PJ. 1971. Unusual accumulation of elements by plants and animals. *Sci. Prog. Oxf.* 59: 505-526.

Pippen J. 2006. *Baccharis sarothroides* A. Gray. Disponible en: <http://www.jeffpippen.com/plants/baccharis-angustifolia060923-5399ft.fisherz.jpg>

Ransom SB, Solioz M, Kreski D, Aggett P, Tar-Ching A, Crump KS, Dourson M, Haber L, Hertzberg R, Keen C, Meek B, Rudenko L, Schoeny R, Slob W, Starr T. 2007. Copper and

human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Env. Health*. 10:157–222.

Raven HP, Evert RF, Eichhorn SE. 1992. *Biología de las plantas*. Reverte. Barcelona. pp. 517-519.

Reeves RD. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. En: Morel J. L. *et al.* (Eds.). *Phytoremediation of metal-contaminated soil*. Springer-Verlag. New Zealand. pp. 25-52.

Reichman SM. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity. A Review Focusing on Copper, Manganese and Zinc. *Aust. Mineral Energy Environ. Found.* Australia. pp. 14: 54.

Rivera CJ. 2009. *Diseño geotécnico para estabilización del depósito de jales mineros (presa 1), en Nacozari de García, Sonora, México*. Maestría en Geología. Universidad de Sonora, México. 120 p.

Romero FM, Armienta MA, Gutiérrez ME, Villaseñor G. 2008. Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 24: 45-54.

Ross S. 1994. Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. En: Ross, S. M. (Ed.). *Soil Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Great Britain, John Wiley and Sons. pp. 63-152.

Rousseau RM, Willis JP, Duncan AR. 1996. Practical XRF calibration procedures for major and trace elements. En: Rousseau RM, Willis JP, Duncan AR. (Eds.). *X-Ray spectrometry*. 25: 179-189.

Ruvalcaba-Sil JL, Ramírez DM, Aguilar MV, Picazo F. 2010. SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. Wiley Interscience. *X-Ray Spectrom.* 39: 338-345.

Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Phys.* 49: 643-668.

Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L. 2003. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51: 577-587.

Sánchez VG. 2012. Mecanismo de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante Arsénico y Cobre. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Posgraduados. México. pp. 154.

Sánchez M, Serrano G, Peñuelas R, Pérez R, Sequeiros R, García C. 2007. Composición florística y estructura de la comunidad vegetal del límite del desierto de Sonora y la selva baja caducifolia (Noreste de México). *Rev. Lat. Rec. Nat.* 3: 74-83.

Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). 1994. *Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1993-1994*. Industria minera. Instituto Nacional de Ecología. México. 374 p.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2000. *Estadísticas del Medio Ambiente, México 1999*. Principales Actividades Humanas Vinculadas con el Medio Ambiente. Energía y Minería. Disponible en:

http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_ambientales/compendio/

Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal (SEMIP). 1994. *Directorio de la minería mexicana, 1994*. Consejo de Recursos Minerales. México. 365 p.

Senden MHMN, Van Paassen FJM., Van Der Meer AJGM, Wolterbeek H. 1990. Cadmium-citric acid-xylem cell wall interactions in tomato plants. *Plant Cell Environ.* 15: 71-79.

Seoánez CM. 1999. Contaminación del suelo: estudios, tratamientos y gestión. *Mundi-Prensa*. España. 352 p.

Shi GR, Cai QS. 2009. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnol. Adv.* 27: 555-561.

Shiavon M, Zhang L, Abdel-Ghany SE, Pilon M., Malagoli M, Pilon-Smits EAH. 2007. Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions Columbia, Landsberg erecta and Wassilewskija. *Physiol. Plantarum.* 129: 342-350.

Siegel FR. 2002. Geochemistry in Ecosystem Analysis of Heavy Metal Pollution. En *Environmental geochemistry of potentially toxic metals*. Springer-Verlag. p. 1-14.

Soares dos Santos F, Moura N, Sánchez S, Valdés R, Blabín I. 2009. *Mecanismos de hiperacumulación de metales pesados en plantas*. Universidad Agraria de la Habana. p. 16.

Southwest Environmental Information Network (SEINet). 2009. *Baccharis salicifolia* (Ruis & Pav.) Pers. En: Biodiversity. Museum of Northern Arizona Museum of Vertebrate Zoology, and New York Botanical Garden. Disponible en: <http://swbiodiversity.org/seinet/index.php>

Sunil K. 2011. Studies on metal tolerance un plants. *University of Pune*. India. p. 141.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: Yunus M, Pathre U, Mohanty P. (Eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, UK. pp. 443-480.

Taiz L, Zeiger E. 2006. Fisiología Vegetal. Ed. 3. Vol. 2. *Universitat Jaume I*. España. p. 1338.

