



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Respuesta fisiológica de *Fagopyrum esculentum*
(Polygonaceae) al cobre

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGO

P R E S E N T A :

Raisa Flores Rodríguez



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María del Rocío Cruz Ortega
2018

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Flores
Rodríguez
Raisa
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306053113
2. Datos del tutor
Dra.
María del Rocío
Cruz
Ortega
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Margarita
Collazo
Ortega
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Clara Leonor
Tinoco
Ojanguren
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María Guadalupe
Barajas
Guzmán
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Alma Yadira
Martínez
Rendón
7. Datos del trabajo escrito
Respuesta fisiológica de *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) al cobre.
114 p
2018

Agradecimientos

A el proyecto PAPIIT IN205912 titulado “Estudio comparativo a nivel molecular y fisiológico de la tolerancia de metales de *Fagopyrum esculentum*, Moench Polygonaceae.” Por el apoyo económico proporcionado para la realización de este proyecto.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por su paciencia, confianza, conocimiento y apoyo incondicional brindados durante este proyecto.

Al Dr. José Luis Ruvalcaba Sil, del Departamento de Física Experimental del Instituto de Física de la UNAM, por su tiempo, asesoría y por facilitar el uso de instalaciones y equipos para la realización de la técnica de fluorescencia de rayos X que fue requerida para este trabajo.

A los técnicos del Instituto de Física de la UNAM: M. en C. Juan Gabriel Morales, Sr. Karim López y el Ing. Francisco Beristain, por su apoyo durante mi estancia en el Instituto de Física.

A Teresa, auxiliar en el laboratorio de Alelopatía, y a mis compañeras durante este periodo, Esther y Carolina, les agradezco todo el apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

A mí familia, en estricto orden de cómo me fueron conociendo (porque de que otra manera habría de hacerlo), mamá, papá y hermana, gracias por todo el amor y apoyo que desde que recuerdo me han dado, son de personas que hacen de esta vida un lugar increíble.

A mi mamá Natalia Eloisa, gracias por apoyarme siempre, entenderme y escucharme. Tú me enseñaste que escuchar es una de las miles de formas en las que se expresa el amor y eso es algo que siempre me acompaña. Gracias por ser mi amiga, por siempre estar en mi equipo, por enseñarme a ser respetuosa, a tener paciencia, a ser amable, y a amar, valorar y disfrutar lo que tenemos. Te amo mi chiqui hermosa.

A mi papá, Juan Carlos, gracias por todo el tiempo que me regalaste, tu gran apoyo durante mi vida Universitaria, por todos esos momentos vividos durante mis aventones a la escuela, por tus largas esperas y por siempre hacerlas con gusto. Gracias por la confianza, el amor y por esa afabilidad y nobleza que te caracterizan. Te amo.

A mi hermana, Xanath, e mi he, gracias simple y llanamente por ser mi hermana, por esa complicidad y amor que solo puedes conocer cuando tienes una, por las travesuras, peleas, juegos, música y el resto de las aventuras que hemos compartido; por tu nobleza y alegría. Gracias por ser esa energía que incluso cuando parece no haber más, siempre la encuentro contigo. Gracias por amarme sin condiciones. Te amo.

A mi abuela y mis nonos. A mi abuela Lola, gracias por ser la mujer que fuiste, por todo tu amor, paciencia y dedicación y por enseñarme a ser una mujer luchona. Tus enseñanzas se quedan conmigo y me impulsan para seguir adelante. A mis nonos Elena y Octavio, Nona, gracias por dejarme cosechar tus fresas, por ese limón con azúcar, por dejarme ir de compras en tu despensa y por todo el tiempo compartido. Nono, gracias por enseñarme a atesorar los momentos familiares, a ser compartido y trabajador, a no darse por vencido, y por todo el tiempo que me he podido compartir contigo.

Al resto de mi familia, tíos, primos, sobrinos, gracias por las pláticas, bailes, juegos, travesuras y todos los demás momentos compartidos.

A los amigos, de los que aprendes otras maneras de ver la vida. En especial agradezco a Daniela y a Esther. Daniela, gracias por tu amistad, cariño, paciencia, apoyo y entendimiento. Esther gracias por tu apoyo, cariño y amistad de ya, varios años. Agradezco a ambas el seguir presentes a pesar de la distancia.

A mí, por caer, levantarme, y seguir caminando.

“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.”

-Johann Wolfgang von Goethe.

Para mi familia, mamá, papá y hermana:

*Hay oscuridades en la vida y hay luces,
y tú eres una de las luces, la luz de
todas las luces.*

-Bram Stoker, Drácula.

Índice

Abreviaturas.....	III
Índice de figuras.....	VI
Índice de tablas.....	11
Resumen.....	12
Introducción.....	14
Metales pesados.....	14
Metales pesados en plantas.....	16
Toxicidad por metales pesados en plantas.....	17
Tolerancia a metales pesados.....	19
Cobre, propiedades físico-químicas.....	23
Cobre en las plantas.....	24
Absorción y transporte.....	26
Homeostasis.....	28
Deficiencia.....	29
Toxicidad al cobre.....	30
Tolerancia al cobre.....	32
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench (Polygonaceae).....	35
Antecedentes.....	37
Hipótesis.....	40
Objetivos.....	40

Objetivo general.....	40
Objetivos particulares.....	40
Materiales y Métodos.....	41
Material biológico.....	41
Sustrato de crecimiento.....	41
Germinación.....	41
Diseño experimental.....	41
Análisis de crecimiento.....	43
Análisis de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	48
Análisis de elementos químicos en hojas y raíz de <i>F. esculentum</i>	50
Resultados.....	54
Análisis de crecimiento.....	54
Análisis de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	64
Proporción de Cu y elementos esenciales en hojas y raíz de <i>F. esculentum</i> ...68	
Discusión.....	76
Conclusiones.....	89
Perspectivas.....	91
Anexo I. Fotosíntesis.....	92
Anexo II. Fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	98
Bibliografía.....	102

Abreviaturas

ADN. - Ácido desoxirribonucleico

AGR.- Siglas en inglés de tasa de crecimiento absoluto (*absolute growth rate*)

Ag.- Plata

Al. - Aluminio

AO. - Ácidos orgánicos

APX. - Ascorbato peroxidasa

ATP. - Adenosín trifosfato

ATX. - Siglas en inglés de chaperona de cobre (*Antioxidant protein*)

Be. - Berilio

CA. - Coeficiente Alométrico

Ca+. - Calcio

CAT.- Catalasa

CCH. - Chaperona de cobre de *Arabidopsis*

CCS. - Siglas en inglés de chaperona de cobre para superóxido dismutasa (*copper chaperone for superoxide dismutase*)

Cd.- Cadmio

Cd⁺². - Cation cadmio (II)

CDF. - Siglas en inglés de transportadores facilitadores de difusión de cationes (*cation diffusion facilitator*)

C₆H₁₂O₆.- Molécula de glucosa

Co.- Cobalto

CO₂. - Dióxido de carbono

COPT. - Siglas en inglés de transportadores de cobre (*copper transporter*)

COX17.- Siglas en inglés de chaperona de cobre de *A. thaliana* (*Citocromo Oxidasa*)

Cr.- Cromo

Cu. - Cobre

Cu⁺. - Cation cobre (I)

Cu⁺². - Cation cobre (II)

CuSO₄.- Sulfato de Cobre

CuZnSOD. - Cuprozinc superóxido dismutasa

Cys. - Cisteína

Cyt_{b6f}.- Citocromo b6f

ETR1.- Siglas en inglés de receptor de etileno (*ethylene response 1*)

Fe⁺². - Cation hierro (II)

Fe. - Hierro

Fd. - Ferredoxina

FNR. - Ferredoxina-NADP reductasa

Fm. - Fluorescencia máxima

Fo. - Valor de origen de la fluorescencia

Fv. - Fluorescencia variable

Fv/Fm. - Máxima eficiencia del fotosistema II

FW. - Siglas en inglés de peso de flores (*flower weight*)

Glu. -Glutamato

Gly. - Glicina

H₂O. - Agua

H₂O₂.- Peróxido de hidrógeno

HEM. - Hongos ectomicorrízicos

Hg. - Mercurio

HMA. - Hongos micorrízicos arbusculares

lnL_{A1}.- Logaritmo natural de área foliar total inicial

lnL_{A2}.- Logaritmo natural de área foliar total final

lnW₁.- Logaritmo natural de peso seco total inicial

lnW₂.- Logaritmo natural de peso seco total final

LW. - Siglas en inglés de peso foliar (*leaf weight*)

LW₁.- Peso seco foliar inicial

LW₂.- Peso seco foliar final

LAR. - Siglas en inglés de relación de área foliar (*leaf area ratio*)

LWR. - Siglas en inglés de proporción de peso foliar (*leaf weight ratio*)

Mg.- Magnesio

Mg⁺². - Cation magnesio (II)

Mn. - Manganeseo

Mn⁺². - Cation manganeseo (II)

Mo. - Molibdeno

MoCo. - Siglas en inglés de cofactor de molibdeno (*molybden cofactor*)

Mrp. - Siglas en inglés de proteína asociada a la resistencia a múltiples drogas (*multidrug resistance-associated protein*)

NA. - Nicotianamina

NADP⁺. - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada

NADPH⁺. - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NAR. - Siglas en inglés de tasa de asimilación neta (*net assimilation rate*)

Ni. - Níquel

Ni⁺². - Cation níquel (II)

NO₃⁻. - Nitrato

NRAMP. - Siglas en inglés de proteína de macrófago asociada a la resistencia

natural (*natural resistance associated macrophage protein*)

O₂- Oxígeno

O₂⁻ - Superóxido

O₂²⁻ - Anión peróxido

OH⁻ - Radical hidroxilo

P-ATPasas. - Transportadores de membrana, también conocidos como HMA, por sus siglas en inglés (*Heavy Metal ATPases*)

Pb. - Plomo

PC. - Plastocianina

Pc –sintasa. - Fitoquelatina sintasa

PEPC. - Fosfoenolpiruvato carboxilasa

pH. - Potencial hidrógeno

PI. – Índice de potencial fotosintético

POD. - Peroxidasa

PQ. - Plastoquinona

PSI. - Fotosistema I

PSII. - Fotosistema II

QA. - Plastoquinona A

RGR. - Siglas en inglés de tasa de crecimiento relativo (*relative growth rate*)

ROS. - Siglas en inglés de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

RuBisCO. - Ribulosa- 1,5 -bifosfato carboxilasa oxigenasa

RW. - Siglas en inglés de peso seco de raíz (*root weight*)

SANDRA. - Siglas de Sistema de Análisis No Destructivo por RAYOS X

Se. - Selenio

-SH. - Grupo sulfhidrilo

SLA. - Siglas en inglés de área foliar específica (*specific leaf area*)

SOD. - Superóxido dismutasa

SW. - Siglas en inglés de peso de tallo (*stem weight*)

T¹.- Tiempo uno

T².- Tiempo dos

TI.- Talio

U.- Uranio

V.- Vanadio

W.- Peso seco total

W₁.- Peso seco total en tiempo 1

W₂.- Peso seco total en tiempo 2

XFR. - Siglas en inglés de fluorescencia de rayos X (*X-ray fluorescence*)

ZIP. - Siglas en inglés de familia de transportadores de metales (*Zrt- and Irt-like proteins*)

Zn. - Zinc

Zn⁺². - Cation zinc (II)

Índice de Figuras

- Figura 1.-** Curvas dosis-respuesta típicas para (A) metales pesados esenciales y (B) Metales pesados no esenciales. Tomado y adaptado de Alloway, 2013.....17
- Figura 2.-** Homeostasis de cobre en una célula de *Arabidopsis thaliana*. Tomado y adaptado de Yruela, 2009.29
- Figura 3.-** *Fagopyrum esculentum* Moench descripción botánica. Tomado de PROTA database disponible en <http://www.prota4u.info/>.36
- Figura 4.-** A) *Fluorímetro portátil Handy Pea*, (a) *Unidad de control*, (b) *Sensor de calor*, (c) *Clip para las hojas*. (Tomado de *Hansatech Instruments*, <http://www.hansatech-instruments.com>). B) *Clips en hojas de F. esculentum* para la toma de datos con el fluorímetro.50
- Figura 5.-** A) Sistema (SANDRA). B) Pastilla colocada a distancia del colimador.52
- Figura 6.-** Biomasa o peso seco total (g) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Prueba de ANOVA de una vía ($F_{(4,45)}= 3.1401$ $p=0.0232$) aplicando comparación de medias de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). ...55
- Figura 7.-** (A) Tasa relativa de crecimiento (RGR) y (B) tasa absoluta de crecimiento (AGR) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores

representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=10). No se presentaron diferencias significativas. Prueba de ANOVA de una vía, RGR ($F_{(4,45)}=2.200$; $p=0.0841$); AGR ($F_{(4,45)}=2.200$; $p=0.0841$).57

Figura 8.- Componentes de la tasa relativa de crecimiento de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). (A) Tasa de asimilación neta (NAR) ($X^2_{(4, N=50)}=4.800$; $P=0.3084$); (B) Proporción de área foliar (LAR) ($F_{(4,45)}=0.827$; $p=0.5150$); (C) Área Foliar específica (SLA) ($F_{(4,45)}=4.214$; $p=0.0055$); (D) Proporción de peso foliar (LWR) ($F_{(4,45)}=0.401$; $p=0.8069$). Se realizó una prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes para NAR con comparación de medias debido a que los datos no fueron normales ($H_{(4, N=50)}=2.2089$; $p=0.6974$). Para LAR, SLA y LWR, se realizó una ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).....59

Figura 9.- (A) Peso seco total de hojas y (B) área foliar de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se realizó un ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. No se presentaron diferencias significativas respecto al peso seco total de hojas ($F_{(4,45)}=2.1442$; $p=0.0908$), sin embargo, sí se observaron respecto al área foliar ($F_{(4,45)}=3.8518$; $p=0.0089$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).....61

Figura 10.- (A) Coeficiente alométrico y (B) asignación de biomasa de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se realizó una ANOVA de una vía. No se presentaron diferencias significativas, coeficiente alométrico ($F_{(4,45)} = 1.9070$; $p = 0.1257$); RWR ($F_{(4,45)} = 2.0620$; $p = 0.1016$); LWR ($F_{(4,45)} = 2.147$; $p = 0.0905$); SWR ($F_{(4,45)} = 1.633$; $p = 0.1823$) y FWR ($F_{(4,45)} = 0.1225$; $p = 0.9737$).63

Figura 11.- Eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=240). A) Valor promedio de Fv/Fm de las plantas de los distintos tratamientos en los distintos días (de medición) ($F_{(20,210)} = 0.55$ $p = 0.9432$); (B) valor promedio de Fv/Fm de todas las plantas del experimento en los distintos días (de medición) ($F_{(5,240)} = 23.25$ $p < 0.0001$); (C) valor promedio de Fv/Fm de las plantas por tratamiento ($F_{(4,240)} = 0.24$ $p = 0.9144$). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la comparación de medias de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).65

Figura 12.- Índice de potencial fotosintético (PI) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=240). (A) Valor promedio del PI de las plantas de los distintos tratamientos en los distintos días (de medición) ($F_{(20,210)} = 0.559$ $p = 0.9369$); (B) valor promedio del PI de las plantas de todo el experimento en los distintos días (de medición) ($F_{(5,240)} = 54.376$ $p < 0.0001$); (C) valor promedio del PI en todos los tiempos de las plantas por tratamiento ($F_{(4,240)} = 1.68$ $p = 0.1729$). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías y

cuando se encontraron diferencias significativas se realizo la comparación de medias de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).....67

Figura 13.- Concentración de cobre (ppm) en (A) hojas y (B) raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=30). Se realizó una prueba ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizo la comparación de medias de Tukey. (A) Concentración de Cu en hojas ($F_{(4,45)} = 40.2819$ $p < 0.0001$). (B) Concentración de cobre en raíces ($F_{(4,45)} = 2.2352$ $p = 0.0801$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).69

Figura 14.- Concentración de macroelementos en hojas de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de fósforo ($F_{(4,45)} = 0.7042$ $p = 0.5933$). (B) Concentración de azufre ($F_{(4,45)} = 0.7886$ $p = 0.5404$). (C) Concentración de calcio ($F_{(4,45)} = 2.439$ $p = 0.060$). (D) Concentración de potasio ($F_{(4,45)} = 1.460$ $p = 0.2302$).70

Figura 15.- Concentración de macroelementos en raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizo la comparación de medias de Tukey. (A) Concentración de fósforo ($F_{(4,45)} = 1.3690$ $p = 0.2597$). (B) Concentración de azufre ($F_{(4,45)} = 6.045$ $p = 0.0005$). (C) Concentración de calcio ($F_{(4,45)} = 1.717$ $p = 0.1627$). (D)

Concentración de potasio ($F_{(4,45)} = 2.579$ $p=0.0499$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).72

Figura 16.- Concentración de microelementos en hojas de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de hierro ($F_{(4,45)} = 1.53$ $p=0.2100$). (B) Concentración de zinc ($F_{(4,45)} = 1.80$ $p=0.1450$). (C) Concentración de manganeso ($F_{(4,45)} = 1.4370$ $p=0.2373$).74

Figura 17.- Concentración de microelementos en raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de hierro ($F_{(4,45)} = 0.8876$ $p=0.4791$). (B) Concentración de zinc ($F_{(4,45)} = 1.644$ $p=0.1797$). (C) Concentración de manganeso ($F_{(4,45)} = 1.711$ $p=0.1641$).75

Figura 18.- Esquema de la estructura de un cloroplasto. Tomado y adaptado de Taiz y Zeiger, 2010.93

Figura 19.- Cadena transportadora de electrones en la membrana tilacoidal de cloroplastos durante la fotosíntesis. Tomado y adaptado de Taiz y Zeiger, 2010.95

Figura 20.- Esquema sobre el uso de energía luminosa en una hoja. La mayoría de la energía lumínica en hojas bajo condiciones óptimas es utilizada en los procesos fotosintéticos, mientras que una pequeña parte esta energía (que no es utilizada para llevar a cabo las reacciones fotoquímicas) es disipada en forma de calor o de fluorescencia.99

Figura 21.- Emisión de la fluorescencia de la clorofila a, cinética de Kautsky. **O** es el valor de la fluorescencia mínima. **J** se refiere a la reducción parcial de Q_A . **I** representa la reducción parcial de Q_A y Q_B . **P** es el valor de la fluorescencia máxima, momento en el que todos los centros de reacción están reducidos. Tomado de González-Moreno *et al.*, 2008.100

Índice de Tablas

Tabla 1.- Solución nutritiva Hoagland a 1/5 de su fuerza iónica. Tomado y modificado de Martínez, 2013.	43
---	----

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del cobre en diferentes procesos fisiológicos de *Fagopyrum esculentum* (crecimiento, fotosíntesis y nutrición) durante su ciclo de vida. Las plantas de *F. esculentum* fueron tratadas con 0, 100, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g Cu/g}$ de suelo en un periodo de 43 días. Se evaluaron los efectos en el crecimiento y la eficiencia cuántica máxima del PSII, mediante un análisis de crecimiento clásico y un análisis de la fluorescencia de la clorofila. Asimismo, por medio de la técnica de fluorescencia de rayos X se determinó la asimilación y asignación de cobre, fósforo, calcio, azufre, potasio, hierro, zinc y manganeso en hojas y raíces de plantas de *F. esculentum*. Todas las plantas sobrevivieron inclusive a concentraciones de 2000 $\mu\text{g Cu/g}$ de suelo. La presencia de Cu no generó efectos adversos en los parámetros de crecimiento clásico, así como en la eficiencia fotosintética, ya que no se detectaron diferencias significativas entre las plantas control y las expuestas a Cu. No obstante, se observó una disminución en el área foliar total de las plantas expuestas a 2000 $\mu\text{g Cu/g}$, lo cual repercutió en la disminución de su biomasa seca final; sin embargo, la densidad y grosor de sus hojas fue similar a las de los otros tratamientos, lo cual influyó en mantener una NAR, una F_v/F_m y un PI_{ABS} equivalentes a los de las plantas expuestas a otras concentraciones de Cu.

Se detectó un incremento en la concentración de Cu en hojas de *F. esculentum* en consecuencia del aumento de Cu en el medio, a diferencia de su concentración en raíces, donde no se observaron diferencias significativas. En cuanto a la proporción de P, Ca, Fe, Zn y Mg en hojas y raíces, no se observaron diferencias significativas,

sin embargo, la concentración de S y K en las raíces presento diferencias significativas entre las plantas expuestas a las diferentes concentraciones de Cu, pero no respecto a las plantas control. Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta de *F. esculentum* al Cu se relaciona con evitar los efectos tóxicos en su actividad fotosintética, en su estado nutricional, y, por ende, en su crecimiento.

INTRODUCCIÓN

La constante demanda y utilización de metales pesados por parte de la industria ha provocado un aumento en la presencia de suelos con altas concentraciones de estos, lo que se ha convertido en un tema de preocupación ambiental, ecológica y de salud pública debido a los efectos perjudiciales que producen, tales como, cambio en la estructura de comunidades, pérdida de la biodiversidad, toxicidad de alimentos y efectos tóxicos en los seres vivos (Ashraf *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2008; Herrera-Estrella y Guevara-García, 2009; Nagajyoti *et al.*, 2010; Prieto-Méndez *et al.*, 2009; Rueda-Saa *et al.*, 2011).

En las plantas, los metales pesados son considerados uno de los factores de estrés abiótico más importantes, debido a los efectos adversos que provocan en su crecimiento, desarrollo y productividad, ocasionados principalmente por efectos tóxicos como: la inactivación de enzimas, interferencia en la absorción de nutrientes, estrés oxidativo, entre otros (Argüello *et al.*, 2012; Clemens, 2006; Lal, 2010). Sin embargo, algunos metales pesados como el zinc y el cobre son micronutrientes esenciales para las plantas, por lo que su deficiencia también puede tener efectos adversos, como retraso en el crecimiento y marchitamiento (Taiz y Zeiger, 2010).

Metales pesados

El término metales pesados se utiliza para referirse a metales o metaloides con densidades relativamente altas ($>5 \text{ g cm}^{-3}$) y peso atómico mayor a 20 (Ahmad *et al.*, 2010; Navari-Izzo y Rascio, 2011), como son: el cobalto (Co), el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el manganeso (Mn), el molibdeno (Mo), el cobre (Cu), el zinc (Zn) y el

hierro (Fe) (Schützendübel y Polle, 2002), que pueden producir efectos tóxicos en los organismos, incluso, a bajas concentraciones (Prieto-Méndez *et al.*, 2009).

Los metales pesados, se encuentran presentes en la corteza terrestre de forma natural en concentraciones traza. En los suelos, sus porcentajes generalmente están entre 0.001 y 0.065 % para Cu, Zn, Pb, Ni, Cd y Cr, 10.0 % y 0.002 % para Fe y Mn respectivamente (Ernst, 1974). Sin embargo, existen suelos con presencia de altas concentraciones de metales pesados (suelos metalíferos), los cuales pueden tener un origen geológico, como los suelos de serpentina, ricos en níquel Ni, Cr y Co (Reeves, 2006; Vázquez-Glaría *et al.*, 2006), o los suelos enriquecidos en Co y Cu (Reeves, 2006), entre otros, o bien, tener un origen antropogénico, en los cuales las altas concentraciones de metales pesados son resultado de actividades humanas como la minería, la manufactura y la agricultura (Herrera-Estrella y Guevara-García, 2009; Hohl y Varma, 2010; Nagajyoti *et al.*, 2010).