Tyler G. 1976. Heavy metal pollution, phosphatase activity and mineralization of organic phosphorous in forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 8: 327–332.

Taylor GJ, Foy CD. 1985. Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Can. J. Bot.* 63: 1271-1275.

Thurman DA. 1981. Metals in the environment. En: Lepp NW. (Ed.) *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants. Metals in the Environment*. Applied Science Publishers, Englewood. Nueva Jersey. pp. 239-247.

Torres PJ. 2005. *Cobre, medio ambiente y salud*. Aporte de la Ciencia. Instituto de Innovación en Minería y Metalurgia, IM2. Chile. p. 227.

Tullio M, Pierandrei F, Salerno A, Rea E. 2003. Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. *Biol. Fert. Soils.* 37: 211-214.

- Tlustoš P, Pavliková D, Száková J, Balík J. 2006. Plant accumulation capacity for potentially toxic elements. En: Morel J, Echevarria G, Goncharova N. (Eds.). 2006. Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils. *Nato. Sci. S. Ss. Iv. Ear.* Springer-Verlag, Netherlands. 68: 53-68.
- Tsutsumimoto K, Tsuji K. 2007. Time-resolved x-ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants. En: *X-Ray Spectrom.* 36: 324-327.
- Vassilev A, Lidon FC, do Ceu Matos M, Ramalho JC, Yordanov I. 2002. Photosynthetic performance and some nutrients content in cadmium and copper treated barley plants. *J. Plant Nutr.* 25: 2343–2360.
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA. 2002. Worm take the ‘phyto’ out of ‘phytochelatin’. *TRENDS In Biotech.* 20. 61-64.
- Vázquez MD, Poschenrieder C, Barceló J, Baker AJ, Hatton P, Cope GH. 1994. Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Biol.* 107: 243-250.
- Vega GE, Cirett GS, De la Parra VM, Zavala JR. 2011. Hidrología de Sonora, México. Calmus T. ed. En Panorama de geología en Sonora, México. *Boletín 118*. Instituto de Geología, UNAM. pp. 57-88.
- Vekemans B, Janssens K, Vincze L, Adams F, Van-Espen P. 1994. Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): New developments. En: *X-ray Spectrometry*. Wiley. 23: 278-285.
- Verdi L, Costa I, Geraldo M. 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim. Nova.* 28: 85-94.
- Wang XY, Shen WB, Xu LL. 2004. Exogenous nitric oxide alleviates osmotic stress induced lipid peroxidation in wheat seedling leaves. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* 30: 195- 200.
- Wei L, Luo C, Li X. 2008. Copper Accumulation and Tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55:238-246.

- Wilfried E. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *For.Snow Landsc. Res.* 80: 251-274.
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C. 2003. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278: 47644-47653.
- Wong MH. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere.* 50: 775-780.
- Wójcik M, Tukiendorf A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biol. Plantarum.* 49: 237-245.
- Xue SG, Chen YX, Baker AJM, Reeves RD, Xu XH, Lin Q. 2005. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Water Air Soil Pollut.* 160: 3-14.
- Yang JL, Zheng SJ, He YF, Matsumoto H. 2005. Aluminum resistance requires resistance to acid stress: a case study with pinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *J.Exp. Bot.* 56: 1197-1203.
- Yruela I. 2005. Copper in plants. Toxic Metals in Plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 145-156.
- Yruela I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology.* 36: 409-430.
- Yruela I, Alfonso M, Barón M, Picorel R. 2000. Copper effect on the protein composition of photosystem II. *Physiol. Plantarum.* 110: 551-557.
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745-751.

11. Anexos

Anexo I.

Nutrientes esenciales y Solución Hoagland

Tabla 6. Resumen de las funciones de los nutrientes inorgánicos en las plantas. Las partes por millón (ppm) es igual a las unidades en peso de un elemento por millón de unidades del material de la planta secado al horno; 1% es igual a 10,000 ppm (Raven *et al.*, 1992).

Elemento	Forma Principal en que el elemento es absorbido	Concentración usual en plantas sanas (% del peso en seco)	Funciones importantes
Macronutrientes			
Potasio	K ⁺	0.5-6%	Enzimas, aminoácidos, y síntesis de proteínas. Activador de muchas enzimas. Apertura y cierre de estomas.
Calcio	Ca ²⁺	0.2-3.5%	Calcio de las paredes celulares. Cofactor enzimático. Permeabilidad celular. Componente de la calmodulina, un regulador de la membrana y de las actividades enzimáticas.
Fósforo	H ₂ PO ₂ ⁻ o HPO ₄ ²⁻	0.1-0.8%	Formación de compuestos fosfatados de “alta energía” (ATP, ADP). Ácidos nucleicos. Fosforilación de azúcares. Varias coenzimas esenciales. Fosfolípidos.
Magnesio	Mg ²⁺	0.1-0.8%	Parte de la molécula de clorofila. Activador de muchas enzimas.
Azufre	SO ₄ ²⁻	0.05-1%	Algunos aminoácidos y proteínas. Coenzima A.
Micronutrientes			
Hierro	Fe ²⁺ o Fe ³⁺	25-300 ppm	Síntesis de clorofila, citocromos y nitrogenasa.
Cloro	Cl ⁻	10-10,000 ppm	Ósmosis y equilibrio iónico; probablemente esencial en reacciones fotosintéticas que producen oxígeno.
Cobre	Cu ²⁺	4-30 ppm	Activador de ciertas enzimas
Magnesio	Mn ²⁺	15-800 ppm	Activador de ciertas enzimas
Zinc	Zn ²⁺	15-800 ppm	Activador de ciertas enzimas
Boro	BO ₃ ⁻ o B ₄ O ₇ ²⁻	5-75 ppm	Influencia la utilización de Ca ⁺² .
Molibdeno	MoO ₄ ²⁻	0.1-5.9 ppm	Fijación del nitrógeno. Reducción del nitrato

Tabla 7. Solución de Hoagland modificada a una quinta potencia. Los macronutrientes se añaden por separado, a partir de las soluciones stock. Para la solución con micronutrientes esta se prepara sin el Fe. Al Fe se le añade un quelante -ácido etilendiaminotetraacético- (EDTA). (Zheng *et al.*, 1998; Nian *et al.*, 2000).

Macronutrientes	Concentración final / L
Nitrato de calcio tetrahidratado, Ca (NO ₃) 4 H ₂ O	1 mM
Nitrato de potasio, KNO ₃	1 mM
Sulfato de Magnesio heptahidratado, MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.4 mM
Fosfato de amonio, NH ₄ H ₂ PO ₄	0.2 mM
Micronutrientes	Concentración final / L
Sulfato ferroso, FeSO ₄ 7 H ₂ O -EDTA	20 μM
Ácido bórico, H ₃ BO ₃	3 μM
Cloruro manganoso tetrahidratado, MnCl ₂ 4 H ₂ O	0.5 μM
Sulfato de cobre pentahidratado, CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.2 μM
Sulfato de zinc heptahidratado, ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.4 μM
Molibdato de amonio tetrahidratado, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4 H ₂ O	1 μM

Los análisis químicos que determinan los nutrientes inorgánicos esenciales presentes en las plantas son útiles para conocer la cantidad relativa de los distintos elementos necesarios para el crecimiento normal de las diferentes especies. En las plantas las concentraciones de los distintos elementos varían ampliamente (Tabla 11). Considerando las concentraciones usuales de los elementos se les pueden dividir en dos grandes grupos: los macronutrientes y micronutrientes (Tabla 12). Ciertas especies o grupos taxonómicos de plantas se caracterizan por contener cantidades inusuales de ciertos elementos. Así pues, las concentraciones de algunos elementos en las plantas que crecen en un mismo medio con los mismos nutrientes pueden llegar a diferir (Raven *et al.*, 1992).

Hoagland & Arnon (1950) desarrollaron una solución nutritiva para sistemas hidropónicos que provee estos mismos nutrientes esenciales a las plantas, en condiciones controladas, para el crecimiento de un gran número de plantas. A través de los años se han realizado modificaciones para evitar la deficiencia o toxicidad de nutrientes para ciertas plantas con requerimientos específicos.

En la solución de Hoagland, las concentraciones modificadas de estos elementos son idóneas para evitar síntomas de estrés, este orden de magnitud, superior de los elementos para las raíces vegetales, permite el cultivo de las plantas en el medio durante largos periodos sin necesidad de reemplazar los nutrientes. No obstante, la solución se llega a diluir varias veces con recambios frecuentes para evitar fluctuaciones en las concentraciones de nutrientes del medio y del tejido vegetal, y mantener un pH requerido, sobre todo al trabajar tolerancia a metales pesados como el Cu, Zn y Al (Zheng *et al.*, 1998; Nian *et al.*, 2002).

Anexo II.

Fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*)

La fotosíntesis es un proceso fotoquímico donde las plantas llevan a cabo la conversión de la energía lumínica, en glucosa y ATP. La luz de manera general es transmitida, reflejada y absorbida gracias a las antenas moleculares que se encuentran en la membrana de los tilacoides dentro de los cloroplastos (Figura 29) (Taiz & Zeiger, 2006).

El proceso de la fotosíntesis involucra una reacción de óxido-reducción del agua, en la que sus electrones son cedidos al carbono proveniente del CO₂, y como resultado se libera oxígeno y se obtiene una molécula de glucosa a través del proceso de glucólisis (Taiz & Zeiger, 2006).