Dentro del grupo de los metales pesados algunos son micronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo óptimo de los organismos, como el Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Mo, el vanadio (V) y Ni (Rueda-Saa *et al.*, 2011; Saxena y Misra, 2010; Schützendübel y Polle, 2002), mientras que el resto, Cd, Pb, uranio (U), talio (Tl), Cr, plata (Ag) y mercurio (Hg), no tienen funciones metabólicas conocidas y siempre son tóxicos para los organismos (Herrera-Estrella y Guevara-García, 2009; Prieto-Méndez *et al.*, 2009).

Metales pesados en plantas

De los metales pesados considerados esenciales para los organismos, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo y Ni son micronutrientes esenciales para las plantas, pero, cuando sobrepasan su concentración celular óptima, producen efectos tóxicos (Barker y Pilbeam, 2006; Taiz y Zeiger, 2010). Por esto, la respuesta de las plantas a metales pesados depende tanto de la concentración disponible para las células (respuesta dosis-dependiente) (Figura 1) como de si el metal es esencial (Figura 1A), o, no (Figura 1B) (Appenroth, 2010; Sharma y Dietz, 2006). La concentración de metales pesados disponible para las plantas depende de: el metal, su biodisponibilidad, la especie y etapa de desarrollo de la planta, las condiciones ambientales (Chojnacka *et al.*, 2005; Prieto-Méndez *et al.*, 2009) y las propiedades del suelo, como pH, textura, capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica, potencial redox (Galán y Romero, 2008; Hooda, 2007; Prieto-Méndez *et al.*, 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005), composición iónica de la solución del suelo (Prieto-Méndez *et al.*, 2009), presencia de otros metales pesados (DalCorso, 2012) y contenido de arcillas (Kabata-Pendias, 2011).

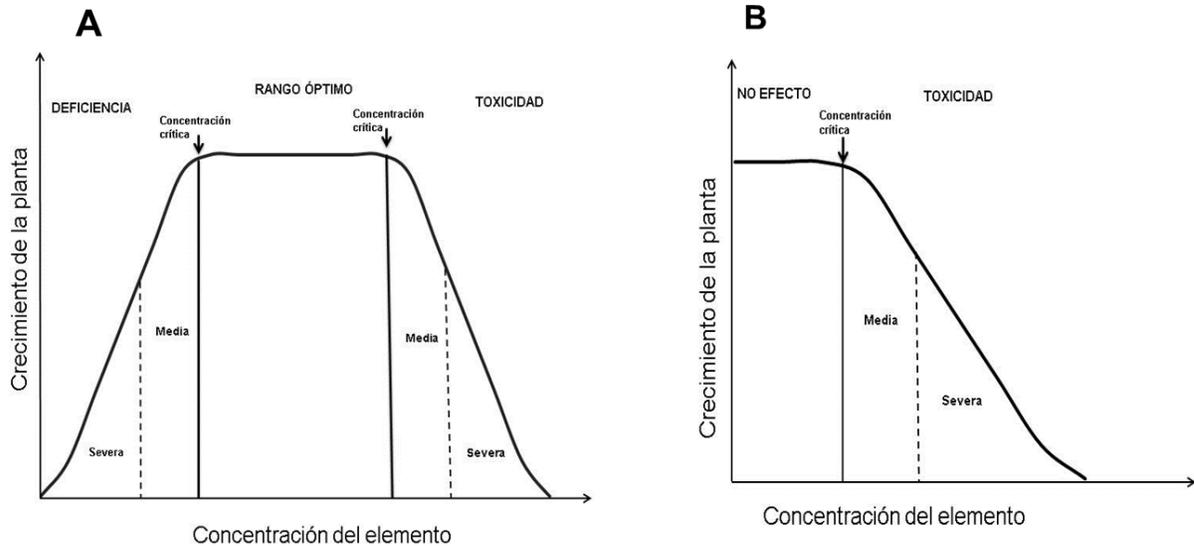


Figura 1.- Curvas dosis-respuesta típicas para (A) metales pesados esenciales, la cual muestra tres zonas, la zona de deficiencia, la zona de concentración óptima y la zona de toxicidad, y, para (B) metales pesados no esenciales, la cual presenta dos zonas, la de no efecto y la de toxicidad. Tomado y adaptado de Alloway (2013).

Toxicidad por metales pesados en plantas

La presencia o exceso de metales pesados en las células de las plantas produce efectos tóxicos a nivel molecular y celular como: la inactivación de enzimas y proteínas, ya sea por bloqueo o enmascaramiento del sitio activo debido a la alta afinidad que tienen con grupos sulfhidrilo (-SH) (Argüello *et al.*, 2012; Hall, 2002; Lal, 2010; Shah *et al.*, 2010); desplazamiento de iones esenciales de moléculas y proteínas (Hall, 2002), por ejemplo, el Zn^{+2} puede desplazar al Mg^{+2} en la RuBisCO (Schützendübel y Polle, 2002); interferencia en la absorción de otros elementos como Ca^{+2} , Mg^{+2} , NO_3^- (Lal, 2010), p. ej., el cromo interfiere con la absorción de Ca^{+2} y Mg^{+2} en la soya (Shah *et al.*, 2010); peroxidación de membranas de cloroplastos y tilacoides (Lal, 2010); inhibición en la biosíntesis de clorofila y carotenoides (Shu *et al.*, 2011); y disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Cassierra-

Posada y Poveda, 2005). Además, los metales pesados pueden producir estrés oxidativo, ya que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el hidroxilo (OH^\cdot), anión peróxido (O_2^{2-}), el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss (Clemens, 2006). En la reacción de Fenton, las ROS se forman a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno mediante la adición de sales de hierro, como se muestra en la siguiente ecuación (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007):



Además del hierro, otros metales de transición como el Cu pueden generar radical hidroxilo mediante esta reacción (Nagajyoti *et al.*, 2010). En el caso de la reacción de Haber-Weiss se forma el radical hidroxilo en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno como se muestra en la siguiente ecuación:



Las ROS pueden provocar peroxidación de membranas, induciendo cambios en su composición lipídica y en la fluidez, afectando su permeabilidad y por tanto el transporte de electrones e iones, además, pueden modificar aminoácidos, proteínas y ADN (Clemens, 2006; Hall, 2002; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

La toxicidad por metales pesados afecta procesos fisiológicos como crecimiento, fotosíntesis, germinación, reproducción y absorción de nutrientes, presentando síntomas como la inhibición del crecimiento de raíces y tallos, raíces de color café, disminución en la producción de biomasa, reducción del área foliar, clorosis,

necrosis, enrollamiento y marchitamiento de las hojas (Appenroth, 2010; Ashraf *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010).

Tolerancia a metales pesados

Hay plantas que pueden establecerse, crecer y desarrollarse en suelos que contienen altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos, lo que se denomina tolerancia (Hall, 2002). La tolerancia a metales pesados involucra diversos mecanismos de desintoxicación que principalmente impiden el aumento de las concentraciones de estos metales a niveles tóxicos en sitios celulares sensibles, evitando así, los efectos nocivos (Hall, 2002). Estos mecanismos regulan la absorción, el transporte y la concentración de metales pesados en las plantas y pueden ser: (1) externos: hongos micorrízicos; o (2) internos: exudados radiculares, enlaces con la pared celular, quelación y compartimentación en la vacuola (Hall, 2002; Hooda, 2007).

Mecanismos Externos

Los hongos micorrízicos son microorganismos que forman una asociación mutualista con varias especies de plantas, y que pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de colonización de la planta hospedera como: hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que colonizan intracelularmente las raíces de las plantas y hongos ectomicorrízicos (HEM), que colonizan el medio extracelular de la raíz (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). La secreción de sustancias quelantes como ácidos orgánicos, por parte del hongo micorrízico, o la adsorción de los iones metálicos a la pared celular de diferentes estructuras del hongo micorrízico (Hall, 2002), son

algunos de los mecanismos que se encuentran involucrados en la tolerancia a metales pesados en plantas. En el caso de los HMA se presentan mecanismos como: inmovilización extracelular de los metales mediante ácidos orgánicos y adsorción de los metales a la pared celular de diferentes estructuras del hongo como hifas y micelio extraradical, etcétera (Alvarado *et al.*, 2011; González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Por otro lado, los HEM presentan mecanismos como: retención del metal en el micelio externo o el apoplasto del hongo (restringiendo su entrada a la raíz) y secreción de quelantes como ácidos orgánicos, entre otros (Alvarado *et al.*, 2011; Hall, 2002; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

Mecanismos internos

Los exudados radicales son compuestos formados principalmente por ácidos orgánicos (AO) de bajo peso molecular, como el citrato, el oxalato y el malato, que pueden formar complejos con los metales pesados (Clemens, 2001; Hossain *et al.*, 2012). Los complejos AO-metal pueden facilitar la absorción, inhibir la adquisición, incrementar la retención intracelular e influir en el transporte a vacuolas de metales pesados (Ma *et al.*, 2005). Asimismo, pueden influir en la solubilidad, movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados mediante acidificación, precipitación o quelación en la rizósfera (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). Por ejemplo, se ha observado que plantas expuestas a metales como el Al o a metales pesados como el Ni presentan una mayor producción de AO, lo que se encuentra relacionado con una menor absorción de estos metales (Salt *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 1998).

La unión de los metales pesados a componentes de la pared celular, como la lignina y celulosa mediante enlaces covalentes, permite que los metales queden retenidos en el apoplasto de las células, lo que ayuda a reducir su translocación en la planta (Hossain *et al.*, 2012).

La quelación es la capacidad de una molécula para formar un complejo con un metal, formando así un nuevo compuesto de propiedades químicas diferentes al original (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). En la quelación participan: (1) moléculas transportadoras que se encargan de transferir iones específicos de metales a organelos que los requieran, como vacuolas, mitocondrias o cloroplastos (Clemens, 2001), y (2) ligandos de alta afinidad a metales pesados, como fitoquelatinas y aminoácidos (Lal, 2010), que contribuyen a la formación de complejos (quelante-metal), los cuales evitan la interacción de los metales con elementos celulares y ayudan a regular sus concentraciones citoplasmáticas (Ashraf *et al.*, 2010; Gasic y Korban, 2006).

Entre las moléculas transportadoras involucradas en la absorción y transporte de metales pesados en plantas se encuentran: los transportadores CDF, por sus siglas en inglés *Cation Diffusion Facilitator*, que están involucrados en el flujo de cationes de metales de transición como Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} y Ni^{+2} (Rascio y Navari-Izzo, 2011; Yang y Chu, 2011); los transportadores de la familia NRAMP, del inglés *Natural Resistance Associated Macrophage Protein*, involucrados en el transporte de iones divalentes como Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} y Cu^{+2} (Manara, 2012; Yang y Chu, 2011); las P-ATPasas, que utilizan la energía producida mediante la hidrólisis de ATP para translocar cationes (Herrera- Estrella y Guevara-García, 2009; Manara, 2012); y

las chaperonas que son una familia de proteínas solubles receptoras de metales, como COX17 y CCH, encargadas de llevar iones metálicos a organelos (p. ej. vacuolas) o proteínas que los requieran (Clemens, 2006; Gasic y Korban, 2006).

Mientras que los ligandos con alta afinidad a metales pesados incluyen fitoquelatinas, metalotioneínas, ácidos orgánicos y aminoácidos (Lal, 2010). Las fitoquelatinas son péptidos ricos en cisteína con una estructura general de $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$) (Hossain *et al.*, 2012), cuya síntesis es catalizada por la PC- sintasa, su sustrato es el glutatión (Hall, 2002) y su producción se ve inducida por la presencia de metales pesados como Cd, Ag, Cu, Ni, Pb y Zn (Hossain *et al.*, 2012). Las metalotioneínas son también péptidos ricos en cisteína, tienen bajo peso molecular y forman complejos con metales pesados (Hall, 2002; Hooda, 2007; Yang y Chu, 2011). Su síntesis se ve inducida por la presencia de Cd, Zn, Cu y Hg en el medio de crecimiento (Lal, 2010). En cuanto a los AO, se ha observado síntesis de ácidos orgánicos como el citrato y el malato en presencia de metales pesados como el Cd, Zn y Ni (Hossain *et al.*, 2012; Lal, 2010; Rascio y Navari-Izzo, 2011). Asimismo, algunos aminoácidos como la histidina, pueden ser ligandos de metales pesados, por ejemplo, se ha reportado un aumento en la concentración de histidina en plantas expuestas a Ni y Hg (Ashraf *et al.*, 2010; Clemens, 2006; Hossain *et al.*, 2012).

Compartimentación en la vacuola. Este es un mecanismo de tolerancia a metales pesados en plantas que permite evitar el daño de éstos en las células, ya que su transporte fuera del citoplasma y su compartimentación en la vacuola evitan que sus concentraciones intracelulares alcancen niveles tóxicos e interfieran con el metabolismo celular (Clemens, 2006; Hossain *et al.*, 2012).

Cobre

Entre los metales pesados que son micronutrientes esenciales para las plantas está el cobre, el cual, se encuentra involucrado en procesos fisiológicos como la fotosíntesis y la respiración (Hänsch y Mendel, 2009). Sus propiedades fisicoquímicas, como su capacidad de formar complejos estables con moléculas orgánicas, son las que se encuentran relacionadas con sus funciones en el metabolismo de las plantas, sin embargo, estas mismas propiedades también lo hacen altamente tóxico (Yruela, 2005).

Propiedades fisicoquímicas

El Cu es un metal de transición que se encuentra en la corteza terrestre en forma de sulfuros minerales, óxidos y silicatos a concentraciones entre 25-75 mg/Kg (Kabata-Pendias, 2011; Kopsell y Kopsell, 2007). Su número atómico es 29 y tiene un peso atómico de 63.55. Presenta estados de oxidación que usualmente son +1 (Cu^+) y +2 (Cu^{+2}) (Kopsell y Kopsell, 2007; Kabata-Pendias, 2011). Es un elemento altamente maleable y dúctil, posee una alta conductividad eléctrica y térmica, asimismo, es resistente a la corrosión y oxidación, y, además, tiene propiedades antimicrobianas (Kopsell y Kopsell, 2007).

Cobre en plantas

El cobre tiene alta afinidad para formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas, esto se debe a la elevada afinidad electrónica que presentan sus cationes mono y divalentes, además de su gran carácter oxidante, existiendo bajo condiciones fisiológicas en los estados de oxidación Cu^{+2} y Cu^{+} . Todas estas características determinan sus funciones en el metabolismo de las plantas y lo hacen un micronutriente esencial (Burkhead *et al.*, 2009; Kopsell y Kopsell, 2007; Marschner, 1995).

En plantas el Cu forma parte de enzimas, es componente redox en el transporte de electrones en la fotosíntesis y en la respiración, además, está involucrado en el mecanismo de detoxificación de radicales libres, el metabolismo de la pared celular, la señalización hormonal y en la reproducción (Hänsch y Mendel, 2009; Kabata-Pendias, 2011; Marschner, 1995).

Algunas de las enzimas en las que es cofactor son: la plastocianina, la citocromo c oxidasa, la cuprozinc superóxido dismutasa (CuZnSOD), la ascorbato oxidasa, la polifenol oxidasa, la amino oxidasa, la lacasa y la diamino oxidasa (Marschner, 1995; Taiz y Zeiger, 2010), las cuales también son conocidas como cuproproteínas (Marschner, 1995).

Cuproproteínas

- **Plastocianina:** Oxidoreductasa involucrada en el transporte de electrones durante la fotosíntesis, está localizada en el lumen tilacoidal y se encarga de transferir electrones entre el complejo citocromo *b₆f* y el PSI (P700) (Burkhead *et al.*, 2009; Hänsch y Mendel, 2009; Marschner, 1995).
- **Plantacianina:** Fitocianina localizada en el apoplasto del polen que participa en el desarrollo de la antera y en guiar el tubo polínico (Andrés-Colás, 2008).
- **Ascorbato oxidasa:** Oxidasa que cataliza la oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Está localizada en la pared celular y en el citoplasma, que también puede actuar como oxidasa terminal en la cadena respiratoria (Marschner, 1995).
- **Lacasa:** Oxidasa que cataliza la oxidación de varios fenoles, se localiza en la pared celular y participa en la biosíntesis de lignina (Andrés-Colás, 2008; Burkhead *et al.*, 2009; Giardina *et al.*, 2010).
- **Citocromo c oxidasa:** Oxidasa que cataliza la transferencia de electrones en la mitocondria, en cuya membrana se encuentra localizada (Andrés-Colás, 2008; Burkhead *et al.*, 2009; Marschner, 1995).
- **Diamino oxidasa:** Oxidasa localizada en el apoplasto de la epidermis y en el xilema de tejidos maduros, cataliza la oxidación aeróbica de poliaminas y aldehídos. Está involucrada en los procesos de lignificación y suberización (Cona *et al.*, 2006; Marschner, 1995).

- **Polifenol oxidasa:** Oxidasa involucrada en la biosíntesis de lignina (Marschner, 1995).
- **CuZnSOD (cuprozinc superóxido dismutasa):** Enzima localizada en el citoplasma, mitocondrias y los cloroplastos, está involucrada en el mecanismo de defensa a especies reactivas de oxígeno, catalizando la dismutación del radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), disminuyendo así, la formación del radical hidroxilo ($\cdot OH$) mediante la reacción de Haber Weiss, por la eliminación del (H_2O_2) mediante la catalasa (CAT), o la ascorbato peroxidasa (APX) (Burkhead *et al.*, 2009; Marschner; 1995).
- **Receptor de etileno (ETR1 del inglés *ethylene response 1*):** Proteína localizada en el retículo endoplásmico cuyo centro de Cu sirve para la unión reversible del etileno (Andrés-Colás, 2008).
- **Cofactor de molibdeno (Mo) (MoCo por sus siglas en inglés *molybden cofactor*):** El cobre está involucrado en la síntesis de este cofactor, lo que lo relaciona con la asimilación de nitrógeno y la síntesis de fitohormonas (Andrés-Colás, 2008).

Absorción y transporte del cobre en las plantas

El cobre es adquirido por las plantas a partir del suelo y es absorbido principalmente en la forma iónica Cu^{+2} . Su biodisponibilidad depende de las propiedades fisicoquímicas del suelo, como son el contenido de materia orgánica y el pH (Burkhead *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2008; Marschner, 1995). Aunque todavía no se tienen bien identificados todos los mecanismos de adquisición y transporte de cobre

en las plantas se considera un proceso activo en el cual pueden estar involucradas varias moléculas transportadoras de metales pesados (Burkhead *et al.*, 2009; Yruela, 2005).

Se propone que una vez que el cobre es movilizado a partir de los recursos minerales del suelo, éste entra al citosol de las células de la raíz mediante los transportadores de membrana de la familia COPT como, COPT1, COPT3 y COPT5, aunque también se ha reportado que los transportadores de la familia ZIP, como ZIP2 y ZIP4, están involucrados (Andrés-Colás, 2008; Burkhead *et al.*, 2009; Palmer y Guerinot, 2009). Una vez en el interior de las células de la raíz, el cobre puede quedar secuestrado dentro de las células, o ser transportado vía simplástica por transportadores de la familia de las P-ATPasas, como HMA5 (Burkhead *et al.*, 2009; Yruela, 2005) o quelantes, como la nicotianamina (NA), con los cuales forma complejos que son descargados y transportados por el xilema (Burkhead *et al.*, 2009; Palmer y Guerinot, 2009).

En cuanto a su transporte en el simplasto de hojas y otros órganos de la parte aérea, se considera que se lleva a cabo mediante los transportadores COPT, mientras que en el transporte del floema están implicadas chaperonas, como CCH, y metalotioneínas como MT1 y MT2b (Burkhead *et al.*, 2009).

Una vez que el cobre es transportado en los diferentes tejidos, debe ser distribuido a nivel subcelular en los sitios que es requerido, y debe de mantener su concentración dentro del rango óptimo (Palmer y Guerinot, 2009) para evitar deficiencia o toxicidad, por lo que los mecanismos involucrados en su homeostasis son muy importantes.

Homeostasis del Cu

La homeostasis del cobre está conformada por mecanismos que regulan su absorción y la distribución en las células (p. ej. entrega en sitios donde es requerido, prevención de acumulación o acumulación en sitios celulares en los que no cause daños) (Andrés-Colás, 2008).

La red homeostática del cobre incluye: transportadores de membrana, como HMA5, HMA6 y HMA7, COPT, ZIP2 y ZIP4, las chaperonas CCH, COX17 y CCS, las metalotioneínas, MT1, MT2b, fitoquelatinas y enzimas como la CuZnSOD, la APX y la CAT (Andrés-Colás, 2008), que permiten que las concentraciones de cobre en las células de las plantas se mantengan dentro del rango óptimo (entre 4 y 20 mg de Cu/kg de peso seco) (Marschner, 1995), evitando así, la deficiencia o la toxicidad por cobre en las plantas (Figura 2).

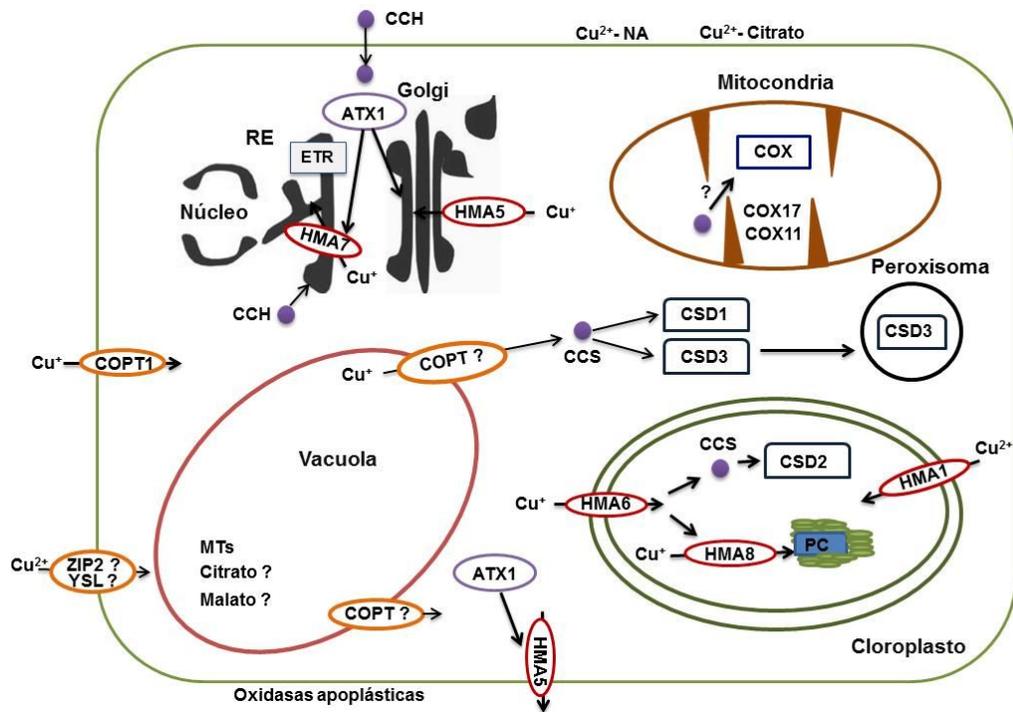


Figura 2.- Homeostasis de cobre en una célula de *A. thaliana*. Las flechas indican la dirección propuesta para el transporte del metal, mientras que los signos de interrogación indican los mecanismos que todavía no han sido identificados. Se propone que el Cu es transportado al interior de la célula por el transportador COPT. Posteriormente el cobre es distribuido intracelularmente por las cuprochaperonas COX17, CCH, ATX1 y CCS (marcados en morado), transportadores de membrana específicos, como las P-ATPasas HMA1, HMA5, HMA6, HMA7, HMA8 (marcados en rojo) y transportadores de alta afinidad de la familia COPT (marcados en anaranjado), hasta llegar a las cuproproteínas (enmarcadas en azul): la plastocianina (PC), el receptor de etileno (ETR); la citocromo c oxidasa (COX); las CuZn superóxido dismutasas, citosólica (CSD1), cloroplástica (CSD2) y peroxisomal (CSD3) y las oxididasas apoplásticas. RE; Retículo endoplasmático; NA, nicotinamina; MTs, metalotioneínas. Tomado y adaptado de Yruea (2009).

Deficiencia de Cobre

La deficiencia de cobre en plantas (concentraciones entre 1-5 mg de Cu/kg de peso seco) afecta procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración, transporte de agua y nutrientes, y la reproducción, afectando la síntesis de plastocianina y

pigmentos fotosintéticos como la clorofila (Yruela, 2005), asimismo, disminuye la tasa de crecimiento, la fijación de carbono, reduce el transporte de electrones (Burkhead *et al.*, 2009; Kopsell y Kopsell, 2007), limita la actividad de las enzimas: SOD, citocromo c oxidasa, plastocianina y ascorbato oxidasa (Kopsell y Kopsell, 2007); además, afecta la lignificación, el desarrollo del polen, la formación de frutos y la viabilidad de semillas (Burkhead *et al.*, 2009).

Algunos de los síntomas que presentan las plantas con deficiencia de cobre son: crecimiento retardado, clorosis, necrosis, enrollamiento de hojas, marchitamiento, puntos blancos en hojas jóvenes, pérdida de turgor y retraso de la senescencia (Burkhead *et al.*, 2009; Kabata-Pendias, 2011; Kopsell y Kopsell, 2007; Marschner, 1995; Taiz y Zeiger, 2010).

Toxicidad de cobre en plantas

La toxicidad por Cu en plantas (concentraciones > 30 mg de Cu/kg de peso seco) causa una reducción en el crecimiento celular (Martins *et al.*, 2012) y por lo tanto en el crecimiento en general (Dal Corso, 2012; Kopsell y Kopsell, 2007; Myśliwa-Kurdziel y Strzałka, 2002), generando efectos como: disminución en la producción de biomasa (Kabata-Pendias, 2011; Liu *et al.*, 2004; Vera, 2006; Vinod *et al.*, 2012), en la expansión foliar y en el peso fresco y/o seco total (Dey *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2008; Khatun *et al.*, 2008; Kopsell y Kopsell, 2007; Orroño, 2002). Asimismo, ocasiona cambios estructurales en la pared celular, además de daños en la membrana celular (Bouazizi *et al.*, 2011; Kaplan *et al.*, 2010) que provocan cambios

en su permeabilidad, ocasionando fuga de iones e inhibición del transporte de electrones (Dal Corso, 2012; Kabata-Pendias, 2011; Liu *et al.*, 2004).

Otros efectos tóxicos incluyen la producción de ROS, lo cual puede provocar estrés oxidativo (Dal Corso, 2012; Hattab *et al.*, 2009; Kabata-Pendias, 2011; Kopsell y Kopsell, 2007; Marschner, 1995; Orroño, 2002), y alteraciones en la fijación de carbono y el metabolismo de nitrógeno debido a afectaciones en la actividad enzimática y la función de proteínas como: la RuBisCO, la PEPC y la nitrato reductasa (Dal Corso, 2012).

En el aparato fotosintético puede producir cambios en la permeabilidad de membranas, degradación de lamelas y de proteínas extrínsecas del centro de evolución de oxígeno, disminución del tamaño de las antenas y del contenido de clorofila y otros pigmentos fotosintéticos. De igual manera produce alteraciones en la estructura de cloroplastos, y puede sustituir al Mg en la clorofila (Dey *et al.*, 2015; Hattab *et al.*, 2009; Kopsell y Kopsell, 2007; Liu *et al.*, 2004; Marschner, 1995; Yruela, 2005). También inhibe la transferencia de electrones interrumpiendo su transporte entre el PSII y el PSI. En el PSII, inhibe el centro de evolución del oxígeno, afecta la ferredoxina, la quinona B, la tirosina, las propiedades redox del citocromo *b*₅₅₉ (Dal Corso, 2012; Yruela, 2005), y produce una disminución de la Fv/Fm (Dal Corso, 2012; Mateos-Naranjo *et al.*, 2008; Mijovilovich *et al.*, 2009; Sánchez-Viveros *et al.*, 2010). Además, puede estimular los efectos adversos generados por la fotoinhibición, lo que se propone se debe a la formación de radicales ·OH, o a la disminución en el contenido de clorofila (Dal Corso, 2012; Yruela, 2005). Todo lo mencionado anteriormente conlleva a una disminución en la tasa y en la eficiencia

fotosintética de las plantas (Dey *et al.*, 2015; Hattab *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2004; Marschner, 1995).

Por otro lado, el cobre también afecta la conductancia estomática (Vinod *et al.*, 2012), provoca desbalance en la absorción de agua (Orroño, 2002) y nutrientes como K, Ca, P, Mg, Fe y Zn (Kabata-Pendias, 2011; Kaplan *et al.*, 2010; Marschner, 1995; Mateos-Naranjo *et al.*, 2008; Sonmez, 2007), e induce una disminución en el contenido de carbohidratos (Vinod *et al.*, 2012). Además, puede causar un incremento o disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como: CAT, APX, SOD y POD (Dey *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2008; Kabata-Pendias, 2011; Liu *et al.*, 2004; Nagajyoti *et al.*, 2010).

La clorosis, necrosis, el desarrollo retardado, la inhibición de la elongación radicular y del tallo, la disminución del área foliar, el número de hojas y de raíces, son algunos de los síntomas que las plantas presentan por la toxicidad del cobre (Dal Corso, 2012; Kabata-Pendias, 2011; Mateos-Naranjo *et al.*, 2008; Marschner, 1995).

Tolerancia al cobre en las plantas

Algunos de los mecanismos de tolerancia al Cu que presentan las plantas son: la exudación de ácidos orgánicos, la asociación con micorrizas, la acumulación en la pared celular, la síntesis de fitoquelatinas y metalotioneínas, las moléculas transportadoras como chaperonas y transportadores de membrana como las P-ATPasas, la compartimentación en vacuolas y la disminución de la translocación de Cu de raíz al tallo.

En lo que respecta a los ácidos orgánicos, se ha observado que el cobre puede estimular su exudación por la raíz, principalmente la del citrato (Murphy y Taiz, 1995; Yruela, 2005).

En cuanto a las micorrizas, se ha reportado que la asociación con hongos micorrízicos como *Glomus spp* contribuye en la absorción, la disminución de la adquisición, la translocación de raíz a tallo, y la acumulación o disminución en la acumulación de cobre en las raíces (Gardezi *et al.*, 2006; Pineda, 2004; Yruela, 2005).

La presencia de cobre también puede inducir la síntesis de metalotioneínas y fitoquelatinas (Burkhead *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2012), por ejemplo, en *A. thaliana* (Brassicaceae) se reporta un aumento en la expresión de genes que codifican para las metalotioneínas MT1a y MT2b, además de inducir la síntesis de fitoquelatinas (Guo *et al.*, 2008). Mientras que en *Medicago sativa* y *Lathyrus sativus* (Fabaceae), la presencia de Cu causa un aumento en la síntesis de fitoquelatinas (Beladi *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha reportado la acumulación de Cu en la pared celular de células de la raíz (Lou *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005) y de las hojas (Bouazizi *et al.*, 2011); y también, en la membrana plasmática de las células de la raíz, como en el caso de *Lolium muhiflorum* Lam. (raigrás italiano) (Poaceae) y *Trifolium pratense* L. (trébol rojo) (Fabaceae) (Iwasaki *et al.*, 1990).

Por otra parte, la presencia de Cu puede generar un aumento en la síntesis y la acumulación de proteínas de choque térmico (Heckathorn *et al.*, 2004; Hossain *et al.*,

2012), como en el caso del maíz (*Zea mays*, Poaceae), en el cual el aumento en la concentración de cobre causó un aumento en la acumulación de estas proteínas, las cuales se propone podrían prevenir la desnaturalización de proteínas provocada por el estrés oxidativo, o bien, limitar el daño en la fotosíntesis (Heckathorn *et al.*, 2004).

Por otro lado, los transportadores de membrana como las P-ATPasa y COPT, además de las chaperonas como COX17 y CCH, son moléculas que también participan en la tolerancia al cobre, ya que se encuentran involucradas en la absorción, la removilización y la compartimentalización del metal en organelos, principalmente en las vacuolas (Burkhead *et al.*, 2009; Clemens, 2006; Hossain *et al.*, 2012; Maestri *et al.*, 2010; Yruela, 2005). Respecto a esto se ha reportado la compartimentalización de Cu en las vacuolas de células de raíz y de hojas (Boojar y Goodarzi, 2007).

Igualmente, se ha observado que la presencia de cobre puede inducir un aumento en la actividad de proteínas antioxidantes (Hossain *et al.*, 2012; Yruela, 2005; Zhao *et al.*, 2010), como SOD, POD, CAT y APX (Boojar y Goodarzi, 2007; Ke *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2012).

Por último, Yang *et al.*, (2002) proponen que la capacidad de *Elsholtzia splendens* Nakai (Lamiaceae) de mantener la concentración de otros nutrientes esenciales, como Ca, Mg y P dentro del rango de suficiencia influye en su capacidad de acumulación y tolerancia al cobre.

***Fagopyrum esculentum* Moench**

Fagopyrum esculentum Moench conocido comúnmente como trigo sarraceno o alforfón, es una planta herbácea anual originaria de Asia (Campbell, 1997; Matsuura *et al.*, 2005; Pavek, 2014;), se encuentra distribuida ampliamente en el Centro y Sur de Asia en regiones montañosas templadas con suelos ácidos y pobres en nutrientes (Vogel-Mikuš *et al.*, 2009).

Pertenece a la familia Polygonaceae, esta herbácea tiene un ciclo de vida corto (3-4 meses) (Campbell, 1997; Matsuura *et al.*, 2005); su plántula emerge entre los tres y cinco días después de la siembra, mientras que la producción de hojas generalmente ocurre durante la tercera y la sexta semana y la floración entre las cuatro y las seis semanas (después de la siembra), y continúa hasta las 15 semanas (Cawoy *et al.*, 2009; Pavek, 2014).

Alcanza un metro de altura, tiene un tallo principal erguido, estriado y hueco (Campbell, 1997), sus hojas son pecioladas o sésiles (las jóvenes) con láminas triangulares u ovado-triangulares de 2-8 cm de largo con puntas acuminadas y bases cordadas (Campbell, 1997; Ratan y Kothiyal, 2011). Presenta inflorescencias terminales o axilares en forma de panículas con flores pediceladas de color blanco o rosa con 6 mm de diámetro y 8 nectarios amarillos; sus frutos son aquenios triangulares de color café (Campbell, 1997; Cawoy *et al.*, 2009) (Figura 3).

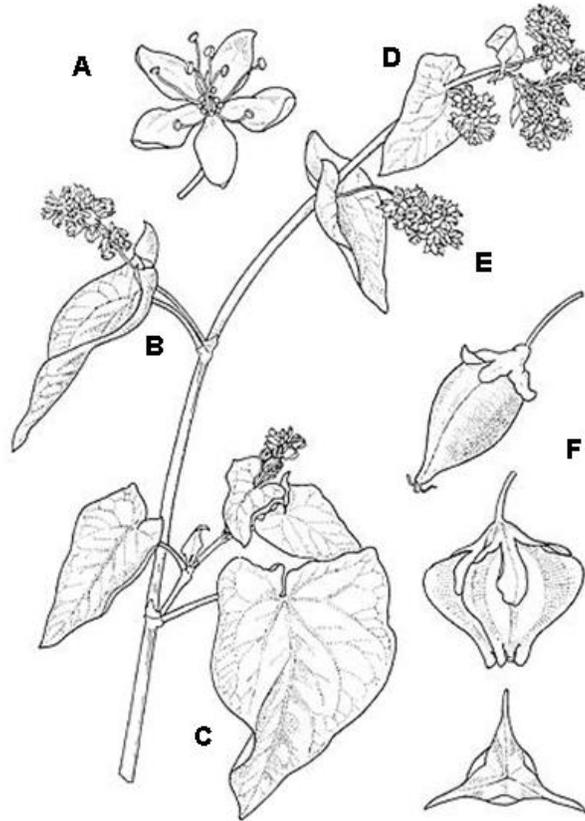


Figura 3.- *Fagopyrum esculentum* Moench. A) Flor, B) Rama con inflorescencia, C) Hoja pecioladas, D) Hoja sésil, E) Inflorescencia, F) Frutos. (Tomada de PROTA database (<http://www.prota4u.info/>)).

Es una planta de importancia económica secundaria cuya semilla es utilizada en la producción de harina y bebidas alcohólicas como cerveza. Sus hojas y tallos son consumidos como hortaliza y sus flores son utilizadas para producir miel. Además, sus hojas, tallos, flores y semillas son utilizados en el tratamiento de desórdenes vasculares debido a su alto contenido en flavonoides (Campbell, 1997; Ratan y Kothiyal, 2011).

También, es utilizada como cultivo de reemplazo, cultivo de sofoco, abono verde y forraje para ganado y aves de corral (Campbell, 1997; Quinet *et al.*, 2004; Ratan y Kothiyal, 2011).

ANTECEDENTES

F. esculentum es una planta que presenta tolerancia al aluminio y al plomo. Se tiene reportado que hay tanto mecanismos externos como internos involucrados en su tolerancia y acumulación de aluminio. Bajo condiciones de estrés por aluminio se ha observado la exudación de ácido oxálico por parte de las raíces (mecanismo externo), además de la formación de complejos Al-oxalato (1:3) en raíces y hojas y Al-citrato (1:1) en el xilema, y la acumulación de Al, en forma de Al-oxalato, en hojas (mecanismos internos) (Ma *et al.*, 1998; Ma e Hiradate, 2000; Shen *et al.*, 2004).

En cuanto a su tolerancia al plomo, se observó que plantas creciendo en un suelo contaminado con plomo, no mostraron inhibición en su crecimiento, y además presentaron acumulación del metal en raíces, tallo y mayormente en sus hojas. Se determinó que es una planta hiperacumuladora de este metal debido a que acumuló más de 1000 mg de Pb/Kg en su parte aérea (8,000 mg/Kg en peso seco de hojas y 2,000 mg/Kg en peso seco de tallo) (Tamura *et al.*, 2005). A nivel molecular se ha reportado que el gen homólogo FeABCC1 de una Mrp se encuentra involucrado en la tolerancia de *F. esculentum* al Pb (Mizuno *et al.*, 2010).

En cuanto a otros estudios con metales pesados en esta especie, Tani y Barrington (2005), realizaron un estudio para cuantificar la absorción de Zn y Cu en plantas de *F. esculentum* de cuatro semanas de vida, irrigadas con tratamientos de 0 y 25 mg/L

de Zn, combinados con uno o cuatro niveles de Cu (0, 5, 10, 15 mg/L) bajo dos tasas de transpiración (tratando a las plantas con bajo o alto déficit de presión del vapor). Dichos autores observaron que los metales pesados no afectaron la tasa de transpiración ni el peso seco del tallo y hojas, sin embargo, la masa seca de las plantas expuestas a 15 y 30 mg/L de Cu con y sin 25 mg/L Zn fue menor, lo que encontraron estaba relacionado con la disminución en el pH del suelo. Asimismo, observaron que el contenido de Cu y Zn en tallos y hojas aumentó con el tiempo, así como con la tasa de transpiración, siendo las raíces las que tenían un mayor contenido tanto de Cu como de Zn.

Por otra parte, Nikolić *et al.*, (2010) observaron que la metalotioneína FeMT3 de *F. esculentum* aumentó la tolerancia de *E. coli*, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) y *Saccharomyces cerevisiae* cup1Δ al cobre y al cadmio; además, la sobreexpresión de FeMT3 en hojas de *Nicotiana debneyii* (Solanaceae) hizo que mejorara significativamente su tolerancia al Cu y Cd. Asimismo, dichos autores observaron que tanto el Cu como el Cd influyeron en el nivel de transcripción de FeMT3 en hojas de *F. esculentum*, observándose un aumento de su transcripción a mayor concentración de Cu.

Al ser una planta tolerante y acumuladora de metales (Al) y metales pesados (Pb), fue de interés determinar si esta planta podría tolerar altas concentraciones de cobre sin producir daños en su crecimiento y desarrollo, y también si podría acumular el metal en sus tejidos; lo cual permitiría saber más sobre la respuesta a metales pesados en esta especie. Además, esta información podría ser de ayuda para considerar a esta especie como fitoremediadora de suelos contaminados por cobre,

o bien, como fuente de genes que codifiquen proteínas involucradas en la homeostasis del cobre.

HIPÓTESIS

Con base en estudios previos sobre la respuesta fisiológica de plantas al cobre y a los antecedentes de *F. esculentum* se propone que:

- I. Las plantas de *F. esculentum* sobrevivirán y mantendrán un crecimiento y eficiencia fotosintética adecuados, bajo distintas concentraciones de Cu.
- II. *F. esculentum* acumulará el cobre en sus raíces y hojas.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Evaluar los efectos del cobre en el crecimiento y la actividad fotosintética de *F. esculentum* durante su ciclo de vida, así como su acumulación en los diferentes órganos.

- **Objetivos particulares**

Determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre durante el ciclo de vida de *F. esculentum*.

Evaluar la actividad fotosintética de *F. esculentum* en plantas expuestas a distintas concentraciones de cobre.

Analizar la presencia de Cu en hojas y raíces de *F. esculentum*

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Material biológico**

Para este estudio se utilizaron semillas de *F. esculentum* var. Mancan, obtenidas de Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá.

- **Sustrato de crecimiento**

Como sustrato de crecimiento se utilizó agrolita y peatmoss en proporción 1:1, el cual fue esterilizado en una autoclave a 121° C y 25 PSI de presión por 3 h totales (dos rondas de 1 h 30 min).

- **Germinación**

Se colocaron 1000 semillas de *F. esculentum* en cajas de Petri con una base de papel filtro. Cada caja contenía 20 semillas y 10 mL de agua bidestilada. Posteriormente, éstas se colocaron en la oscuridad en una cámara de crecimiento (Lab-Line®, Biotronette 844) a una temperatura de 27 °C durante 72 h.

- **Diseño experimental**

Se realizó un experimento completamente al azar en un invernadero controlado del Instituto de Ecología de la UNAM.

De las semillas que germinaron se seleccionaron las plántulas que presentaban tamaños homogéneos y se trasplantaron 5 plántulas por maceta; en macetas con capacidad de (+/-) 2L que contenían 550 g de sustrato previamente regado con 400

mL de agua bidestilada (para que estuviese húmedo al momento del trasplante). Posteriormente se realizó un aclareo y se dejó una plántula por maceta.

El experimento constó de 5 tratamientos (control y cuatro concentraciones distintas de CuSO_4), dichas concentraciones se seleccionaron en base a lo reportado por Meza-Figueroa *et al.* (2009) en jales mineros y la zona urbana cercana a estos en la región de Nacozari, Sonora, México, donde se reportaron concentraciones de Cu de entre 47 a 2,317 mg/kg de suelo. Cada tratamiento consto de 10 repeticiones y la unidad experimental fue una planta por maceta.

Los tratamientos fueron: 0 μg Cu/g de suelo (control), 100 μg Cu/g de suelo; 500 μg Cu/g de suelo; 1000 μg Cu/g de suelo y 2000 μg Cu/g de suelo. El control fue solución Hoagland a (1/ 5) de su fuerza iónica (Tabla 1) ajustada a un pH 4.5, y para los tratamientos de cobre se preparó una solución stock de CuSO_4 de concentración 0.01 M y solución nutritiva Hoagland a (1/5) de su fuerza iónica, sin CuSO_4 ajustada a pH 4.5; de acuerdo con la concentración de cada tratamiento, se tomó la alícuota necesaria de la solución stock de CuSO_4 [0.01M] y se añadió directamente a los mililitros de solución Hoagland con los que se regaba.

Las plantas se regaron tres veces por semana. Para los tratamientos con diferentes concentraciones de cobre, dos veces por semana se regó con solución nutritiva basal y una vez por semana se aplicó el riego con la mezcla Hoagland- CuSO_4 correspondiente a cada concentración. La humedad relativa del sustrato (óptima entre 60 y 80%) se monitoreó con un medidor electrónico de humedad sav·a·plant II

TM.

Los tratamientos se mantuvieron por un tiempo de 43 días.

Tabla 1.- Solución nutritiva Hoagland a 1/5 de su fuerza iónica. Tomado y modificado de Martínez, 2013.

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

- **Análisis de crecimiento**

Con el objetivo de evaluar los efectos del CuSO₄ en el crecimiento de *F. esculentum* se realizó un análisis de crecimiento clásico con base en los parámetros propuestos por Hunt (1990) y Evans (1972). Este análisis permite obtener información sobre aspectos morfológicos y fisiológicos del crecimiento de las plantas a partir de datos obtenidos durante intervalos relativamente largos de tiempo (Hunt, 1990).

Para llevar a cabo este análisis se realizaron dos cosechas correspondientes al tiempo inicial (t_1) (19 días de vida de la planta), y al tiempo final (t_2) (62 días de vida de la planta), en las cuales se separaron las plantas por órganos (hojas, tallo, raíz e inflorescencias); 10 plantas para la cosecha inicial, y 10 plantas por tratamiento para la cosecha final. De cada uno de los órganos se registró el peso fresco y el peso seco, y, para la medición de área foliar (en cm^2) se utilizó un medidor de área foliar portátil (Li-Cor modelo Li-3000 A1).

Tasa absoluta de crecimiento (AGR) por sus siglas en inglés Absolut Growth Rate: Parámetro que describe el incremento de biomasa por unidad de tiempo (g día^{-1}), se calcula con la fórmula:

$$AGR = \frac{(W_2 - W_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Ecuación 1

Donde W_2 es el peso seco final (g), W_1 el peso seco inicial (g), T_2 el tiempo final (día^{-1}) y T_1 el tiempo inicial (día^{-1}).

Tasa relativa de crecimiento (RGR) por sus siglas en inglés Relative Growth Rate: Parámetro que indica el incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total por unidad de tiempo ($\text{g g}^{-1} \text{día}^{-1}$). Se calcula con la siguiente ecuación:

$$RGR = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Ecuación 2

Donde $\ln W_2$ es el logaritmo natural del peso seco total final (g) y $\ln W_1$ el del peso seco total inicial (g), T_2 es el tiempo final (día^{-1}) y T_1 el inicial (día^{-1}).