Las moléculas que captan la energía luminosa para utilizarla durante el transporte de electrones se denominan pigmentos fotosintéticos. El principal pigmento y el responsable de la emisión de la fluorescencia es la clorofila *a*. Este pigmento tiene dos picos máximos de absorción

de 663 y 420 nm, a este rango se le denomina radiación fotosintéticamente activa (*Photosynthetic Active Radiation, PAR*) (Maxwell & Johnson, 2000).

Parte de la fracción de luz es utilizada para la fotosíntesis, conversión de la energía en trabajo químicamente útil. La energía sobrante es disipada principalmente por un proceso no-fotoquímico como la liberación de calor, por la transferencia de energía a otra molécula suficientemente cercanas a los complejos fotosintéticos o la reemisión de la energía luminosa en forma de fluorescencia. Esta distribución de la energía ocurre de manera simultánea, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultara en la disminución de los otros dos (Maxwell & Johnson, 2000).

La fluorescencia es el proceso donde la clorofila en estado de excitación re-emite un fotón hasta volver a su estado fundamental o de mínima energía. La longitud de onda fluorescente es ligeramente más larga que la longitud de onda de absorción ya que parte de la energía se convierte en calor antes de que el fotón sea re-emitido por fluorescencia (Taiz & Zeiger, 2006).

La emisión de fluorescencia aumenta cuando la intensidad con que se ilumina la planta sobrepasa la de saturación de la velocidad fotosintética, cuando disminuye la concentración de CO₂ o cuando se aplican inhibidores de la fotosíntesis. Por esta razón a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* se puede obtener información fotoquímica y de la disipación térmica de la energía generada por estrés, por ejemplo estrés por metales pesados (Maxwell & Johnson, 2000).

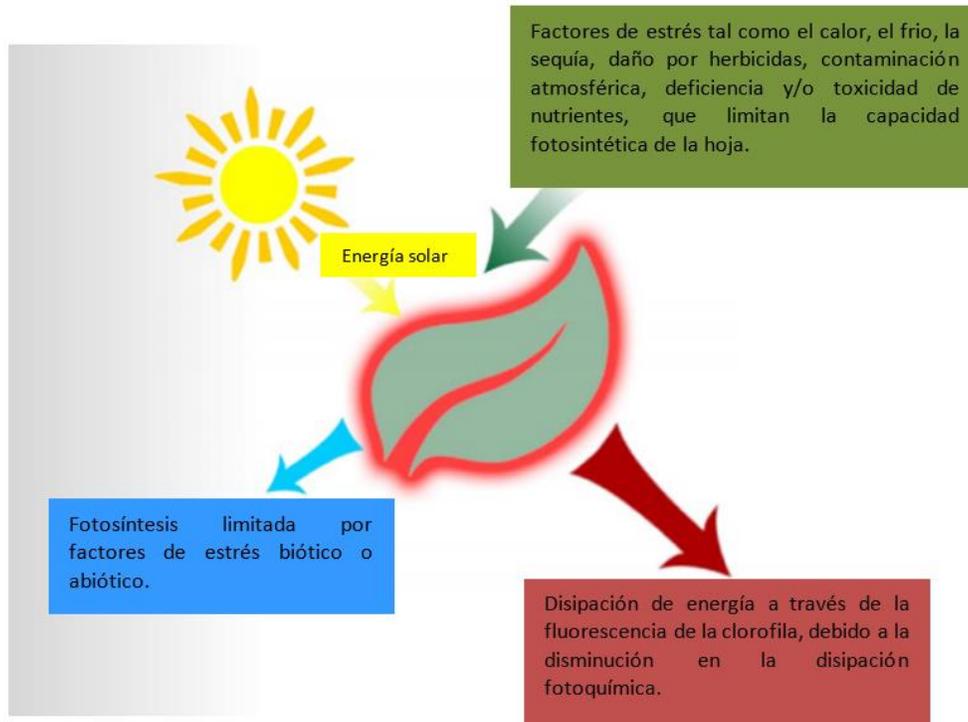


Figura 28. Procesos fotoquímicos en las plantas. Luz transmitida, reflejada y absorbida. (HIL, 2006).

Los complejos antena denominados fotosistemas (PS), tienen picos máximos de absorción, y son, fotosistema P700 (PSI) y P680 (PSII). Es precisamente el P700 responsable directo de la fluorescencia a 740 nm (pico infrarrojo) y el P680 de la fluorescencia de 690 nm (pico rojo), debido al intercalado de electrones que existe entre ambos fotosistemas al ser capaces de ceder electrones (González *et al.*, 2008).

La medición de los efectos de diversos factores que afectan al proceso fotosintético a través de la fluorescencia fue observado por primera vez por Kautsky *et al.* (1960). En este experimento encontraron que al transferir el material fotosintético de la oscuridad a la luz, se daba un aumento en el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante un periodo de tiempo de alrededor de 1 segundo. Este aumento posteriormente se explicó como la consecuencia de la reducción de los aceptores de electrones de la vía fotosintética, justo por debajo del PSII, marcadamente en la plastoquinona y en particular en plastoquinona Q_A (Figura 30) (González *et al.*, 2008).

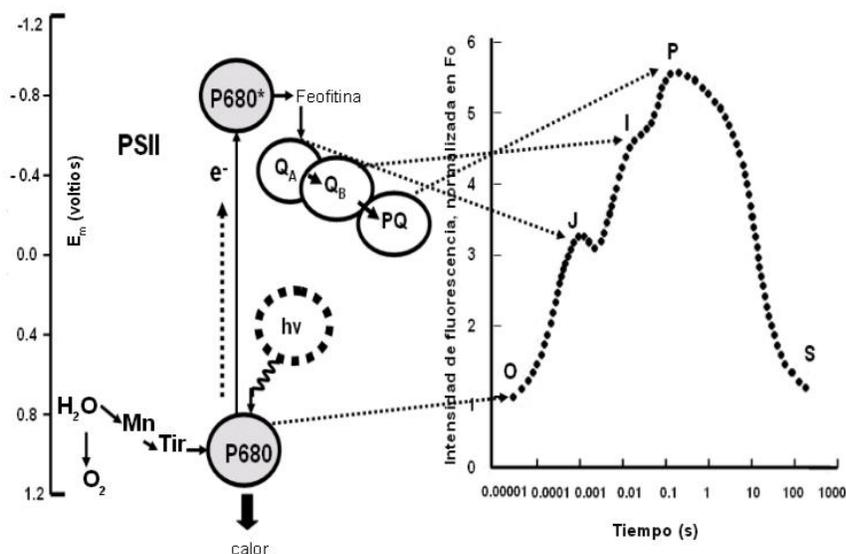


Figura 29. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII en la fase rápida y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones. O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los $50\mu\text{s}$ y en ese momento todos los centros de reacción están oxidados “abiertos”. J, se desarrolla a los 2 ms ($F_J = F_{2\text{ms}}$) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A . I, se desarrolla a los 20 ms ($F_I = F_{20\text{ms}}$) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A y Q_B . P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m). En este momento todos los centros de reacción están reducidos “cerrados” (González *et al.*, 2008).

De tal manera que cuando el fotosistema absorbe la energía fotónica y este ha excitado a los pigmentos y estos a su vez han cedido y aceptado un electrón, el PSII no es capaz de aceptar otro electrón hasta que éste haya pasado al siguiente estado, la plastoquinona (Q_B). Durante este periodo, el centro de reacción se dice que se encuentra en estado “cerrado”. Por tal razón, en un punto cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados se conduce a la reducción en general de la eficiencia fotoquímica y así al aumento correspondiente de la fluorescencia, pues ahora ya no podrá absorber más energía, aumentando la disipación de la misma (González *et al.*, 2008).

Por ende, cuando la hoja se adapta a la oscuridad y después se le aplica una luz intensa, los centros de reacción del PSII se saturan y se cierran inmediata y progresivamente, aumentando el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila, a raíz de esto presenta un nivel máximo y después un decaimiento, sobre una escala de tiempo de pocos minutos (González *et al.*, 2008).

Paralelo al cierre de estos centros, se da la migración de los electrones del PSII gracias a enzimas activadas encargadas del metabolismo del carbono y a la apertura de estomas, fenómeno que se conoce como, “Amortiguamiento fotoquímico” (Figura 31) (Figuroa & Gómez, 2001).