Tasa de asimilación neta (NAR) por sus siglas en inglés Net Assimilation Rate:

Parámetro fisiológico de la tasa relativa de crecimiento que indica la tasa de producción de biomasa por unidad de área foliar por unidad de tiempo ($\text{g cm}^2 \text{día}^{-1}$), el cual se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$NAR = \frac{(W_2 - W_1)}{(T_2 - T_1)} * \frac{(\ln LA_2 - \ln LA_1)}{(LA_2 - LA_1)}$$

Ecuación 3

Donde W_1 y W_2 indican el peso seco total (g) inicial (1) y final (2), T_2 el tiempo final (día^{-1}) y T_1 el tiempo inicial (día^{-1}); y LA_2 y LA_1 el área foliar total (cm^2) final e inicial, $\ln LA_2$ y $\ln LA_1$ los logaritmos naturales de los mismos parámetros de área foliar.

Proporción de área foliar (LAR) por sus siglas en inglés Leaf Area Rate: Parámetro morfológico que expresa la relación entre el área foliar total y la biomasa seca total de la planta ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$LAR = \frac{\left(\frac{LA_1}{W_1}\right) + \left(\frac{LA_2}{W_2}\right)}{2}$$

Ecuación 4

Donde LA_1 y LA_2 indican el área foliar total inicial y final (cm^2), W_1 y W_2 el peso seco total inicial y final de la planta (g).

Área foliar específica (SLA) por sus siglas en inglés Specific Leaf Area: Parámetro que expresa la relación entre el área foliar total y el peso seco total de las hojas ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), se calcula con la fórmula:

$$SLA = \frac{\left(\frac{LA_1}{LW_1}\right) + \left(\frac{LA_2}{LW_2}\right)}{2}$$

Ecuación 5

Donde LA_1 y LA_2 indican el área foliar total (cm^2) inicial y final y LW_1 , y LW_2 el peso seco total inicial y final de hojas (g).

Proporción de peso foliar (LWR) por sus siglas en inglés Leaf Weigth Ratio:

Parámetro que indica la relación entre el peso seco total de las hojas y el peso seco total de la planta (g g^{-1}), se calcula con la siguiente fórmula:

$$LWR = \frac{\left[\left(\frac{LW_1}{W_1}\right) + \left(\frac{LW_2}{W_2}\right)\right]}{2}$$

Ecuación 6

Donde LW_1 es el peso seco inicial de las hojas (g) y LW_2 el peso seco final de hojas (g), W_1 es el peso seco inicial de la planta (g) y W_2 el peso seco final (g).

Coficiente alométrico (CA): Parámetro que indica la relación entre el crecimiento de la raíz y el de la parte área. Cuando el valor de este parámetro es 1 quiere decir que el crecimiento entre raíz y parte área es equivalente, si el valor es <1 significa que la parte área crece más que la raíz, y si el valor es >1 , entonces es la raíz la que presenta mayor crecimiento. Este índice se calcula con la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{RW}{(SW + LW)}$$

Ecuación 7

Donde RW, es el peso seco total (g) de la raíz, SW el del tallo y LW el de las hojas.

Asignación de biomasa: Describe la proporción de peso seco asignado a cada uno de los órganos de la planta. Se calcula mediante las siguientes fórmulas:

$$RWR = \frac{RW}{W}$$

Ecuación 8

$$SWR = \frac{SW}{W}$$

Ecuación 9

$$LWR = \frac{LW}{W}$$

Ecuación 10

$$FWR = \frac{FW}{W}$$

Ecuación 11

Donde W es el peso seco total de la planta (g), RW, SW, LW y FW indican el peso seco total (g), raíz, tallo, hojas y flores respectivamente.

- **Análisis de fluorescencia de la clorofila a**

Con el fin de evaluar los efectos del CuSO_4 en la actividad fotosintética de *F. esculentum* se realizaron mediciones *in situ* de la fluorescencia de la clorofila *a* utilizando un fluorímetro (Handy PEA Chlorophyll Fluorimeter, Hansatech Instruments, Ltd) (Figura 4A).

Para hacer las mediciones de fluorescencia de la clorofila *a* se seleccionaron al azar cinco plantas de cada tratamiento. Cada semana se tomaron las plantas seleccionadas y se colocaron (dos clips por planta) en las primeras hojas verdaderas (uno por cada hoja), los cuales se dejaron durante 1 hora (Figura 4B) para adaptar las hojas a la oscuridad, y posteriormente se realizaron las mediciones con el fluorímetro, utilizando un haz luminoso de 650 nm de longitud de onda e intensidad de $3000 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se realizaron 6 mediciones a lo largo del experimento.

Las variables registradas a partir de la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* fueron:

F_o: Este parámetro representa el valor de origen de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, es decir el valor de fluorescencia cuando la Q_A esta oxidada al máximo, por lo que se requiere la previa adaptación a la oscuridad, la cual permite asegurar que los aceptores estén completamente oxidados (Baker, 2008).

F_m: Es el valor de la fluorescencia máxima, el cual representa el nivel de fluorescencia cuando la Q_A se encuentra completamente reducida (Baker, 2008).

F_v: La fluorescencia variable representa el valor que se obtiene de la diferencia entre *F_m* y *F_o* (Baker, 2008).

F_v/F_m: Parámetro que indica la eficiencia cuántica máxima del PSII, es la eficiencia máxima de los centros de reacción del PSII para catalizar la transferencia de electrones. Este valor es considerado como un indicador sobre el estado del PSII, y, por tanto, de la actividad fotosintética (Baker, 2008). Es utilizado para evaluar los efectos de diferentes tipos de estrés en la fotosíntesis, ya que generalmente, cuando las plantas se encuentran estresadas se observa una disminución en este parámetro. Los valores de *F_v/F_m* en plantas no estresadas son de entre 0.78 a 0.85 (Percival, 2004).

PI: El índice de potencial fotosintético toma en cuenta tres parámetros, que son: la densidad de centros de reacción totalmente activos, la probabilidad de que un fotón absorbido sea atrapado por el centro de reacción, y la eficiencia de que la energía de excitación mueva un electrón más allá de la quinona A en la cadena de transporte de electrones (Ceacero *et al.*, 2012).

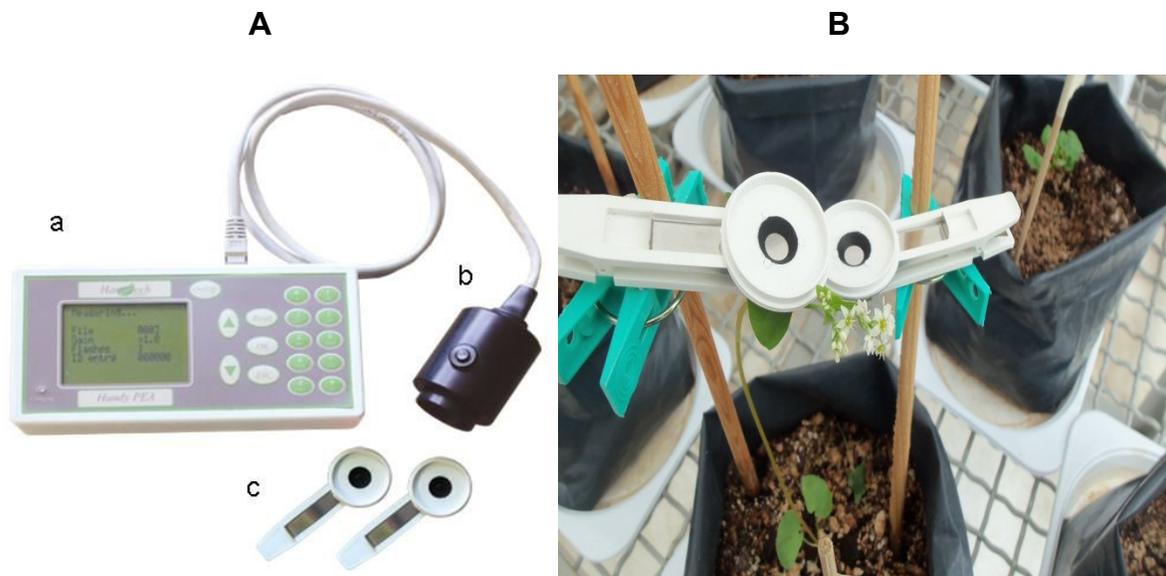


Figura 4.- A) Fluorímetro portátil Handy Pea, (a) Unidad de control, (b) Sensor de calor, (c) Clip para las hojas. (Tomado de Hansatech Instruments, <http://www.hansatech-instruments.com>). B) Clips en hojas de *F. esculentum* para la toma de datos con el fluorímetro.

- **Análisis de elementos químicos en hojas y raíz de *F. esculentum*.**

Con el fin de determinar la concentración de cobre y otros elementos químicos en las hojas y raíz de *F. esculentum* se realizó un análisis mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X (XFR) por dispersión de energía, empleando el sistema SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos X) (Figura 5A). El análisis se realizó en el departamento de Física experimental del Acelerador Peletrón en el Instituto de Física de la UNAM.

La técnica de fluorescencia de rayos-X (XFR) por dispersión de energía consiste en incidir un haz de rayos-X sobre la superficie de una muestra lo cual provoca que los átomos capaces de absorber los rayos-X pasen de un estado fundamental (estable) a uno excitado o de mayor energía (inestable) debido a la salida de electrones de

capas internas del átomo, al suceder esto se genera una diferencia de energía la cual es emitida en forma de radiación X (fluorescencia de rayos-X), y es única para cada elemento (Sánchez-Viveros, 2012). Esta técnica permite obtener información sobre la composición (longitud de onda de la radiación X emitida) y sobre la proporción (intensidades de los rayos-X) de los elementos químicos presentes en una muestra (Sánchez-Viveros, 2012).

Para llevar a cabo el análisis de elementos químicos en hojas y raíces primero se prepararon las muestras. Una vez que se registraron los pesos secos finales de hojas y raíces de todos los tratamientos, estos se molieron en un mortero de ágata. Posteriormente, el material fue comprimido en pastillas, utilizando una prensa hidráulica de 12 toneladas (TRUPER®, México), en el Laboratorio de preparación de muestras en el Instituto de Física de la UNAM.

Cada pastilla se analizó con el sistema SANDRA (Figura 5A). Este sistema está conformado por un tubo de rayos-X de Mo ($17.5 \text{ K}\alpha$ de keV) con una ventana de $125 \mu\text{m}$ de Be (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010). La distancia y la región de análisis a la cual se colocaron las pastillas del colimador se determinaron por la intersección de dos láseres (Figura 5B). El área analizada correspondió a tres puntos por pastilla, con un tiempo de lectura de tres minutos por punto, tiempo adecuado para determinar los elementos detectables por esta técnica con un error estadístico menor al 5% (Ruvalcaba-Sil, *et al.*, 2010). El diámetro del haz de rayos-X con el que se analizaron las muestras fue de 1.5 mm de diámetro, y el detector de rayos-X fue el Si-PIN de Amptek, con ventana de Be de $0.5 \mu\text{m}$, área activa de 6 mm^2 y espesor de $500 \mu\text{m}$ (Ruvalcaba-Sil *et al.*, 2010).

Las señales del detector se procesaron en un amplificador PX4 de Amptek conectado a una computadora y con el programa AXIL se determinaron las intensidades de los picos de rayos-X. Para determinar las concentraciones de los elementos, siguiendo el modelo descrito por Rousseau *et al.* (1996), Tsutsumimoto y Tsuji (2007), se utilizaron como material de referencia los espectros de hojas de jitomate (NIST, SRM, 1573a).

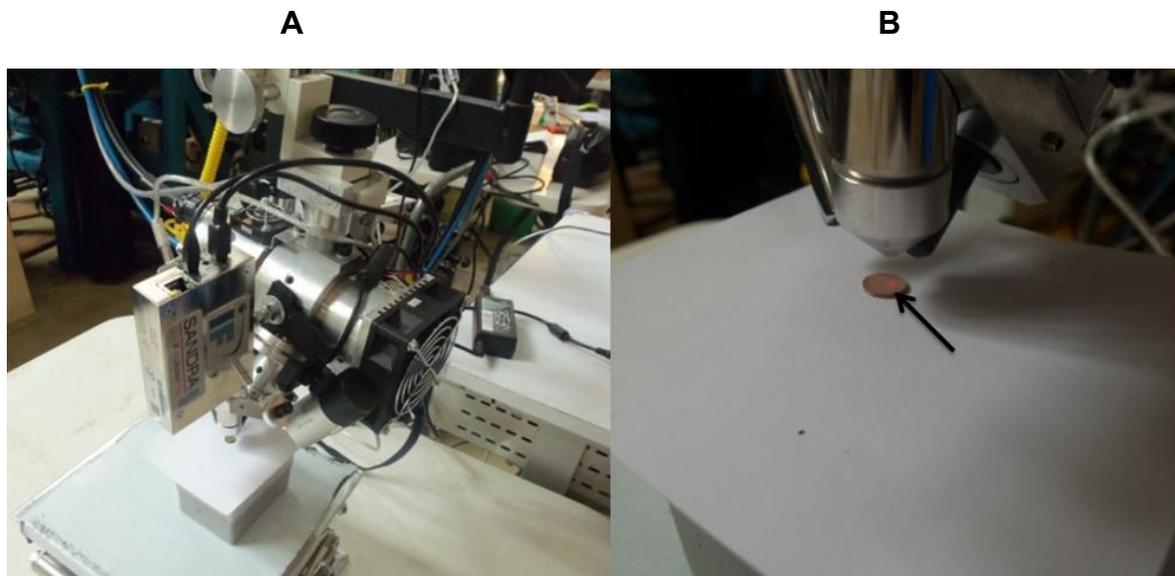


Figura 5.- A) Sistema (SANDRA). B) Pastilla colocada a distancia del colimador, determinada por la intersección de los láseres (señalada con la flecha).

- **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA 8.0.

Para el análisis de crecimiento clásico, excepto el parámetro NAR, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía; en el caso de NAR, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no presentaron distribución normal ($\alpha < 0.05$). Para el análisis de los parámetros Fv/Fm y PI se realizó un ANOVA

de dos vías; y para el contenido de cobre y otros elementos químicos en hojas y raíces, se realizó un ANOVA de una vía. Para todos los datos analizados mediante la prueba ANOVA, cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

- **Análisis de crecimiento**

Los resultados del peso seco total final revelaron diferencias significativas ($F_{(4,45)}=3.1401$; $p=0.0232$) entre tratamientos. De acuerdo con los resultados, las plantas control y las del tratamiento de 100 $\mu\text{g Cu/g}$ presentaron una mayor acumulación de biomasa al final del experimento (Figura 6), 0.947 ± 0.129 g y 0.958 ± 0.123 g, respectivamente, en comparación con las plantas expuestas a 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g Cu/g}$, las cuales presentaron un peso seco de 0.774 ± 0.161 g, 0.820 ± 0.139 g y 0.502 ± 0.065 g, respectivamente. Como se observa en la Figura 6, el aumento en la concentración de Cu en el sustrato, a partir de los 500 $\mu\text{g Cu/g}$, causó una disminución en la acumulación de peso seco en comparación con las plantas control. Sin embargo, solo las plantas expuestas a la concentración más alta de Cu (2000 $\mu\text{g Cu/g}$), presentaron diferencias significativas en su peso seco con respecto a las plantas del control y las expuestas a 100 $\mu\text{g Cu/g}$.

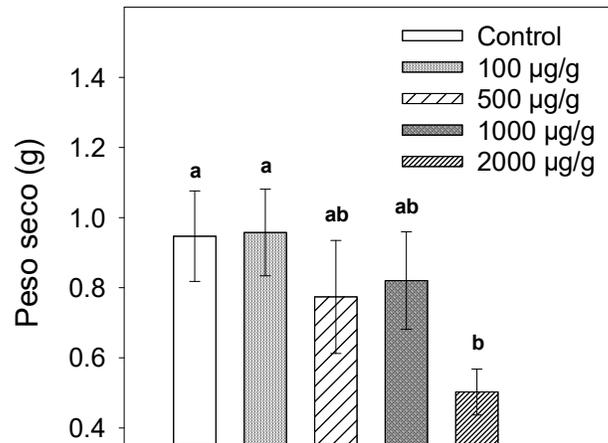


Figura 6.- Biomasa o peso seco total (g) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Prueba de ANOVA de una vía ($F_{(4,45)} = 3.1401$ $p=0.0232$) aplicando comparación de medias de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En cuanto a los parámetros del análisis de crecimiento clásico, RGR y AGR (Figura 7A y B), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(4,45)} = 2.200$; $p = 0.0841$).

De acuerdo con los resultados, la mayor acumulación de biomasa por unidad de tiempo (AGR) se observó en las plantas control y las expuestas a 100 µg Cu/g (Figura 7B), mientras que las plantas del resto de los tratamientos con Cu presentaron una disminución en la tasa absoluta de crecimiento con respecto a las plantas control. Las plantas expuestas a 2000 µg Cu/g presentaron la media más baja (0.011 ± 0.002 g día⁻¹), mientras que, las plantas expuestas a 100 µg Cu/g presentaron una AGR similar a las plantas control. No obstante, de acuerdo con la

prueba ANOVA, las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($p > 0.05$).

En cuanto a la tasa relativa de crecimiento (RGR) (Figura 7A), se observó un comportamiento similar al de la AGR, presentándose una disminución en la acumulación de biomasa por unidad de biomasa por día en las plantas expuestas a 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g Cu/g}$ con respecto a las plantas control, siendo las plantas expuestas a 2000 $\mu\text{g Cu/g}$ las que presentaron la menor RGR ($0.079 \pm 0.004 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$); mientras que las plantas con el tratamiento de 100 $\mu\text{g Cu/g}$ mostraron un comportamiento similar al de las plantas control ($0.094 \pm 0.04 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$). Sin embargo, de acuerdo con la prueba ANOVA, las diferencias entre tratamientos no fueron significativas ($p > 0.05$).

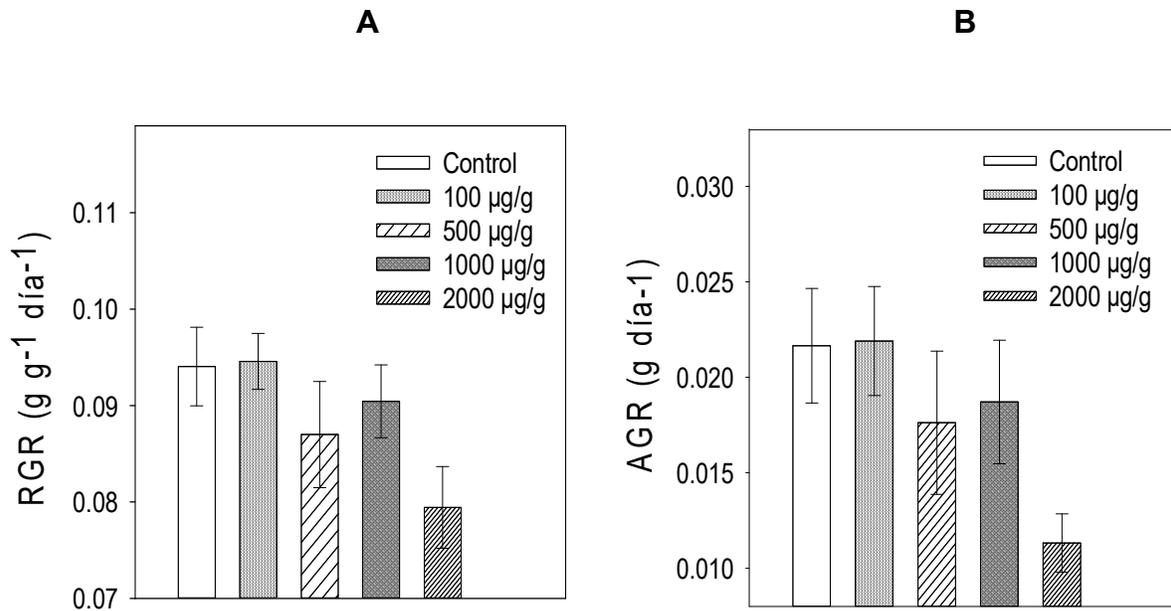


Figura 7.- (A) Tasa relativa de crecimiento (RGR) y (B) tasa absoluta de crecimiento (AGR) de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=10). No se presentaron diferencias significativas. Prueba de ANOVA de una vía, RGR ($F_{(4,45)} = 2.200$; $p = 0.0841$); AGR ($F_{(4,45)} = 2.200$; $p = 0.0841$).

En el caso de la tasa de asimilación neta (NAR) no se presentaron diferencias significativas entre las plantas de los distintos tratamientos ($X^2_{(4, 50)} = 4.800$; $p = 0.3084$). Como se observa en la Figura 8A, las plantas expuestas a 2000 µg Cu/g presentaron la tasa de asimilación neta más alta (0.0011 ± 0.0003 g cm² día⁻¹), mientras que las plantas expuestas a las otras concentraciones de cobre (100, 500 y 1000 µg Cu/g), presentaron una tasa de asimilación neta similar al de las plantas control ($0.001 \pm 4.645E-05$ g cm² día⁻¹), siendo las plantas expuestas a 500 µg Cu/g las que mostraron la menor producción de materia seca por unidad de área foliar por día (NAR) ($0.0007 \pm 5.850E-05$ g cm² día⁻¹).

En cuanto a la proporción de área foliar (LAR) (Figura 8B) no se presentaron diferencias significativas ($F_{(4,45)} = 0.827$; $p = 0.5150$) entre las plantas de los distintos tratamientos. De acuerdo con los resultados, las plantas expuestas a $100 \mu\text{g Cu/g}$ tuvieron la media más alta ($147.646 \pm 7.731 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) y las expuestas a $2000 \mu\text{g Cu/g}$ presentaron la media más baja ($130.758 \pm 7.423 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$).

Con respecto al área foliar específica (SLA) (Figura 8C) los resultados indican que las plantas control presentaron hojas más densas (un menor valor de SLA representa una mayor densidad o grosor de las hojas) (Pérez *et al.*, 2004) con respecto a las hojas de las plantas de los tratamientos con Cu, presentándose diferencias significativas ($F_{(4,45)} = 4.214$; $p = 0.006$) entre las plantas expuestas a 100 , 500 y $1000 \mu\text{g Cu/g}$, y las plantas control, siendo las plantas tratadas con la menor concentración de cobre, es decir, las expuestas a $100 \mu\text{g Cu/g}$, las que presentaron el área foliar específica más alta ($480.901 \pm 35.042 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) (hojas menos densas), y las plantas control las que tuvieron la menor área foliar específica ($328.347 \pm 18.573 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) (hojas más densas) de entre las plantas de todos los tratamientos.