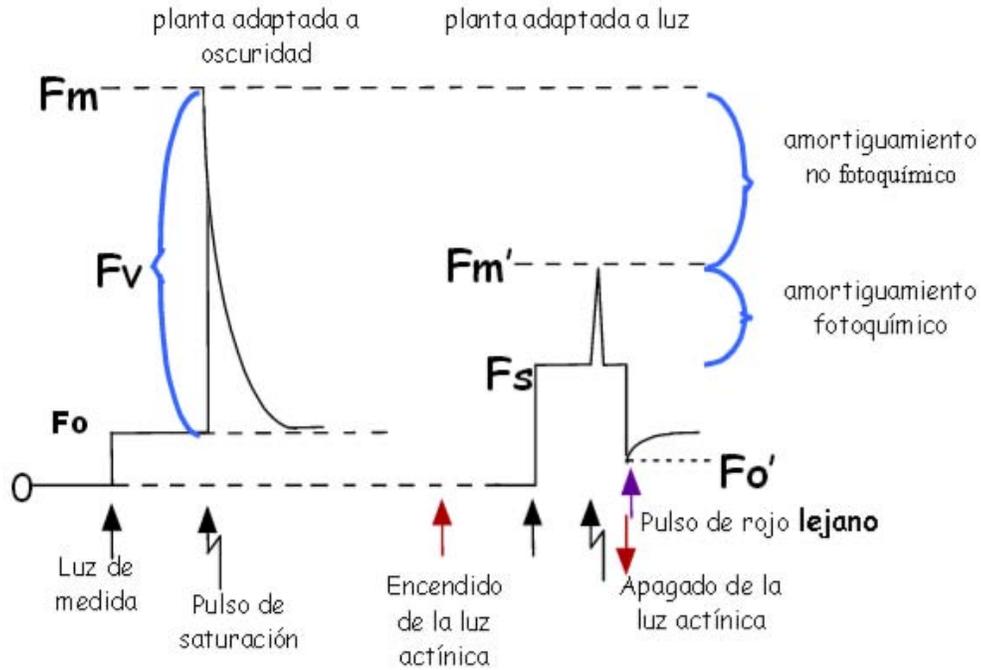


Figura 30. Parámetros de fluorescencia en hojas tratadas en oscuridad y luz utilizando la técnica de pulsos de amplitud modulada de la fluorescencia de la clorofila asociada al PSII. Rendimiento cuántico óptimo ($F_v/F_m = F_m - F_0 / F_m$). Rendimiento cuántico efectivo ($\Delta F/F_m' = F_m' - F_t / F_m'$). Amortiguamiento fotoquímico [$qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0)$] y excitación no fotoquímica [$qN = 1 - (F_m' - F_0) / (F_m' - F_0)$] (Figuroa & Gómez, 2001).

Anexo III.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento de *B. sarothroides* con diferentes tratamientos de CuSO₄ (Control, 100, 500 y 1000 µg de Cu /kg de suelo) para la población de Hermosillo y Nacozari. N=10 por tratamiento para cada población, cada valor representa la media ± su desviación estándar.

Hermosillo				
Parámetros de crecimiento*	Tratamientos			
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Biomasa	0.1493 ± 0.0398	0.1320 ± 0.0472	0.1568 ± 0.0580	0.1449 ± 0.0666
AGR	0.0174 ± 0.0056	0.0141 ± 0.0053	0.0150 ± 0.0075	0.0162 ± 0.0060
RGR	0.0474 ± 0.0057	0.0442 ± 0.0057	0.0449 ± 0.0061	0.0461 ± 0.0069
NAR	0.0002 ± 0.0000	0.0001 ± 0.0000	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001
LAR	310.2065 ± 21.4006	333.2691 ± 45.4138	301.7271 ± 36.7160	311.1126 ± 56.2078
SLA	512.3362 ± 27.6197	537.6260 ± 44.5856	495.8232 ± 36.8522	509.3036 ± 66.1315
LWR	0.6058 ± 0.0231	0.6186 ± 0.0357	0.6027 ± 0.0415	0.6040 ± 0.0457
SWR	0.2206 ± 0.0178	0.2141 ± 0.0264	0.2215 ± 0.0247	0.2246 ± 0.0277
RWR	0.1736 ± 0.0135	0.1674 ± 0.1674	0.1758 ± 0.0198	0.1714 ± 0.0225
Coefficiente Alométrico	0.2042 ± 0.0398	0.1869 ± 0.0472	0.02117 ± 0.0580	0.1998 ± 0.0666
Nacozari				
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Biomasa	0.1208 ± 0.0306	0.0915 ± 0.0485	0.1200 ± 0.0305	0.1018 ± 0.0357
AGR	0.0185 ± 0.0077	0.0178 ± 0.0068	0.0131 ± 0.0066	0.0156 ± 0.0073
RGR	0.0472 ± 0.0076	0.0466 ± 0.0080	0.0417 ± 0.0080	0.0445 ± 0.0076
NAR	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0000	0.0002 ± 0.0001
LAR	243.4655 ± 32.4406	255.2003 ± 38.2968	251.9303 ± 25.6813	254.4092 ± 26.2615
SLA	429.2045 ± 43.2918	422.9191 ± 42.2843	424.1502 ± 33.4273	436.4415 ± 38.3290
LWR	0.5675 ± 0.0360	0.6002 ± 0.0423	0.5955 ± 0.0298	0.5897 ± 0.0362
SWR	0.2752 ± 0.2752	0.2538 ± 0.0340	0.2475 ± 0.0249	0.2618 ± 0.0319
RWR	0.1573 ± 0.0109	0.1460 ± 0.0192	0.1570 ± 0.0111	0.1502 ± 0.0135
Coefficiente Alométrico	0.1780 ± 0.0306	0.1497 ± 0.0485	0.1772 ± 0.0305	0.1590.0357

* Biomasa (g); AGR (g día⁻¹); RGR (g g⁻¹ día⁻¹); NAR (mg cm⁻² día⁻¹); LAR (cm⁻² g⁻¹); SLA (cm⁻² g⁻¹); LWR, SWR, RWR y Coeficiente Alométrico (sin unidades).

Tabla 9. Producción cuántica máxima de la fotoquímica primaria (F_v/F_m) de *B. sarothroides* con diferentes tratamientos de CuSO_4 (Control, 100, 500 y 1000 μg de Cu /kg de suelo) para la población de Hermosillo y Nacozari. N=5 por tratamiento para cada población, cada valor representa la media \pm su desviación estándar.

Hermosillo					
Tratamiento	Días de tratamiento				
	4	17	31	46	60
Control	0.8388 \pm 0.0049	0.8418 \pm 0.0059	0.8450 \pm 0.0038	0.8434 \pm 0.0048	0.8395 \pm 0.0046
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8381 \pm 0.0040	0.8423 \pm 0.0080	0.8456 \pm 0.0036	0.8414 \pm 0.0049	0.8384 \pm 0.0070
500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8343 \pm 0.0061	0.8393 \pm 0.0034	0.8457 \pm 0.0036	0.8416 \pm 0.0037	0.8406 \pm 0.0070
1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8353 \pm 0.0074	0.8415 \pm 0.0077	0.8393 \pm 0.0045	0.8381 \pm 0.0036	0.8325 \pm 0.0058
Nacozari					
	4	17	31	46	60
Control	0.8415 \pm 0.0030	0.8398 \pm 0.0053	0.8430 \pm 0.0043	0.8407 \pm 0.0063	0.8376 \pm 0.0043
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8376 \pm 0.0038	0.8402 \pm 0.0069	0.8416 \pm 0.0065	0.8392 \pm 0.0043	0.8368 \pm 0.0045
500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8358 \pm 0.0042	0.8398 \pm 0.0058	0.8377 \pm 0.0052	0.8372 \pm 0.0066	0.8340 \pm 0.0056
1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.8431 \pm 0.0033	0.8433 \pm 0.0076	0.8418 \pm 0.0086	0.8400 \pm 0.0058	0.8384 \pm 0.0031

Tabla 10. Índice de eficiencia fotosintética (PI_{ABS}) de *B. sarothroides* con diferentes tratamientos de $CuSO_4$ (Control, 100, 500 y 1000 μg de Cu /kg de suelo) para la población de Hermosillo y Nacozari. N=5 por tratamiento para cada población, cada valor representa la media \pm su desviación estándar.

Hermosillo					
Tratamiento	Días de tratamiento				
	4	17	31	46	60
Control	2.5114 \pm 0.2372	2.3829 \pm 0.4831	2.4323 \pm 0.2755	2.6641 \pm 0.3318	2.2211 \pm 0.3766
100 $\mu g/kg$	2.0709 \pm 0.2223	2.5669 \pm 0.3094	2.3918 \pm 0.4382	2.4137 \pm 0.2608	2.3615 \pm 0.3499
500 $\mu g/kg$	2.0924 \pm 0.1717	2.3743 \pm 0.2756	2.6181 \pm 0.2368	2.5930 \pm 0.1466	2.5842 \pm 0.1844
1000 $\mu g/kg$	2.1433 \pm 0.2598	2.1535 \pm 0.4316	2.4281 \pm 0.3806	2.5536 \pm 0.4959	2.3401 \pm 0.4014
Nacozari					
	4	17	31	46	60
Control	2.8171 \pm 0.3033	2.5729 \pm 0.3925	2.4306 \pm 0.3722	2.5482 \pm 0.3764	2.5779 \pm 0.4184
100 $\mu g/kg$	2.4950 \pm 0.2776	2.6313 \pm 0.1486	2.4689 \pm 0.4347	2.4311 \pm 0.2617	2.4042 \pm 0.2440
500 $\mu g/kg$	2.5518 \pm 0.2890	2.3733 \pm 0.2154	2.4249 \pm 0.4021	2.5472 \pm 0.2321	2.4113 \pm 0.1710
1000 $\mu g/kg$	2.9035 \pm 0.3894	2.8355 \pm 0.5089	2.5970 \pm 0.4866	2.6103 \pm 0.3597	2.5216 \pm 0.0894

Tabla 11. Concentración mineral (ppm) en el tejido seco de las hojas de dos poblaciones de *B. sarothroides* con diferentes tratamientos de CuSO₄ (Control, 100, 500 y 1000 µg de Cu /kg de suelo). N=10 por tratamiento para cada población, cada valor representa la media ± su desviación estándar.