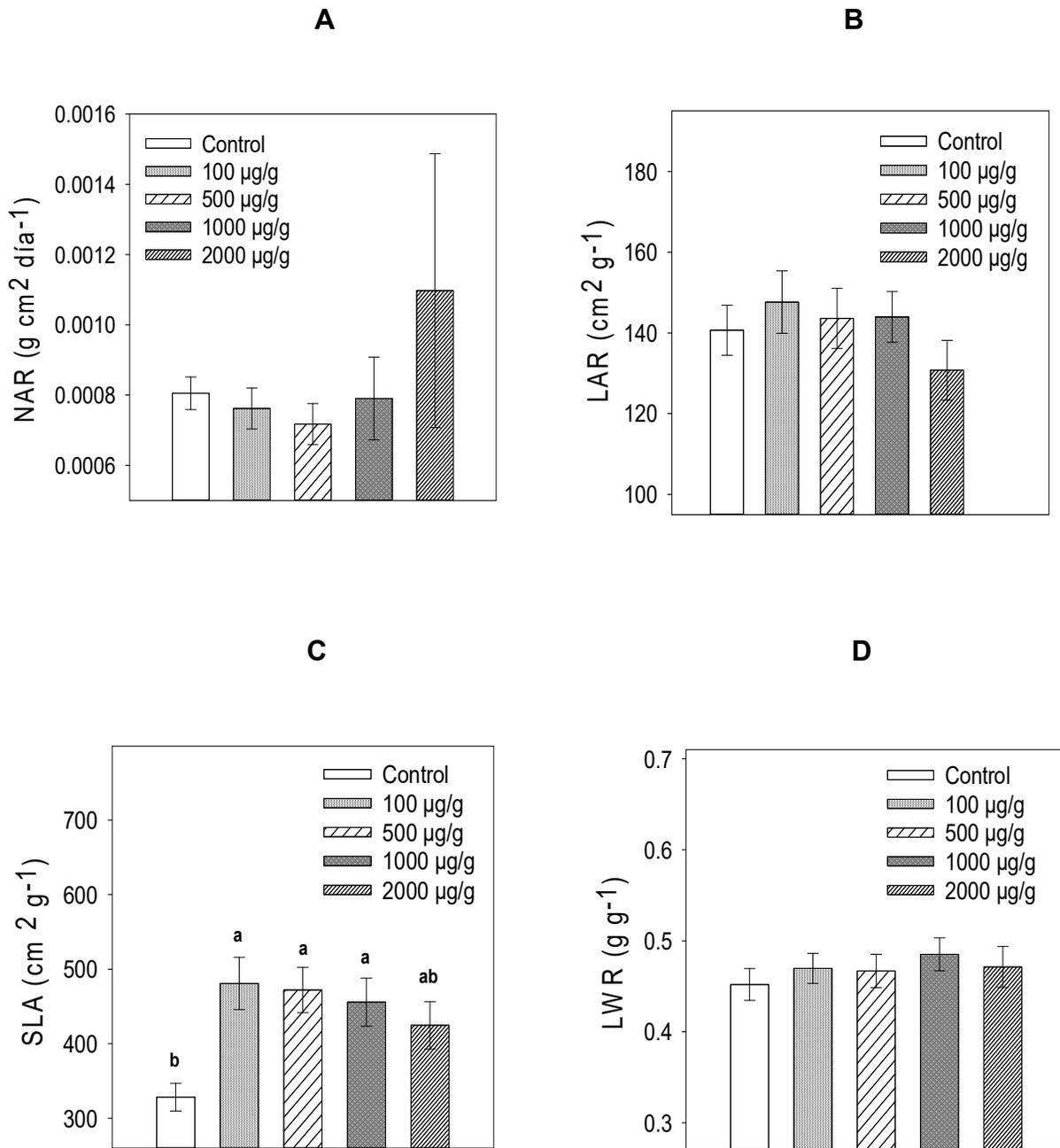


Figura 8.- Componentes de la tasa relativa de crecimiento de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). (A) Tasa de asimilación neta (NAR) ($X^2_{(4, N=50)} = 4.800$; $P=0.3084$); (B) Proporción de área foliar (LAR) ($F_{(4,45)} = 0.827$; $p= 0.5150$); (C) Área Foliar específica (SLA) ($F_{(4,45)} = 4.214$; $p= 0.0055$); (D) Proporción de peso foliar (LWR) ($F_{(4,45)} = 0.401$; $p= 0.8069$). Se realizó una prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes para NAR con comparación de medias debido a que los datos no

fueron normales ($H_{(4, N=50)} = 2.2089$; $p = 0.6974$). Para LAR, SLA y LWR, se realizó una ANOVA y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los valores del parámetro de proporción de peso foliar (LWR) (Figura 8D) no mostraron diferencias significativas ($F_{(4,45)} = 0.401$; $p = 0.8069$) entre los distintos tratamientos, lo que indica que la biomasa destinada a la producción de hojas, del total de biomasa de la planta, fue similar entre las plantas de los diferentes tratamientos.

Asimismo, se analizó estadísticamente el peso seco total final de hojas (g) (Figura 9A) y el área foliar total final (cm^2) (Figura 9B). De acuerdo con los resultados, la biomasa seca de hojas no presentó diferencias significativas entre las plantas de los distintos tratamientos ($F_{(4,45)} = 2.1442$; $p = 0.0908$), sin embargo, sí se mostraron diferencias significativas con respecto al área foliar ($F_{(4,45)} = 3.8518$; $p = 0.0089$), observándose una menor área foliar en las plantas expuestas a $2000 \mu\text{g Cu/g}$ (43.892 cm^2) con respecto a las plantas control (100.713 cm^2) y a las plantas expuestas a $100 \mu\text{g Cu/g}$ (107.793 cm^2), las cuales fueron las que presentaron la mayor área foliar.

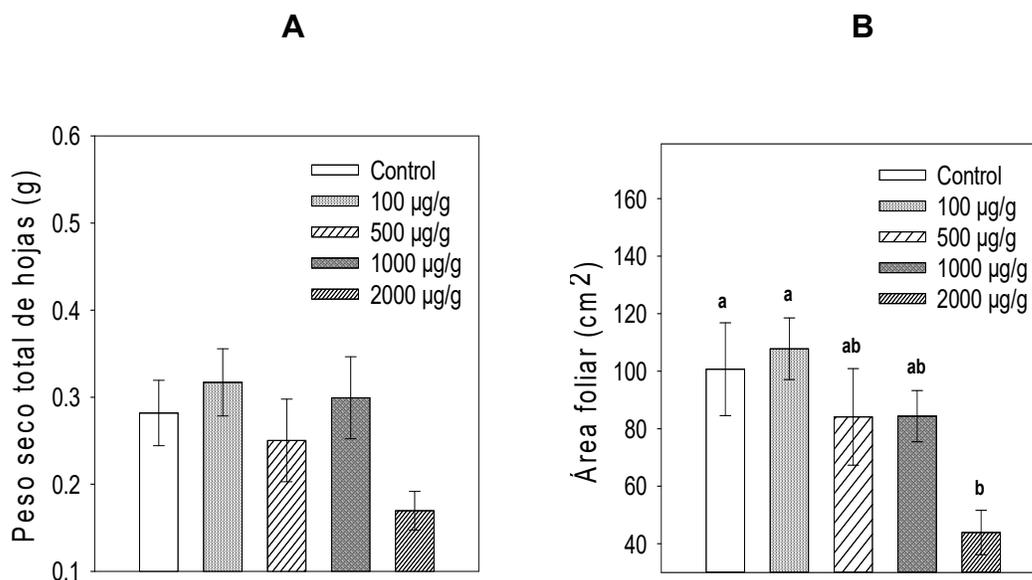


Figura 9.- (A) Peso seco total de hojas y (B) Área foliar de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se realizó un ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la comparación de medias de Tukey. No se presentaron diferencias significativas respecto al peso seco total de hojas ($F_{(4,45)} = 2.1442$; $p = 0.0908$), sin embargo, sí se observaron respecto al área foliar ($F_{(4,45)} = 3.8518$; $p = 0.0089$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al coeficiente alométrico (Figura 10A) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(4,45)} = 1.9070$; $p = 0.1257$). Los valores de este índice fueron < 1 en todos los tratamientos, lo que indica que las plantas de los distintos tratamientos presentaron un mayor crecimiento de la parte área que de la raíz, observándose la media más alta en las plantas expuestas a 100 µg Cu/g (0.214 ± 0.013) y el valor más bajo en las expuestas a 2000 µg Cu/g (0.137 ± 0.013), mientras que las plantas expuestas a 500 µg Cu/g y 1000 µg Cu/g tuvieron un

coeficiente alométrico similar al de las plantas control, 0.167 ± 0.028 ; 0.163 ± 0.022 ; y 0.164 ± 0.020 , respectivamente.

Con respecto a la asignación de biomasa a cada uno de los órganos de la planta, se observó que la distribución de biomasa a todos los órganos fue similar entre las plantas de los diferentes tratamientos. Además, la biomasa destinada a la parte aérea (hojas y tallos) fue mayor que la asignada a raíces y flores en todos los tratamientos, sin presentarse diferencias significativas entre las plantas de los distintos tratamientos en cuanto a la asignación de biomasa a los diferentes órganos (Figura 10B), raíz ($F_{(4,45)} = 2.062$; $p = 0.1016$); hojas ($F_{(4,45)} = 2.15$; $p = 0.0905$), tallo ($F_{(4,45)} = 1.63$; $p = 0.182$) y flores ($F_{(4,45)} = 0.123$; $p = 0.974$).

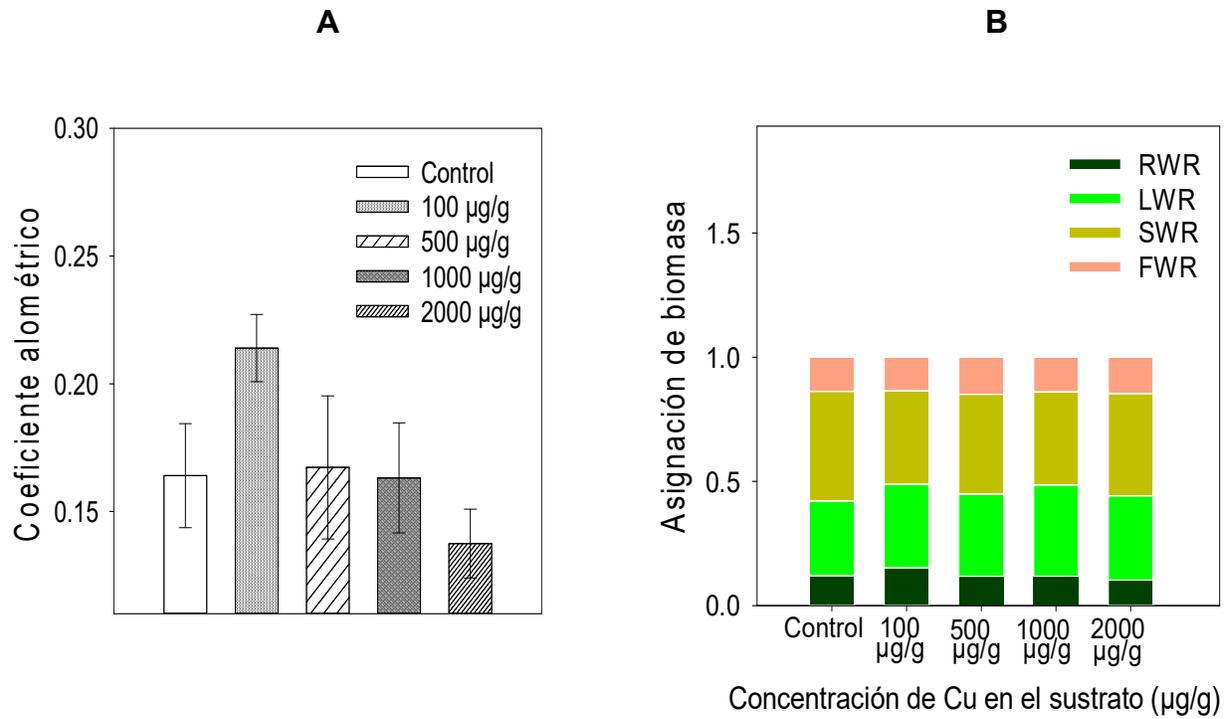


Figura 10.- (A) Coeficiente alométrico y (B) asignación de biomasa de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=10). Se realizó una ANOVA de una vía. No se presentaron diferencias significativas, coeficiente alométrico ($F_{(4,45)} = 1.9070$; $p = 0.1257$); RWR ($F_{(4,45)} = 2.0620$; $p = 0.1016$); LWR ($F_{(4,45)} = 2.147$; $p = 0.0905$); SWR ($F_{(4,45)} = 1.633$; $p = 0.1823$) y FWR ($F_{(4,45)} = 0.1225$; $p = 0.9737$).

Análisis de la fluorescencia de la clorofila a

Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en el valor promedio de Fv/Fm, entre los distintos tratamientos en los diferentes días de medición (Figura 11A) ($F_{(20,210)} = 0.55$ $p=0.9432$); observándose un comportamiento similar a lo largo de todo el experimento. Los valores promedio de este parámetro se encontraron dentro del rango considerado normal, de acuerdo a Percival (2004), desde la primera medición (día 27) hasta la penúltima (día 55), con valores entre 0.73 y 0.82, lo que indica que la actividad del PSII no resulto afectada por el Cu (Lepedus *et al.*, 2012), sin embargo, en la última medición (día 61), los valores de Fv/Fm de las plantas de todos los tratamientos presentaron una disminución, la cual fue más pronunciada en el caso de las plantas expuestas a 1000 $\mu\text{g Cu/g}$.

Los valores promedio de la Fv/Fm de las plantas de todos los tratamientos en los distintos días de medición presentaron diferencias significativas ($F_{(5,240)} = 23.25$ $p<0.0001$) (Figura 11B), entre los días 34, 41 y 55, los cuales presentaron los valores promedio de Fv/Fm más altos, (0.812, 0.818 y 0.827), y los días 27, 48 y 61 (0.755 y 0.764 0.684), asimismo, el valor de Fv/Fm del día 61 (ultima medición) también presentó diferencias significativas con respecto a la Fv/Fm en los días 27 y 48.

Por el contrario, el análisis estadístico mostró que no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a los valores de la relación Fv/Fm en todos los días de medición (Figura 11C) ($F_{(4,240)} = 0.24$ $p=0.9144$).

Con respecto a los valores del índice de potencial fotosintético (PI), al igual que en el caso de la F_v/F_m , no se presentaron diferencias significativas en cuanto a su valor promedio entre tratamientos y el tiempo (días de medición) ($F_{(20,210)}=0.559$ $p=0.9369$) (Figura 12A), aunque, en el caso del PI, se aprecia mejor su variación a lo largo del tiempo. Los valores promedio de PI más altos se observaron en los días 34, 41 y 55 (2.38, 2.653 y 3.03) presentándose diferencias significativas con respecto a los valores de PI de los días 27, 48 y 61 (0.927, 1.457 y 1.212) ($F_{(5,240)}=54.376$ $p<0.0001$) (Figura 12B), siendo que este último, presentó diferencias significativas con respecto a los valores de PI del resto de los días de medición.

Por otra parte, el valor promedio del índice de potencial fotosintético de las plantas de cada uno de los tratamientos en todos los días de medición, no presentó diferencias significativas ($F_{(4,240)}=1.6080$ $p=0.1729$) (Figura 12C).

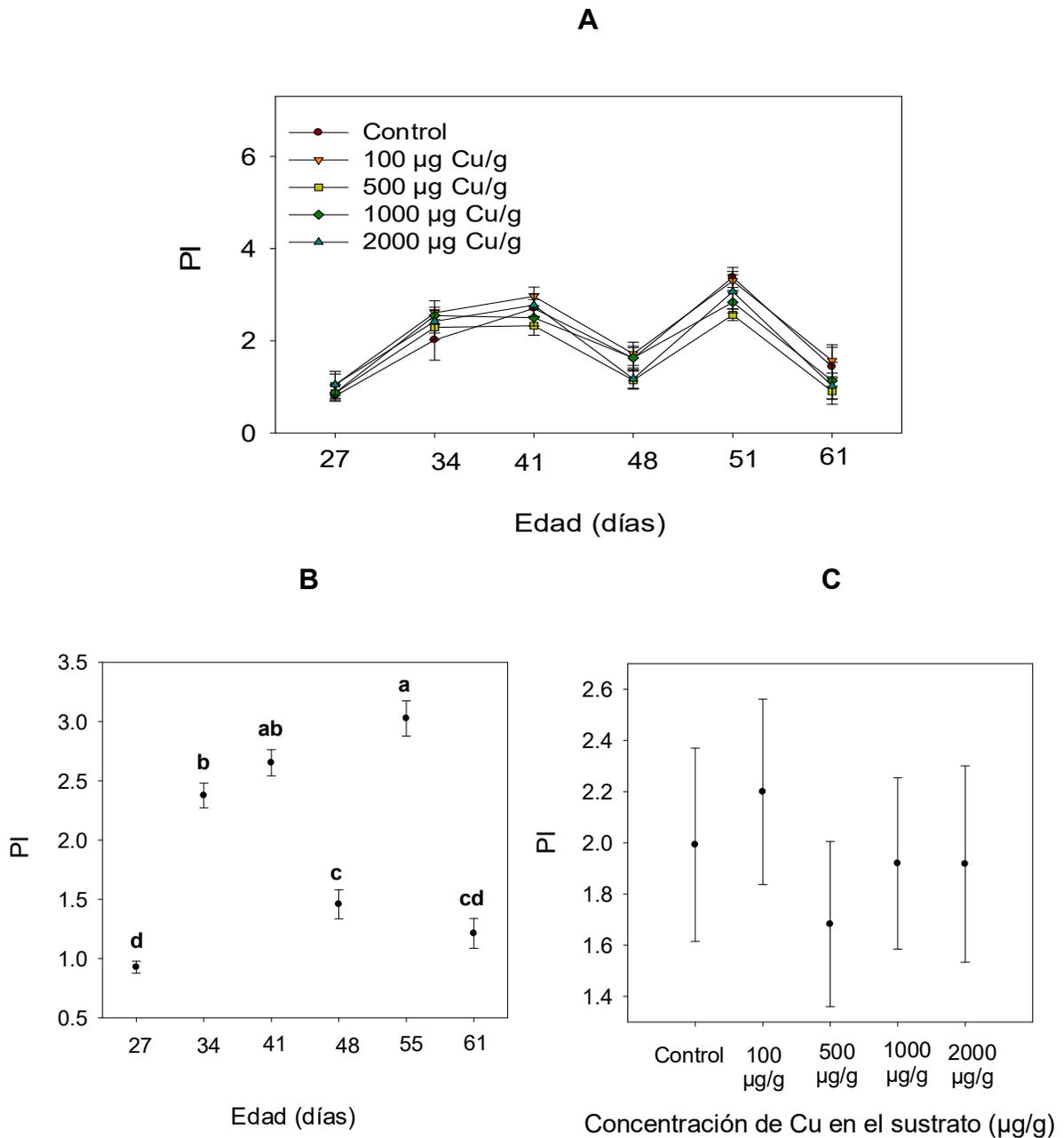


Figura 12.- PI de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=240). (A) Valor promedio del PI de las plantas de los distintos tratamientos en los 6 tiempos (de medición) ($F_{(20,210)}=0.559$ $p=0.93690.55$); (B) valor promedio del PI de las plantas de todo el experimento en los distintos días ($F_{(5,240)}=54.376$ $p<0.0001$); (C) valor promedio del PI en todos los tiempos de las plantas por tratamiento ($F_{(4,240)}= 1.6080$ $p=0.1729$). Se realizó una prueba ANOVA de dos vías y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

- **Proporción de Cu y elementos esenciales en hojas y raíz de *F. esculentum*.**

Las proporciones relativas de elementos químicos en hojas y raíces de *F. esculentum* determinadas a partir de la fluorescencia de rayos X correspondieron a los siguientes elementos: Cu, P, S, Ca, K, Fe, Mn y Zn (el P, S, Ca y K se muestran agrupados como macronutrientes y el Fe, Mn y Zn como micronutrientes).

La concentración de Cu en peso seco de hojas presentó diferencias significativas ($F_{(4,45)} = 40.2819$ $p < 0.0001$) entre las plantas de los diferentes tratamientos. Como se observa en la Figura 13A, la concentración de Cu en las hojas aumentó conforme la concentración de Cu se incrementó en el sustrato, siendo las plantas expuestas a la concentración más alta (2000 $\mu\text{g Cu/g}$) las que presentaron la mayor proporción de Cu en sus hojas, y las plantas control las que tuvieron la menor proporción.

A diferencia de la concentración de Cu en hojas, la concentración en raíces (Figura 13B) no presentó diferencias significativas entre las plantas de los diferentes tratamientos ($F_{(4,45)} = 2.2352$ $p = 0.0801$). Estos resultados indican que las plantas asimilaron y traslocaron significativamente a sus hojas el Cu disuelto en la solución nutritiva.

Con lo que respecta a la proporción de macronutrientes en el peso seco de las hojas (Figura 14) no se presentaron diferencias significativas entre las plantas de los diferentes tratamientos en cuanto a su concentración, fósforo ($F_{(4,45)} = 0.7042$ $p = 0.5933$), azufre ($F_{(4,45)} = 0.7886$ $p = 0.5404$), potasio ($F_{(4,45)} = 1.460$ $p = 0.2302$) y calcio ($F_{(4,45)} = 2.439$ $p = 0.060$).

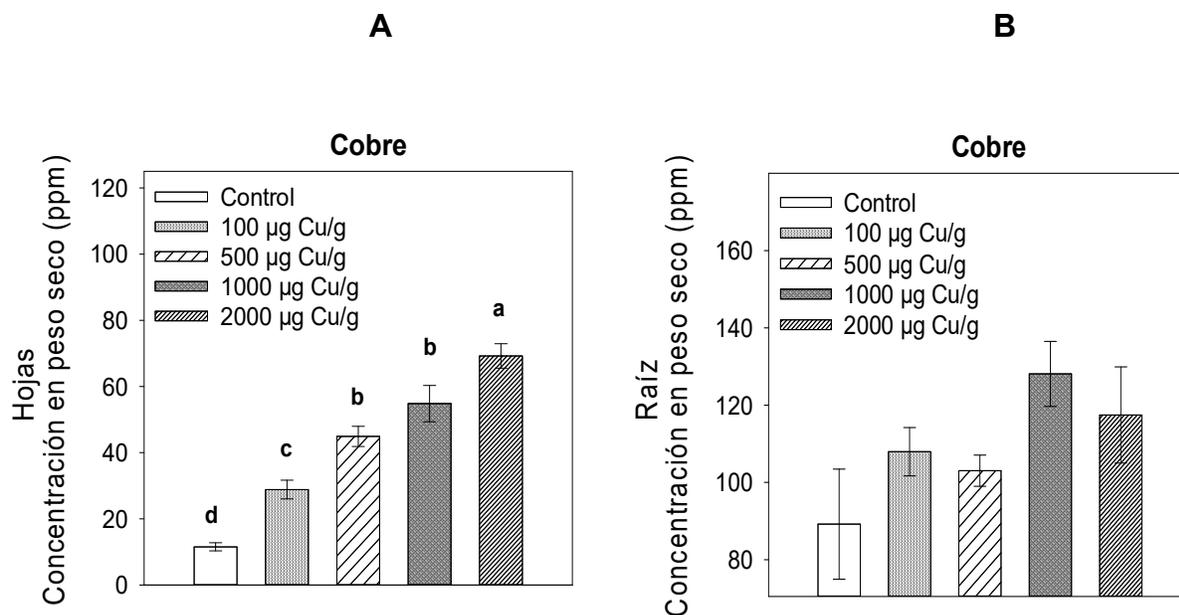


Figura 13.- Concentración de cobre (ppm) en (A) hojas y (B) raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=30). Se realizó una prueba ANOVA de una vía aplicando comparación de medias de Tukey. (A) Concentración de Cu en hojas ($F_{(4,45)} = 40.2819$ $p < 0.0001$). (B) Concentración de cobre en raíces ($F_{(4,45)} = 2.2352$ $p = 0.0801$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

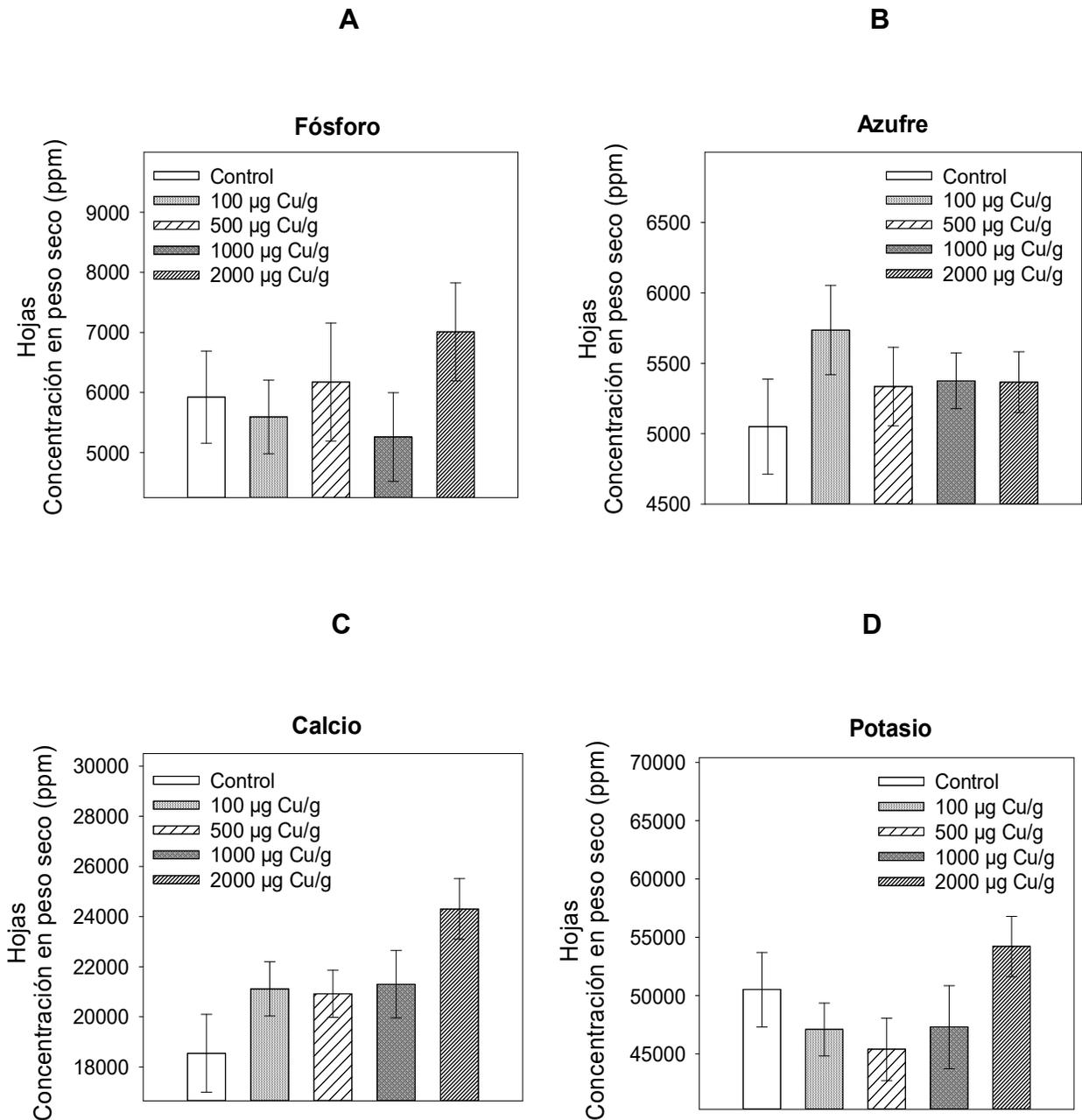


Figura 14.- Concentración de macroelementos en hojas de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras representan el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de fósforo ($F_{(4,45)} = 0.7042$ $p=0.7042$). (B) Concentración de azufre ($F_{(4,45)} = 0.7886$ $p=0.5404$). (C) Concentración de calcio ($F_{(4,45)} = 2.439$ $p=0.060$). (D) Concentración de potasio ($F_{(4,45)} = 1.460$ $p=0.2302$).

Por otro lado, la proporción de macronutrientes en peso seco de raíces (Figura 15) no presentó diferencias significativas entre las plantas de los diferentes tratamientos en cuanto al fósforo ($F_{(4,45)} = 1.3690$ $p=0.2597$) y al calcio ($F_{(4,45)} = 1.717$ $p=0.1627$) (Figura 15A y 15C), pero sí hubo diferencias en el azufre ($F_{(4,45)} = 6.045$ $p=0.0005$) y al potasio ($F_{(4,45)} = 2.579$ $p=0.0499$). Con lo que respecta a la proporción de azufre en raíces, las plantas con la menor concentración de azufre (Figura 15B) fueron las expuestas a $500 \mu\text{g Cu/g}$, que presentaron diferencias significativas respecto a las plantas expuestas a 1000 y $2000 \mu\text{g Cu/g}$, las cuales tuvieron la mayor concentración de azufre en sus raíces. Mientras que las plantas control no presentaron diferencias significativas respecto a las plantas expuestas al cobre.

Al igual que con la concentración de azufre en raíces, la concentración de potasio (Figura 15D) no mostró diferencias significativas entre las plantas control y las expuestas al cobre, sin embargo, sí se presentaron diferencias significativas entre las plantas expuestas a $100 \mu\text{g Cu/g}$, las cuales tuvieron la menor proporción de este macronutriente, y las plantas expuestas a $2000 \mu\text{g Cu/g}$, que tuvieron la mayor concentración de potasio en sus raíces.

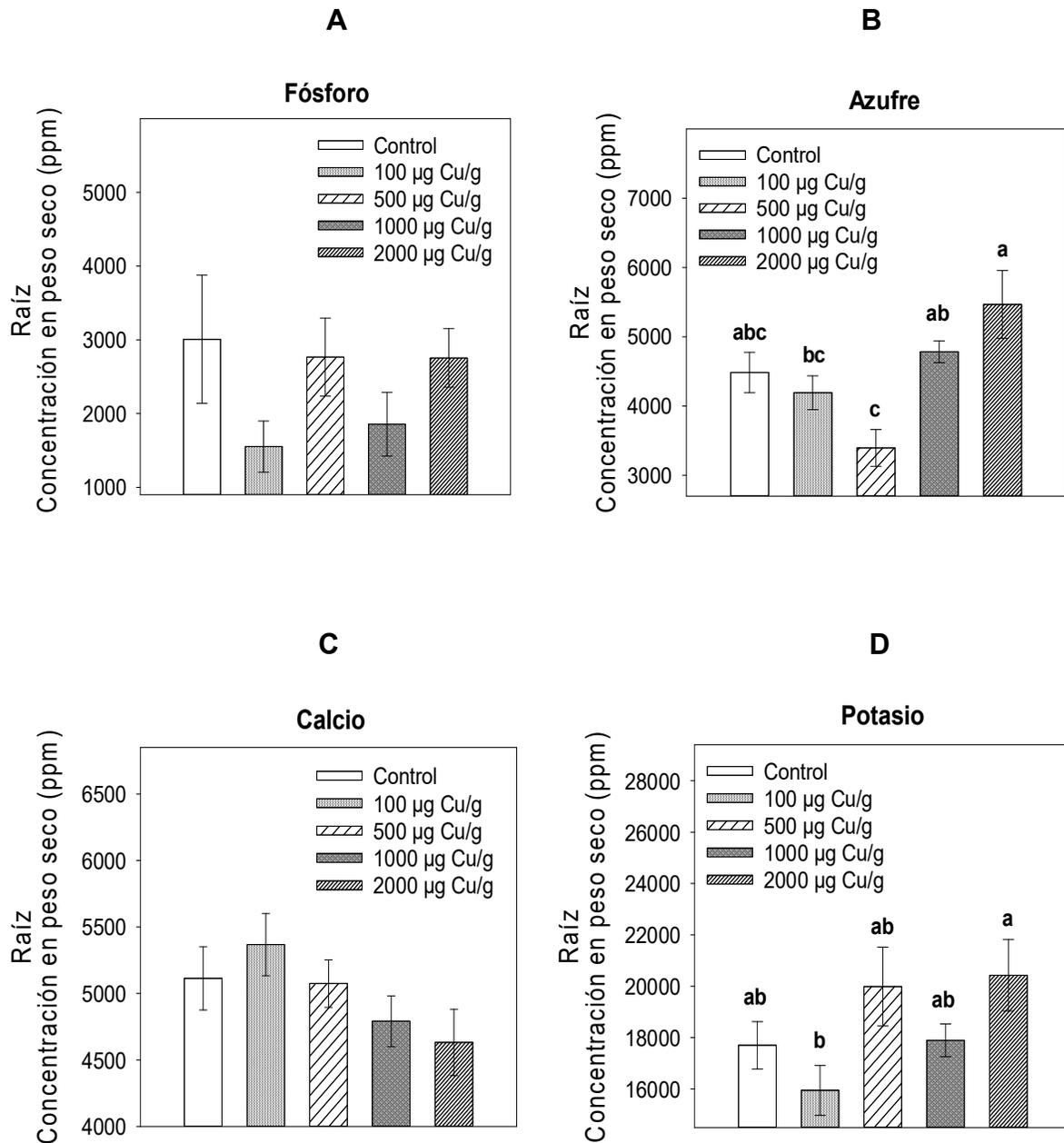


Figura 15.- Concentración de macronutrientes en raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey. (A) Concentración de fósforo ($F_{(4,45)} = 1.3690$ $p=0.2597$). (B) Concentración de azufre ($F_{(4,45)} = 6.045$ $p=0.0005$). (C) Concentración de calcio ($F_{(4,45)} = 1.717$ $p=0.1627$). (D) Concentración de potasio ($F_{(4,45)} = 2.579$ $p=0.0499$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

En cuanto a la concentración de los microelementos en el peso seco de hojas (Figura 16) no hubo diferencias significativas entre las plantas de los diferentes tratamientos, Fe. ($F_{(4,45)} = 1.53$ $p=0.2100$), Zn ($F_{(4,45)} = 1.80$ $p=0.1450$) y Mn ($F_{(4,45)} = 1.4370$ $p=0.2373$), observándose una distribución similar de estos elementos en las hojas de las plantas control y las de las plantas tratadas con cobre.

Al igual que en las hojas, la concentración de Fe ($F_{(4,45)} = 0.8876$ $p=0.4791$), Zn ($F_{(4,45)} = 1.644$ $p=0.1797$) y Mn ($F_{(4,45)} = 1.711$ $p=0.1641$) en raíces (Figura 17) no mostró diferencias significativas entre las plantas control y las plantas expuestas al cobre.

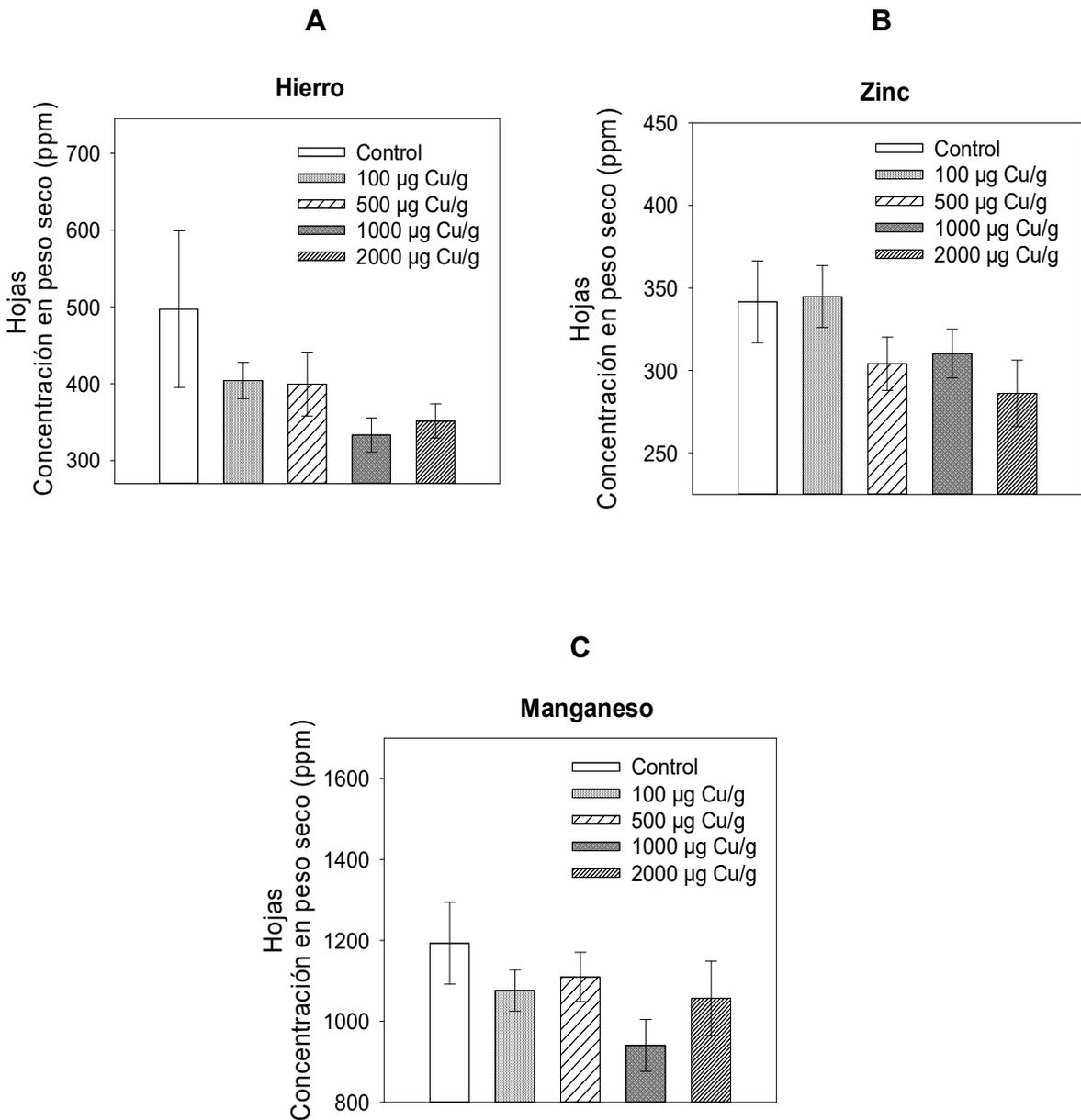


Figura 16.- Concentración de microelementos en hojas de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de hierro ($F_{(4,45)} = 1.53$ $p=0.2100$). (B) Concentración de zinc ($F_{(4,45)} = 1.80$ $p=0.1450$). (C) Concentración de manganeso ($F_{(4,45)} = 1.4370$ $p=0.2373$).

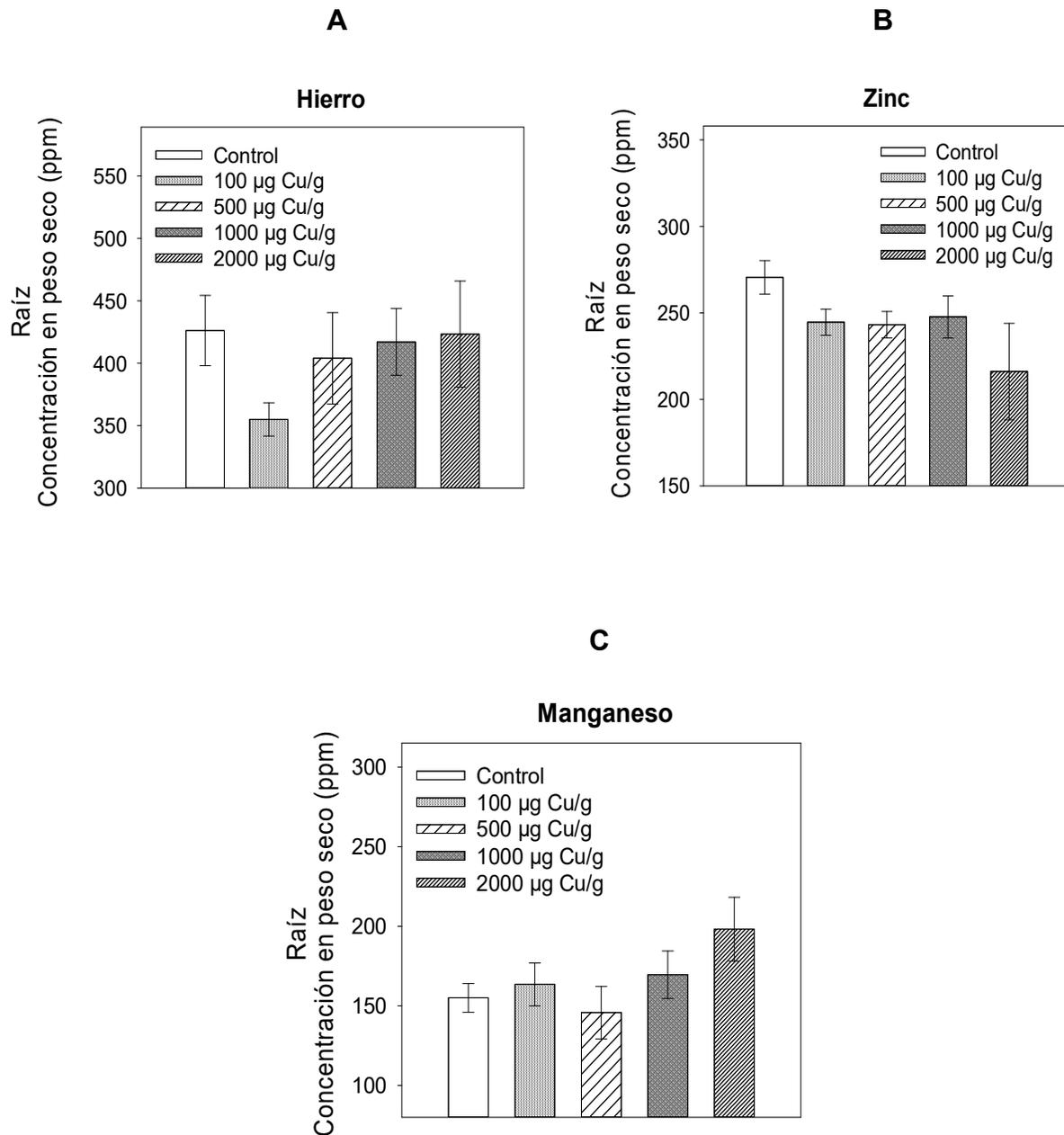


Figura 17.- Concentración de microelementos en raíces de *F. esculentum* en respuesta a distintas concentraciones de Cu. Los valores representan la media, las barras el \pm error estándar (N=30). Se realizó un ANOVA de una vía. (A) Concentración de hierro ($F_{(4,45)} = 0.8876$ $p=0.4791$). (B) Concentración de zinc ($F_{(4,45)} = 1.644$ $p=0.1797$). (C) Concentración de manganeso ($F_{(4,45)} = 1.711$ $p=0.1641$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de cobre sobre el crecimiento y la actividad fotosintética de *F. esculentum* a lo largo de su ciclo de vida, así como en el contenido de Cu y otros nutrientes esenciales en sus hojas y raíces.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *F. esculentum* toleró la presencia de cobre en el sustrato a lo largo de su ciclo de vida, ya que no se presentaron diferencias significativas que indicaran efectos negativos del metal en su tasa crecimiento y la actividad fotosintética de las plantas, observándose un 100% de sobrevivencia en las plantas del experimento, inclusive a concentraciones de 2000 $\mu\text{g Cu/g}$, a diferencia de lo reportado en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) (Fabaceae), las cuales presentaron un 100% de mortalidad a concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g Cu/g}$ (Ippolito *et al.*, 2011).

En las plantas, por lo general la presencia de altas concentraciones de cobre en el sustrato causa la reducción de su peso seco, ya sea por los efectos adversos que el metal provoca en su metabolismo, o, como en el caso de especies tolerantes, dicha reducción puede considerarse como una regulación en la asignación de los recursos para tolerar este metal, es decir, la planta puede sobrevivir con un menor costo energético asignado a biomasa.

En cuanto al peso seco total de las plantas de *F. esculentum*, se observó una tendencia a disminuir conforme aumentó la concentración de Cu en el sustrato, sin embargo, solo se presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas

control hasta los 2000 $\mu\text{g Cu/g}$. Además, las plantas expuestas a la concentración más baja de Cu, 100 $\mu\text{g Cu/g}$, presentaron peso seco total final similar al de las plantas control, lo que sugiere que el cobre a concentraciones menores o iguales a 100 $\mu\text{g Cu/g}$ puede resultar benéfico en el crecimiento de esta especie. Vinod *et al.* (2012) observaron algo similar en plantas de *Triticum aestivum* (trigo) (Poaceae) en las cuales a bajas concentraciones de Cu (150 ppm) no se presentaron efectos adversos en cuanto a su crecimiento, sin embargo, a concentraciones mayores (600 ppm) observaron una inhibición en su crecimiento y en el contenido de clorofila y carotenoides. Tani y Barrington (2005) también observaron que a bajas concentraciones de Cu (15 mg Cu/L) la biomasa de *F. esculentum* fue significativamente mayor a las plantas control, mientras que a altas concentraciones se observaba una reducción significativa de su peso seco (30 mg Cu/ L). Cabe señalar que en el caso del experimento reportado por estos autores, las concentraciones de Cu fueron menores a las utilizadas en éste trabajo (0, 5, 15 y 30 mg Cu/ L) además, el tratamiento se comenzó a aplicar a las cuatro semanas de vida de las plantas durante 18 días y el pH de las soluciones de riego era de 5.5, a diferencia del presente trabajo, en donde las plantas de *F. esculentum* comenzaron a ser irrigadas a los 19 días de vida, y el riego con Cu solo se hizo una vez por semana durante 43 días, asimismo, el pH de la solución con cobre fue de 4.5. Por otro lado, al igual que lo reportado en este trabajo, Liu y colaboradores (2004), observaron una disminución en la biomasa de *Rumex dentatus* (una planta perteneciente a la misma familia que *F. esculentum* (Polygonaceae), conforme aumentaba la concentración de Cu en el sustrato, sin embargo, en el caso de *Rumex dentatus* a concentraciones de 150 mg Cu/kg se reportó una disminución de su peso seco, a diferencia de lo

observado en esta investigación, donde las plantas bajo el tratamiento de 100 µg Cu/g presentaron un peso seco similar al de las plantas control y las plantas bajo los tratamientos de 500 µg Cu/g y 1000 µg Cu/g tampoco presentaron diferencias respecto a las plantas control. Lo que podría indicar que, bajo las condiciones experimentales aplicadas en este trabajo, *F. esculentum* presenta mayor tolerancia que *Rumex dentatus*.