Hermosillo				
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Cu	10 ± 2.1075	11 ± 1.4474	14 ± 3.5581	18 ± 4.6340
P	1574 ± 582.0202	1745 ± 846.7125	1443 ± 708.5842	1570 ± 607.2728
S	4456 ± 538.1729	4851 ± 598.4347	4886 ± 642.3697	4633 ± 524.0079
Mn	275 ± 50.4763	248 ± 37.1422	233 ± 43.1842	263 ± 56.7699
K	64760 ± 2933.2680	63570 ± 7686.4822	59976 ± 6687.8301	58439 ± 6910.5413
Fe	262 ± 87.3175	230 ± 57.4244	232 ± 64.5682	311 ± 152.9346
Zn	97 ± 24.1077	98 ± 19.9866	97 ± 15.7898	85 ± 9.9541
Ca	9084 ± 1737.1125	8437 ± 1215.5205	7815 ± 1659.4632	9046 ± 1899.9384
Cl	6757 ± 2111.9943	5914 ± 1519.5965	6468 ± 1181.1929	5530 ± 2144.0734
Nacozari				
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Cu	9 ± 1.0867	9 ± 1.0629	14 ± 3.9086	16 ± 3.0878
P	2495 ± 2231.5840	2334 ± 592.5297	1918 ± 646.3482	1866 ± 466.3079
S	4467 ± 715.5026	5932 ± 2844.1981	4345 ± 540.8574	4504 ± 842.7666
Mn	352 ± 83.0359	326 ± 102.1855	303 ± 106.0258	328 ± 89.0598
K	65183 ± 6577.5382	66204 ± 7115.3374	61325 ± 3444.6530	60797 ± 6125.5405
Fe	207 ± 32.5610	222 ± 71.1518	216 ± 34.4432	204 ± 14.2948
Zn	68 ± 9.76469	56 ± 9.38904	74 ± 13.0180	73 ± 11.5546
Ca	8131 ± 1419.3449	8268 ± 1142.2983	7753 ± 1181.5261	8467 ± 1322.0871
Cl	6158 ± 2591.8267	8081 ± 2413.6879	5571 ± 2289.2207	7257 ± 2275.9020

Tabla 12. Concentración mineral (ppm) en el tejido seco de la raíz de dos poblaciones de *B. sarothroides* con diferentes tratamientos de CuSO₄ (Control, 100, 500 y 1000 µg de Cu /kg de suelo). N=10 por tratamiento para cada población, cada valor representa la media ± su desviación estándar.

Hermosillo				
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Cu	74 ± 25.3827	93 ± 32.9756	73 ± 17.6194	101 ± 25.8890
P	287 ± 122.5315	369 ± 234.5158	366 ± 227.4667	346 ± 201.8920
S	6640 ± 1771.5554	7415 ± 1405.8427	7919 ± 1940.3518	7356 ± 1564.3359
Mn	81 ± 11.6670	77 ± 16.1820	77 ± 16.4580	73 ± 12.9099
K	44730 ± 7358.4370	49618 ± 1605.9832	55995 ± 7495.8686	50705 ± 0630.3442
Fe	313 ± 63.1210	228 ± 57.7679	198 ± 47.8301	263 ± 146.2310
Zn	74 ± 12.8212	86 ± 16.5738	93 ± 25.2061	95 ± 31.4927
Ca	5337 ± 1422.8265	4073 ± 1188.5783	3784 ± 968.6177	4359 ± 1115.2085
Cl	4055 ± 2455.4216	5262 ± 2895.5919	4253 ± 2207.0496	4370 ± 2782.1892
Nacozari				
	Control	100 µg/kg	500 µg/kg	1000 µg/kg
Cu	97 ± 30.7470	115 ± 58.5478	153 ± 59.2213	112 ± 25.3373
P	822 ± 731.122295	796 ± 570.138842	926 ± 677.230879	1202 ± 1129.90235
S	6512 ± 1620.5613	6623 ± 2142.7140	7779 ± 2146.7729	6332 ± 1981.7712
Mn	92 ± 20.4256	97 ± 25.4057	95 ± 22.3984	94 ± 23.2963
Fe	301 ± 81.0528	253 ± 49.5211	259 ± 73.2752	258 ± 47.3857
Zn	97 ± 29.6526	100 ± 19.0573	112 ± 25.3374	102 ± 28.3136
K	44840 ± 1887.7140	53102 ± 3299.7741	56707 ± 0739.7039	54972 ± 3004.7293
Ca	5403 ± 1198.6161	5436 ± 1054.1780	4402 ± 1464.4311	4868 ± 972.5969
Cl	7601 ± 6138.4088	10095 ± 5201.5528	6846 ± 2161.3944	9111 ± 2570.8946