Aunque el peso seco de *F. esculentum* disminuyó a los 2000 µg Cu/g, las tasas de crecimiento absolutas y relativas (AGR y RGR, respectivamente) no presentaron diferencias significativas con respecto al control, indicando que la eficiencia a la cual las plantas acumularon su biomasa a lo largo del tiempo de tratamiento fue similar en todos los tratamientos. En contraste con lo reportado por Mateos-Naranjo *et al.* (2008), donde el aumento en la concentración de cobre en el sustrato de crecimiento de *Spartina densiflora* (Poaceae), a partir de los 0.03 µg Cu/g, provocó una disminución en su RGR, y lo observado por Cambrollé *et al.* (2013) en plantas de uva (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) (Vitaceae), en las cuales, después de los 600 µg Cu/g, se reportó la disminución significativa de su RGR.

Además de afectar la tasa relativa de crecimiento (RGR), la presencia de metales pesados también causa efectos adversos en otros parámetros de crecimiento como la tasa de asimilación neta (NAR), la proporción de área foliar (LAR) y el área foliar específica (SLA) (Vassilev *et al.*, 2002; Vassilev *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2005).

Sin embargo, la presencia de Cu en el medio de crecimiento de las plantas de *F. esculentum* no produjo efectos adversos en su tasa de asimilación neta (NAR),

proporción de peso foliar (LWR) y proporción de área foliar (LAR), pero sí se presentaron diferencias significativas respecto al área foliar específica (SLA).

Vassilev y Yordanov (1997) reportaron que la presencia de cadmio, un metal pesado al igual que el cobre, causa una reducción tanto en la tasa relativa de crecimiento como en la tasa de asimilación neta en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) (Poaceae), dichos autores mencionan que estas tasas se encuentran correlacionadas, ya que ambas mostraron una reducción significativa respecto a las plantas control, lo que explican, se debió a los efectos adversos que el metal causó en el proceso fotosintético. Al igual que lo reportado por estos autores, los resultados de este trabajo mostraron una relación entre la tasa relativa de crecimiento y la tasa neta fotosintética de *F. esculentum*. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Vassilev *et al.*, (2002) en donde la presencia de Cu causó una reducción de la tasa relativa de crecimiento y de la tasa neta fotosintética de plantas de cebada (Poaceae), la presencia de Cu no afectó negativamente la RGR y la NAR de *F. esculentum*. La correlación entre la tasa relativa de crecimiento y la tasa neta fotosintética de *F. esculentum*, ya había sido reportada por Farooq y Tahir (1987). El hecho de que ambas tasas hayan permanecido sin efectos negativos respecto al control muestra que las plantas expuestas al cobre lograron conservar una producción de biomasa por unidad de área foliar óptima, permitiendo así, que su crecimiento a lo largo del tiempo de tratamiento no se viera afectado.

De la misma manera, la presencia de cobre no afectó, ni la producción de hojas (LWR), ni el área fotosintética (LAR) de *F. esculentum*, sin embargo, si produjo

cambios con respecto al área foliar específica (SLA), sugiriendo que el cobre no afectó el peso seco foliar, pero si, la densidad de las hojas.

Vassilev *et al.* (2002) reportaron que, en plantas de cebada sometidas a diferentes concentraciones de Cu, existieron cambios en cuanto a su actividad fotosintética y su crecimiento, sin embargo, no se observó una relación entre la concentración de cobre y la proporción de área foliar (LAR), lo que concuerda con este trabajo, donde la biomasa asignada al área foliar fue similar entre las plantas de los distintos tratamientos. No obstante, se presentaron cambios en cuanto al grosor de las hojas (SLA) de *F. esculentum*, observándose que las hojas de las plantas control presentaron hojas más densas o gruesas que las de las plantas expuestas a las distintas concentraciones de cobre. Reich *et al.* (1998) mencionan que las hojas que presentan SLAs mayores suelen tener una mayor capacidad fotosintética debido a que se reduce el sombreado de sus hojas, maximizando así la cantidad de área foliar expuesta a la luz, además de que también pueden mostrar una mayor concentración de nitrógeno, el cual se encuentra relacionado entre otras cosas con la fotosíntesis y la acumulación de biomasa.

Cabe mencionar que, a pesar de no presentar diferencias respecto al SLA de las plantas de los otros tratamientos de cobre, las plantas expuestas a 2000 µg Cu/g tampoco presentaron diferencias respecto a las plantas control. Pérez-Amaro *et al.* (2004) señalan que los cambios en el área foliar específica se pueden deber a alteraciones en la estructura de la hoja, o bien, al aumento en el contenido de nutrientes, carbohidratos o metabolitos secundarios. En el presente trabajo, se observó que las plantas expuestas a 2000 µg Cu/g presentaron diferencias en cuanto

al área foliar total con las plantas control y las plantas expuestas a 100 µg Cu/g, pero no presentaron diferencias en cuanto a su peso seco total de hojas y la producción de hojas (LWR), sin embargo, las similitudes de su área foliar específica con respecto a las del resto de los tratamientos de cobre y las plantas control, podría deberse, ya sea por efectos en la división o en la elongación de las células de la hoja, afectando así la densidad o grosor de las mismas (Bultynck *et al.*, 1999), ya que se ha reportado que el Cu puede causar la disminución del crecimiento celular y de la actividad mitótica (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009), así como diferencias en cuanto al grosor de las hojas debido al aumento en el número de células del mesófilo (Panou-Filothéou *et al.*, 2001).

De acuerdo con varios autores la presencia de Cu produce la disminución del área foliar total en plantas, por ejemplo, Jain *et al.* (2008) mencionan que 65 y 130 mg Cu/kg en el medio de crecimiento de *Saccharum officinarum* (Poaceae) disminuyó el área foliar, mientras que Bona *et al.* (2007) también observaron la disminución del área foliar en plantas de *Cannabis sativa* (Cannabaceae) expuestas a 150 ppm Cu, resultados similares a lo observado en *F. esculentum*, donde la presencia de altas concentraciones de Cu disminuyeron el área foliar total, sin embargo, a diferencia de lo observado por Bona *et al.* (2007) y Jain *et al.* (2008), la disminución significativa del área foliar total de *F. esculentum* se dio hasta la concentración más alta de cobre (2000 µg Cu/g); además, estos autores observaron una disminución del peso seco de hojas; contrario a este trabajo donde la presencia de cobre no generó efectos negativos sobre el peso seco total en hojas de *F. esculentum*. Algo similar fue observado en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) (Cucurbitaceae) sometidas

durante 5 días a estrés por cobre (20 $\mu\text{g Cu/g}$ de suelo) en las cuales se reportó la disminución en el área foliar pero no el peso seco de las hojas (Alaoui-Sossé *et al.*, 2004). Lo que sugiere que el Cu produjo efectos negativos sobre la expansión foliar. Asimismo, respecto al peso seco foliar, el cual, como ya se mencionó no se vio afectado en las plantas de *F. esculentum*, se ha observado que, en especies tolerantes al cobre, como *Elsholtzia haichowensis* (Lamiaceae), así como en especies no tolerantes como el pepino (*Cucumis sativus*), la presencia de este metal no produce efectos negativos sobre el peso seco foliar (Alaoui-Sossé *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2004). De acuerdo con el análisis de crecimiento, la disminución en el peso seco total final de las plantas expuestas a la mayor concentración de cobre se encontró relacionado con la disminución de su área foliar.

Otro parámetro que se evaluó fue la eficiencia fotosintética de *F. esculentum*; los resultados mostraron que el cobre no ocasionó efectos negativos sobre la fotoquímica primaria del PSII de las plantas de *F. esculentum* expuestas a diferentes concentraciones de este metal. Tanto la F_v/F_m como el PI_{ABS} no presentaron efectos adversos ante la presencia de cobre, a diferencia de lo observado en otras especies como *Spartina densiflora* (Poaceae) (Mateos-Naranjo *et al.*, 2008), *Glaucium flavum Crantz* (Papaveraceae) (Cambrollé *et al.*, 2011), *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Vitaceae), (Cambrollé *et al.*, 2013) y *Alyssum montanum* (Brassicaceae) (Ouzounidou, 1994), en las cuales al incrementar la concentración de Cu en su medio de crecimiento se observó una disminución en la relación F_v/F_m . Por otro lado, Burzyński & Kłobus (2004) y Vinit-Dunand *et al.* (2002) reportaron que el Cu

tampoco afectó el Fv/Fm ni la NAR en plantas de pepino, al igual que lo observado en plantas de *F. esculentum* del presente trabajo.

Sin embargo, si se observaron fluctuaciones en los valores de estos parámetros a lo largo del tiempo de tratamiento, los cuales, de acuerdo con los análisis estadísticos, no estuvieron relacionados con los tratamientos de cobre, por lo que dichas fluctuaciones se podrían explicar por los estadios de desarrollo de las hojas, ya que se ha observado que la actividad fotoquímica varía de acuerdo con el estado de desarrollo de las plantas. Con respecto a esto, Gaberščik, et al. (2002) observaron que en plantas de *F. esculentum* expuestas a diferentes intensidades de rayos UV-B ni la concentración de compuestos absorbentes de este tipo de radiación, ni la actividad neta fotosintética fueron afectadas por las diferentes intensidades de rayos UV-B, pero sí se vieron afectadas dependiendo el estadio de desarrollo de las plantas, siendo que las plantas a temprana edad mostraron una menor actividad neta fotosintética así como una menor concentración de pigmentos absorbentes de UV, mientras que las plantas en estadios de desarrollo más tardíos la fotosíntesis no se vio afectada. Estos autores observaron que a pesar de que dichas plantas presentaron una menor actividad fotosintética neta, la Fv/Fm no varió, por lo que concluyeron que las diferencias en la actividad fotosintética neta no fueron debido a un daño en la eficiencia del PSII. Es por esto, que se debería de considerar la evaluación tanto de la actividad fotosintética neta, como de la fase bioquímica de la fotosíntesis de las plantas de *F. esculentum* expuestas al Cu en diferentes tiempos, para así obtener un mejor panorama de los efectos del Cu sobre la fotosíntesis y por ende del crecimiento de *F. esculentum*.

Con respecto a la acumulación de Cu en las hojas de *F. esculentum*, se observó que fue proporcional a la concentración de cobre en el sustrato. El Cu aumentó en hojas, mientras que en las raíces no se observaron diferencias entre las plantas control y las plantas de los tratamientos con cobre. El hecho de que las raíces no presentan diferencias significativas sugiere que las plantas expuestas al Cu lo absorbieron y lo translocaron a las hojas, en las cuales sí se presentaron diferencias entre los tratamientos. Es importante mencionar que las concentraciones de Cu encontradas en las raíces de todos los tratamientos fueron mayores (89 ppm para las plantas control) a las reportadas para la mayoría de las especies de plantas (4-30 ppm) (Marschner, 1995). Las raíces de las plantas expuestas al Cu presentaron concentraciones mayores a las detectadas en plantas control (entre 103 y 128 ppm) mas no se encontraron diferencias significativas. A pesar de ser concentraciones altas las que *F. esculentum* acumuló, tampoco fueron similares a las reportadas para plantas hiperacumuladoras (1000 mg/kg de Cu). Estos resultados se pueden deber a la transpiración de las plantas, ya que se ha reportado que ésta puede influir en la absorción de nutrientes. De acuerdo con Tani y Barrington (2005) la tasa de transpiración influye en la absorción tanto de zinc como de cobre en *F. esculentum*, siendo que a mayor tasa de transpiración hay un aumento en la absorción y la concentración de estos elementos en las raíces. Sería importante monitorear la tasa de transpiración de *F. esculentum*, así como la concentración de cobre en el sustrato de crecimiento de esta planta en la presente investigación y así tener un panorama más amplio sobre la respuesta observada.

La concentración de Cu en hojas, por el contrario, si presentó diferencias significativas entre las plantas control y las plantas expuestas a diferentes concentraciones del Cu; observándose un aumento en las hojas conforme la concentración de Cu en el sustrato aumentó, presentando hasta 69 ppm de Cu con 2000 µg Cu/g, sin embargo, estas concentraciones tampoco fueron mayores a las reportadas para plantas hiperacumuladoras. Resultados que sugieren que *F. esculentum* puede tolerar altas concentraciones de cobre en el sustrato, y además puede absorberlo y translocarlo a sus hojas. Lou *et al.* (2004) reportaron que en *Elsholtzia haichowensis* (Lamiaceae) una especie tolerante al cobre, se observó una mayor concentración de cobre en raíces que en la parte aérea, así como en *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013), *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae) (Alaoui-Sossé *et al.*, 2004) y *Vitis vinifera* (Vitaceae) (Cambrollé *et al.*, 2013), en las cuales, el cobre fue secuestrado principalmente en las raíces.

De acuerdo con diversos autores, la presencia de altas concentraciones de cobre puede provocar una alteración en la absorción de otros nutrientes esenciales, generando así un desbalance nutricional. Lin y Wu (1994) observaron que la presencia de cobre afectó la absorción y concentración de nutrientes como P, Ca, Mg, Fe y Zn en *Lotus purshianus* (Fabaceae). Mientras que Alaoui-Sossé *et al.* (2004) reportaron que el cobre provocó una alteración en cuanto a la distribución de Ca, K y Mg en hojas de pepino (Cucurbitaceae), pero no en sus raíces. Asimismo, Bouazizi *et al.* (2010) observaron un cambio en la homeostasis de Ca, K, Fe y Zn en hojas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) (Fabaceae). En tanto que Cambrollé *et al.* (2013) reportaron efectos del cobre sobre la concentración de P, N, Ca, Mg y S en hojas y

raíces de *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Vitaceae). Por otro lado, Yang *et al.* (2002) sugirieron que el hecho de que *Elsholtzia splendens* Nakai (Lamiaceae) mantuviera la concentración de diversos nutrientes esenciales en el rango de lo óptimo influyó en su capacidad de tolerar el cobre.

En el caso *Fagopyrum* la presencia de Cu en el sustrato, no afectó la concentración en hojas de ninguno de los macronutrientes evaluados (Ca, K, P, S).

Con respecto a la concentración de los micronutrientes Zn, Fe y Mn en hojas de *Fagopyrum*, no se presentaron diferencias significativas entre las plantas expuestas al cobre y las plantas control, contrario a lo reportado por Lin y Wu (1994) quienes observaron un desbalance en la absorción de estos nutrientes en *Lotus purshianus* (Fabaceae) ante la presencia de concentraciones tóxicas de cobre.

En cuanto a la concentración de nutrientes en las raíces, no se presentaron diferencias con relación a la concentración de P, Ca, Fe, Zn y Mn, pero si en la de S y K, contrario a lo reportado para las raíces de *Spartina densiflora* (Poaceae) en las cuales se observó una disminución en el contenido de P, Ca y Mg, una disminución en el crecimiento y en la actividad fotosintética, al estar expuestas a concentraciones de cobre mayores a 0.03 µg Cu/g (Mateos-Naranjo *et al.*, 2008), y en raíces de *Glaucium flavum* Crantz (Papaveraceae) en donde se reportó un aumento en la concentración de P, Ca, Mg, y una disminución en la Fv/Fm y la RGR conforme aumentó la concentración de cobre. Por otro lado, en raíces de plantas de cebada (Poaceae) expuestas al Cu, tampoco se presentaron diferencias respecto a la concentración de Zn, pero si del K, Ca y Fe (Vassilev *et al.*, 2002), estos nutrientes

disminuyeron, y se reflejó en una menor tasa relativa de crecimiento y de asimilación neta.

Con relación a la concentración del S, Cambrollé *et al.* (2013) reportan un aumento en la concentración de este nutriente en las raíces de *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Vitaceae) conforme se incrementaba la concentración de Cu en el medio, estos autores lo relacionan con un aumento en la síntesis de compuestos ricos en azufre involucrados en la tolerancia a los metales pesados, como son las fitoquelatinas. En el caso del presente trabajo la mayor concentración de S se observó en las plantas expuesta a 2000 µg Cu/ g y a 1000 µg Cu/ g, lo cual probablemente está relacionado con que las raíces de estas presentaron la mayor concentración de Cu. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la tolerancia de *F. esculentum* podría estar relacionada con un aumento en la concentración de glutatión a consecuencia de un incremento en la producción de ROS, o de la síntesis de fitoquelatinas o metalotioneínas. Respecto a esto, se ha observado que en plantas tolerantes a metales pesados como el Cd, Zn y Cu se produce un incremento en la concentración de S debido al aumento en la síntesis de agentes desintoxicantes de metales pesados, como, las fitoquelatinas y metalotioneínas y de antioxidantes como el glutatión (Bashir *et al.*, 2015; Yadav, 2010).

En relación con la concentración de potasio en las raíces, se observó la mayor concentración de este en las plantas expuestas a 2000 µg Cu/ g, mientras que las plantas expuesta a 100 µg Cu/ g y las plantas control presentaron la menor concentración de cobre. Estos resultados sugieren que el K podría estar involucrado en el mantenimiento del crecimiento de esta especie bajo estrés por cobre, ya sea

por el mantenimiento de la elongación celular, el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y/o el aumento en la conductancia estomática ya que se ha observado que en especies como el *Prunus persica* (durazno) (Rosaceae), ante la presencia del metal pesado Zn, el K ayuda a mantener la elongación radicular, la actividad fotosintética y provoca un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como SOD y POD (Song *et al.*, 2015).

De acuerdo con lo anterior, el cobre no provocó efectos adversos en la homeostasis de ninguno de los nutrientes evaluados tanto en hojas como en raíces de *F. esculentum*, sin embargo, su balance si fue diferente entre órganos. Estos resultados podrían sugerir que al igual que la planta tolerante al cobre *Elsholtzia splendens* Nakai (Lamiaceae) (Yang *et al.*, 2002), *F. esculentum* pudo mantener varios nutrientes dentro del rango óptimo lo cual estuvo involucrado en conservar una actividad metabólica adecuada cuando se encontró expuesta a diferentes concentraciones de cobre.

CONCLUSIONES

- *F. esculentum* no presentó diferencias significativas en cuanto a su crecimiento y eficiencia fotosintética ante diferentes concentraciones de Cu, lo que sugiere que esta planta presenta un mecanismo de tolerancia a este metal pesado que le permite crecer bajo concentraciones consideradas como tóxicas para diversas especies.
- El cobre no afectó la tasa de crecimiento de *F. esculentum*, sin embargo, se observó una menor biomasa seca final en las plantas expuestas a la concentración más alta del metal, lo cual podría explicarse por el costo metabólico de mantener su crecimiento bajo altas concentraciones de cobre.
- El crecimiento de los órganos fotosintéticos de *F. esculentum*, se vio afectado por el cobre, observándose una disminución del área foliar, pero no de la biomasa foliar de las plantas expuestas a la mayor concentración de Cu, no obstante, mantuvo una SLA similar a la del resto de los tratamientos lo cual repercutió en su NAR y en los valores de la F_v/F_m y el PI_{ABS} .
- El área foliar específica de las plantas expuestas a cobre fue similar a la de las plantas control lo cual influyó en mantener una tasa de crecimiento y de asimilación neta sin diferencias significativas respecto a las plantas control y a las del resto de los tratamientos con cobre.
- Las plantas mostraron un incremento en la concentración de Cu en sus hojas como consecuencia al aumento de la concentración de Cu en el medio de crecimiento, a diferencia de en las raíces, en las cuales no se observaron diferencias entre las plantas control y las expuestas a Cu.

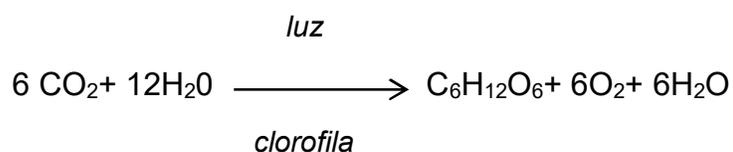
- El cobre no generó efectos negativos sobre la asignación y asimilación de varios nutrientes minerales esenciales en *F. esculentum* lo que indica que esta especie tuvo un ajuste metabólico eficiente, el cual estuvo involucrado en mantener un balance nutricional adecuado que no produjera efectos negativos en su crecimiento.
- El aumento en la concentración de algunos nutrientes en raíces (K y S) de *F. esculentum* sugiere que estos elementos podrían estar involucrados en la respuesta de esta especie a la toxicidad por cobre.

Perspectivas

- Para complementar la información sobre los efectos del cobre en la eficiencia fotosintética de *F. esculentum*, sería apropiado realizar evaluaciones de la asimilación de CO₂, la conductancia estomática y del contenido de pigmentos fotosintéticos.
- Para comprender mejor el balance nutricional de *F. esculentum* sería importante realizar un análisis sobre la asignación de nutrientes minerales en diferentes estadios de desarrollo de las plantas y así complementar la información de los efectos del Cu sobre el balance nutricional de esta especie.
- Debido a las diferencias observadas en cuanto a la concentración de S en raíces de las plantas expuestas a cobre, sería interesante realizar un análisis sobre péptidos quelantes ricos en este mineral como fitoquelatinas y metalotioeneínas, para determinar si estos se encuentran involucrados en la respuesta de *F. esculentum* a este metal. Asimismo, el incremento en la proporción de K y S observada en las raíces de *F. esculentum*, podrían sugerir un incremento en la actividad del sistema antioxidante de estas plantas, por lo que sería importante evaluar el contenido de especies reactivas de oxígeno, así como la actividad de enzimas antioxidantes como POD, SOD, CAT y de péptidos como el glutatión los cuales se ha reportado incrementan su actividad en plantas que se encuentran expuestas a este metal.

ANEXO I

La fotosíntesis es un proceso metabólico en el cual los organismos fotosintéticos, como las plantas, transforman la energía lumínica en energía química, en forma de enlaces químicos (González-Moreno *et al.*, 2008). Durante este proceso la energía lumínica es utilizada para la síntesis de carbohidratos a partir de la reducción de dióxido de carbono (CO₂) y la oxidación del agua (H₂O) (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2010). La ecuación general de la fotosíntesis oxigénica es:



Ecuación 12

El aparato fotosintético

La fotosíntesis se lleva a cabo en los cloroplastos (Figura 18). Los cloroplastos son orgánulos de forma ovoide que se encuentran ubicados principalmente en las hojas de las plantas, tienen su propio ADN y maquinaria para la síntesis de proteínas, como ribosomas y ARN de transferencia. Constan de tres sistemas de membranas, una externa, una interna y varias membranas tilacoidales; es en estas membranas en donde se encuentran localizada la parte del aparato fotosintético encargada de la absorción de luz y la cadena transportadora de electrones (Figura 19) (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2010).

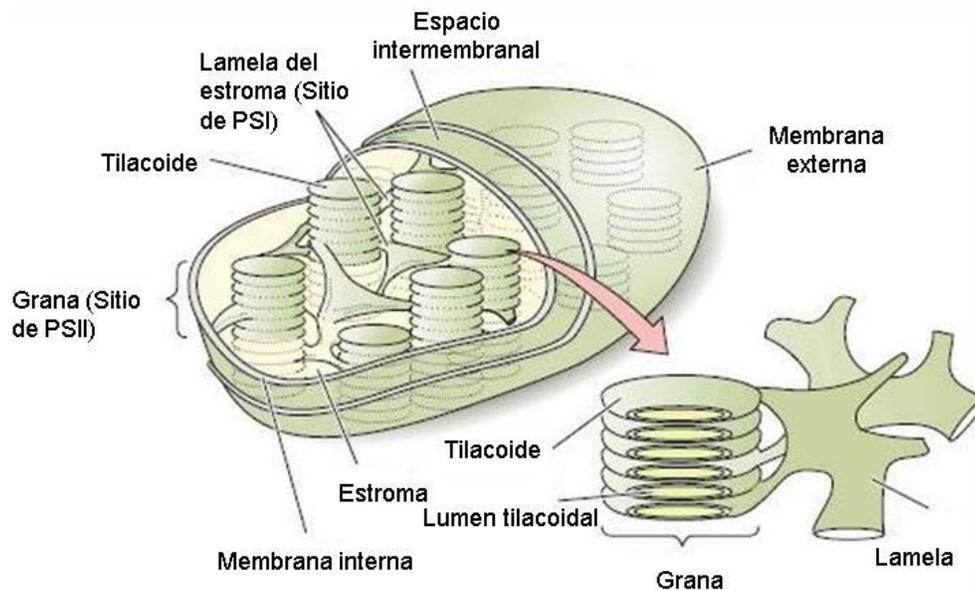


Figura 18.- Esquema de la estructura de un cloroplasto. Tomado y adaptado de Taiz y Zeiger (2010).

Dentro de las membranas tilacoidales están ubicados los dos complejos fotoquímicos que forman parte del aparato fotosintético, el PSI y PSII. Estos complejos se encuentran separados espacialmente y trabajan en serie para llevar a cabo las primeras reacciones de la fotosíntesis. Cada uno cuenta con un complejo cosechador de luz y un centro de reacción (Taiz y Zeiger, 2010).

El fotosistema I (PSI), se ubica principalmente en las lamelas del estroma (Figura 18), absorbe longitudes de onda del espectro luminoso mayores a 680nm (rojo lejano); produce un reductor fuerte (FNR) el cual reduce el NADP^+ a NADPH y las clorofilas de su centro de reacción absorben la luz a una longitud de onda de 700nm, por lo que también se conoce como P700 (Figura 19).

El fotosistema II (PSII) está localizado principalmente en la lamela (Figura 18) de la grana, posee un centro de reacción cuyas clorofilas tienen una absorción máxima y

preferencial de 680 nm (rojo en el espectro visible), por lo que también es conocido como P680. En este fotosistema (en el centro de evolución de oxígeno) se lleva a cabo el primer paso del proceso fotosintético, la fotólisis del agua (Figura 19), cuya oxidación produce 1 molécula de O₂, 4 H⁺ y 4 e⁻ (Taiz y Zeiger, 2010).

La ATP sintasa del aparato fotosintético está localizada en la membrana tilacoidal y se encarga de producir ATP utilizando el gradiente electroquímico que se produce por la difusión de protones del lumen tilacoidal al estroma durante las reacciones lumínicas de la fotosíntesis (Figura 19) (Taiz y Zeiger, 2010).

La plastoquinona (PQ), el citocromo_{b6f} (Cyt_{b6f}), la plastocianina (PC), la ferredoxina y la flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNR), son transportadores oxidoreductores del aparato fotosintético que se encargan de la transferencia de electrones durante la fotosíntesis (Figura 19) (Taiz y Zeiger, 2010).

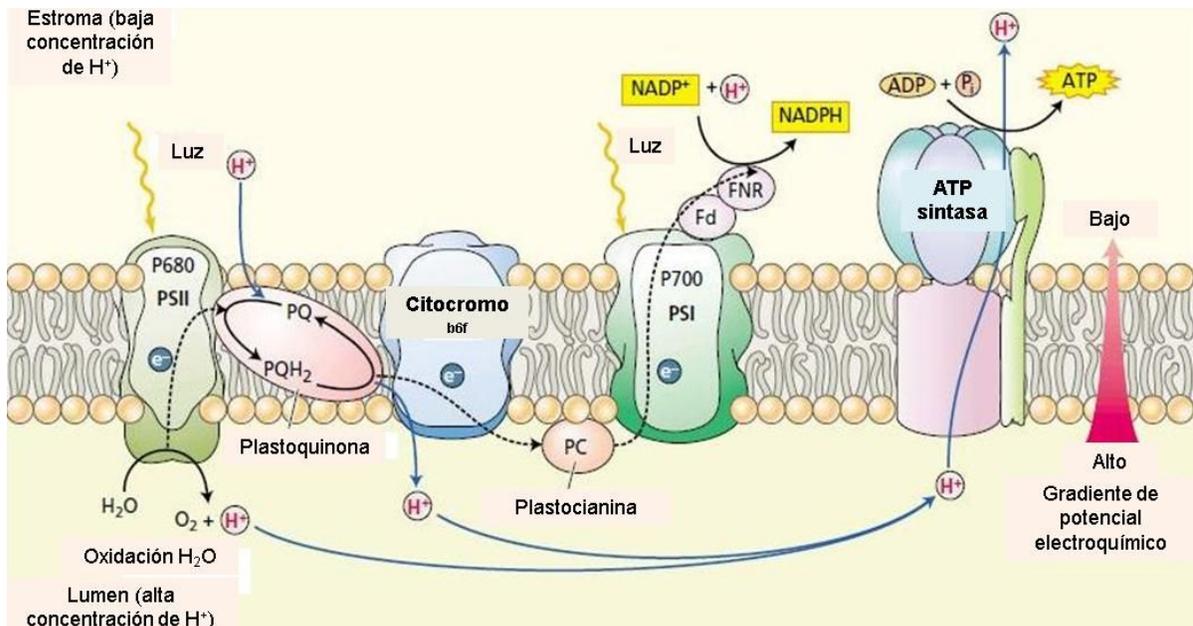


Figura 19.- Cadena transportadora de electrones, en la membrana tilacoidal de cloroplastos, durante la fotosíntesis. Tomado y adaptado de Taiz y Zeiger (2010).

Fotosíntesis: Reacciones lumínicas y reacciones de carbono

El proceso fotosintético se puede dividir en dos grupos de reacciones: reacciones lumínicas (fase lumínica) y reacciones de carbono (fase bioquímica).

En las reacciones lumínicas de la fotosíntesis la luz es utilizada como energía para llevar a cabo las reacciones bioquímicas. En estas reacciones, los fotones son absorbidos por los complejos antena de los centros de los fotosistemas, conformados por pigmentos fotosintéticos (principalmente las clorofilas) y los excitan. Las clorofilas excitadas transfieren la energía (e^-) a un centro de reacción y se comienza una serie de reacciones que finaliza con la captura de energía en forma de enlaces químicos (ATP y NADPH) (González-Moreno *et al.*, 2008; Taiz y Zeiger, 2010). Este grupo de reacciones se lleva a cabo en las membranas tilacoidales del cloroplasto e involucra

los fotosistemas, PSI y PSII, los transportadores oxidoreductores, PQ, Cyt_{b6/f}, PC, Fd y FNR.

Durante esta fase de la fotosíntesis se oxida el agua (en el Centro de Evolución de Oxígeno del PSII), liberando O₂, 4 protones, los cuales son transportados a través de la membrana tilacoidal al lumen tilacoidal y contribuyen al gradiente electroquímico que es utilizado para sintetizar ATP a partir de ADP, mediante la ATP sintasa, y, 4 electrones, que son utilizados para reducir NADPH. En resumen, durante la fase lumínica de la fotosíntesis se producen ATP y NADPH, los cuales posteriormente son utilizados en las reacciones de carbono (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2010).

Las reacciones de carbono o reacciones de la fase bioquímica se llevan a cabo en el estroma de los cloroplastos, durante esta fase, se reduce y se fija carbono para producir carbohidratos, utilizando el ATP y el NADPH generados durante la fase lumínica. La reducción de CO₂ se realiza mediante el ciclo de Calvin. En este ciclo, el CO₂ y agua son combinados con una molécula de 5 carbonos (ribulosa-1,5-bifosfato) mediante la enzima RuBisCO para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Posteriormente, este 3-fosfoglicerato es reducido a gliceraldehído-3-fosfato (en plantas C3) utilizando el ATP y NADPH, mientras que en las plantas C4 la carboxilación la realiza la enzima PEPC y se forman moléculas de cuatro carbonos (malato). Para que las plantas puedan continuar fijando carbono, el aceptor ribulosa-1,5-bifosfato debe ser regenerado a partir de gliceraldehído-3-fosfato (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2010).

Por cada ciclo se incorpora una molécula de CO_2 para lo que se requieren 2 NADPH y 3 ATP; por lo que para formar una molécula de seis carbonos (una molécula de glucosa) se requieren seis ciclos (12 NADPH, 18 ATP y 12 moléculas de H_2O) (Lambers *et al.*, 1998; Taiz y Zeiger, 2010).

ANEXO II

Fluorescencia de la clorofila a

En la fotosíntesis, una vez que la clorofila (Chl) absorbe un fotón, esta pasa de un estado basal a un estado excitado (Chl*), en este estado la energía de la clorofila está disponible y puede (Figura 20):

- a) Ser transferida a otras moléculas de clorofila
- b) Ser transferida hasta el centro de reacción de los fotosistemas y así participar en las reacciones fotoquímicas
- c) Perderse en forma de calor (la clorofila regresa a su estado basal mediante la conversión de su energía de excitación a calor)
- d) Ser reemitida en forma de energía radiante de menor energía (reemite un fotón), lo que se conoce como fluorescencia de la clorofila

Todos estos procesos ocurren de manera simultánea, por lo que el aumento de uno disminuye el otro, por lo general en hojas sanas alrededor del 90% de los fotones absorbidos por la clorofila a es utilizado en los procesos fotoquímicos, mientras que aproximadamente el 2.5% se libera en forma de calor y cerca del 0.5% se reemite en forma de un fotón de menor energía (fluorescencia). Por lo que la fluorescencia de la clorofila a puede ser utilizada para obtener información sobre la actividad fotoquímica del aparato fotosintético (González-Moreno *et al.*, 2008).

La mayor emisión de fluorescencia la tiene la clorofila a del PSII (Baker, 2008).

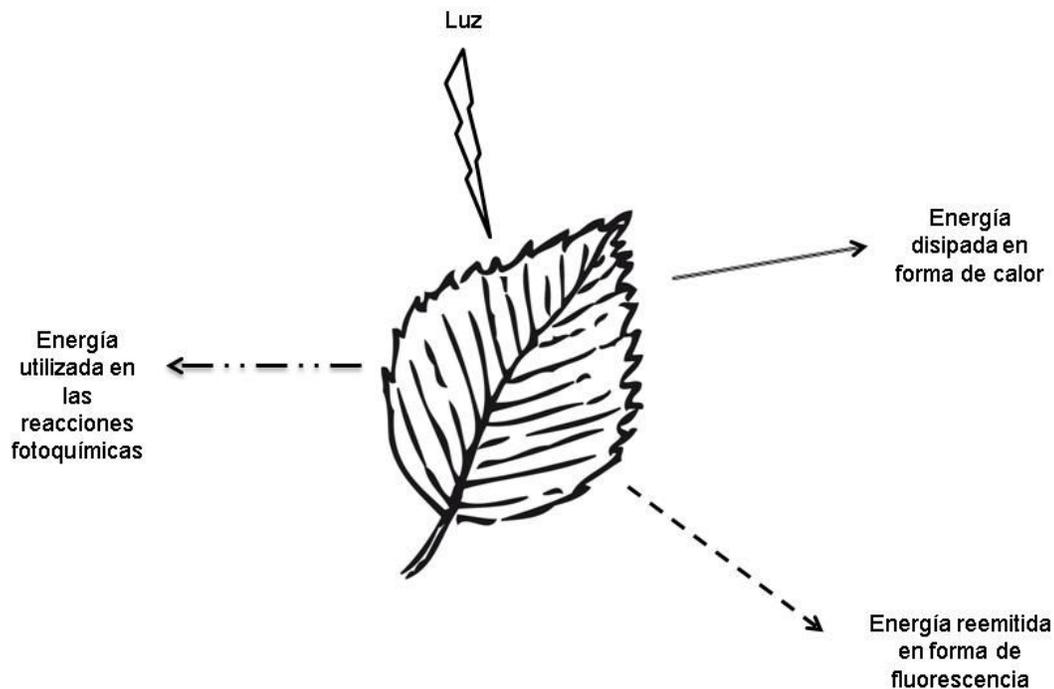


Figura 20.- Esquema sobre el uso de energía luminosa en una hoja. La mayoría de la energía lumínica en hojas bajo condiciones óptimas es utilizada en los procesos fotosintéticos, mientras que una pequeña parte esta energía (que no es utilizada para llevar a cabo las reacciones fotoquímicas) es disipada en forma de calor o de fluorescencia.

Modelo de fluorescencia

Cuando una hoja es adaptada a la oscuridad y se somete a un haz de luz blanca intenso, ocurre un patrón característico de fluorescencia de la clorofila conocido como la cinética de Kautsky (Figura 21) (González-Moreno *et al.*, 2008; Lambers *et al.*, 1998).

En este patrón se observa:

- O: el valor inmediato de fluorescencia después de recibir el estímulo lumínico, en este momento los centros de reacción se encuentran oxidados (abiertos),

este valor representa la fluorescencia mínima (F_o) y se mantiene momentáneamente.

- J: Parte de la curva representa el momento en el que la Q_A está parcialmente reducida.
- I: Parte de la curva que representa la reducción parcial de la Q_A y la Q_B .
- P: Representa el valor de la fluorescencia máxima (F_m), cuando todos los centros de reacción están reducidos.
- P-S: A partir del valor de F_m (P) comienza a decaer la intensidad de la fluorescencia.

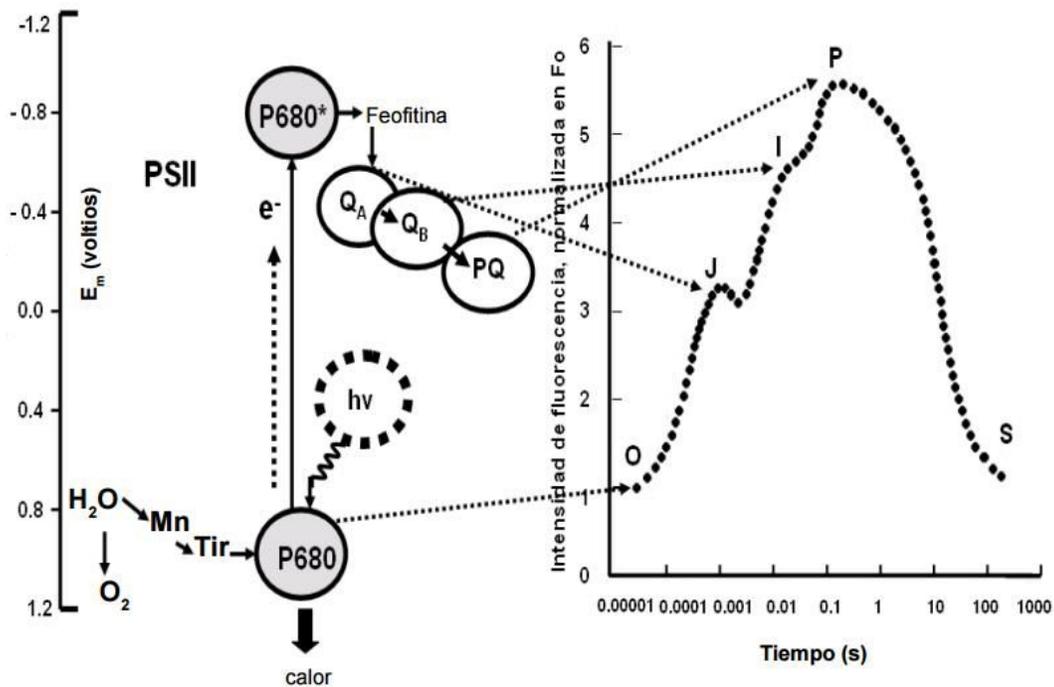


Figura 21.- Emisión de la fluorescencia de la clorofila a, cinética de Kautsky. **O** es el valor de la fluorescencia mínima. **J** se refiere a la reducción parcial de Q_A . **I** representa la reducción parcial de Q_A y Q_B . **P** es el valor de la fluorescencia máxima, momento en el que todos los centros de reacción están reducidos. Tomado de González-Moreno *et al.*, 2008.

El análisis de la clorofila *a* permite evaluar de manera *in vivo* e *in situ* los efectos que diferentes factores de estrés pueden provocar en el PSII de manera que se puede obtener información sobre la actividad fotosintética de las plantas bajo diferentes factores de estrés, los cuales, al afectar la actividad del PSII, generan un aumento en la emisión de fluorescencia.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, P., Umar, S. & Sharma, S. (2010). Mechanism of Free Radical Scavenging and Role of Phytohormones in Plants Under Abiotic Stress. En: Ashraf, M., Ozturk, M. & Ahmad, M. S. A. (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 99-118). Netherlands: Springer.

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

Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals and Metalloids as Micronutrients for Plants and Animals. En: Alloway, B. J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, *Environmental Pollution*, Vol. 22, (pp. 195-209). Netherlands: Springer.

Alvarado, C.J., Dasgupta-Schubert, N., Ambriz, E., Sánchez-Yañez, J. M. & Villegas, J. (2011). Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(4) 357-364.

Andrés-Colás, N. (2008). Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*: Efectos de la alteración de su expresión en plantas transgénicas. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.

Appenroth, K.-J. (2010). Definition of “Heavy Metals” and Their Role in Biological Systems. En: Sherameti, I. & Varma, A. (Eds.), *Soil Heavy Metals*, *Soil Biology*, Vol. 19, (pp. 19-29). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Argüello, J. M., Raimunda, D. & González-Guerrero, M. (2012). Metal Transport across Biomembranes: Emerging Models for a Distinct Chemistry. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(17): 13510–13517.

Ashraf, M., Ozturk, M. & Ahmad, M. S. A. (2010). Toxins and Their Phytoremediation. En: Ashraf, M., Ozturk, M. & Ahmad, M. S. A. (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp.1-32). Netherlands: Springer.

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 89-113.

Bashir, H., Ibrahim, M. M., Bagheri, R., Arif, I., Baig, M. & Qureshi, M. (2015). Influence of sulfur and cadmium on antioxidants, phytochelatins and growth in Indian mustard. *AoB PLANTS*, 7:1-13.

Barker, A. V., Pilbeam, D. J. (2006). *Handbook of Plant Nutrition*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press.

Beladi, M., Kashani, A., Habibi, D., Paknejad, F. & Golshan, M. (2011). Uptake and effects of lead and copper on three plant species in contaminated soils: Role of phytochelatin. *African Journal of Agricultural Research*, 6(15):3483-3492.

Bona, E., Marsano, F., Cavaletto, M. & Berta, G. (2007). Copper stress in *Cannabis sativa* roots: morphological and proteomic analysis. *Caryologia*, 60(1-2): 96-101.

Boojar, M. M. A. & Goodarzi, F. (2007). The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere*, 67: 138–2147.

Bouazizi, H., Jouili, H., Geitman, A. & El Ferjani, E. (2011). Cell wall accumulation of Cu ions and modulation of lignifying enzymes in primary leaves of bean seedlings exposed to excess copper. *Biology of Trace Element Research*, 139(1): 97-107.

Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A. & El Ferjani, E. (2010). Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1304-1308.

Bultynck, L., Fiorani, F. & Lambers, H. (1999). Control of leaf growth and its role in determining variation in plant growth rate from an ecological perspective. *Plant Biology*, 1: 13–18.

Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M. & Pilon, M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytologist*, 182: 799–816.

Burzyński, M. & Kłobus, G. (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica*, 42(4): 505-510.

Cambrollé, J., García, J. L., Ocete, R., Figueroa, M. E. & Cantos, M. (2013). Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere*, 93: 294–301.

Cambrollé, J., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Luque, T. & Figueroa, M. E. (2011). Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 57–64.

Campbell, C. G. (1997). Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 19. Institute of

Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.

Cassierra-Posada, F. & Poveda, J. (2005). La toxicidad por exceso de Mn y Zn disminuye la producción de materia seca, los pigmentos foliares y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). *Agronomía Colombiana*, 23(2): 283-289.

Cawoy, V., Ledent, J.-F., Kinet, J.-M. & Jacquemart, A.-L. (2009). Floral Biology of Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3 (Número especial 1): 1-9.

Ceacero, C. J., Díaz-Hernández, J. L., Del Campo, A. D. & Navarro-Cerrillo, R. M^a. (2012). Evaluación temprana de técnicas de restauración forestal mediante fluorescencia de la clorofila y diagnóstico de vitalidad de brinzales de encina (*Quercus ilex* sub. *ballota*). *Bosque (Valdivia)*, 33(2): 191-202.

Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H. & Górecki, H. (2005). Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Science of the Total Environment*, 337: 175– 182.

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

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707–1719.

Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R. & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends in Plant Science*, 11: 80-88.

Dal Corso, G. (2012). Heavy Metal Toxicity in Plants. En: Furini, A. (ed.), *Plants and Heavy Metals* (pp. 1-25). Netherlands: Springer.

Dey, S., Mazumder, P. B. & Paul, S. B. (2015). Copper-induced changes in growth and antioxidative mechanisms of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *African Journal of Biotechnology*, 14(7): 582-592.

Ernts, WHO. (1974). Schwermetallvegetation der Erde. Gustav Fischer, Stuttgart.

Evans, G. C. (1972). The Quantitative Analysis of Plant Growth. Oxford, Reino Unido: Blackwell Scientific Publications.

Farooq, S. & Tahir, I. (1987). Comparative study of some growth attributes in buckwheat (*Fagopyrum* sp.) cultivated in Kashmir. *Fagopyrum*, 7: 9-12.

- Gaberščik, A., Vončina, M., Trošt, T., Germ, M. & Björn, L. (2002). Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1): 30-36.
- Galán, E. & Romero, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla*, 10: 48-60.
- Gardezi, A. K., Barcelo-Quintal, I.D., Cetina-Alcalá, V. M., Laure Bussy, A., Pérez-Nieto, J. & Borja-Salin, M. A. (2006). Absorción de cobre y características de *Leucaena leucocephala* asociada con *Glomus* spp. y *Rhizobium* en suelo contaminado del Río Lerma, México. *TERRA Latinoamericana*, 24(3): 347-354.
- Gasic, K. & Korban, S. S. (2006). Heavy Metal Stress. En: Madhava, K. V., Raghavendra, A. S. & Janardhan, K. (Eds.), *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants* (pp. 219-254). Netherlands: Springer.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3): 369-385.
- González-Mendoza, D. & Zapata-Pérez, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: 53-61.
- González-Moreno, S., Perales-Vela, H. & Salcedo-Alvarez, M. O. (2008). La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4): 119-129.
- Guo, W.- J., Meetam, M. & Goldsbrough, P. B. (2008). Examining the Specific Contributions of Individual *Arabidopsis* Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance. *Plant Physiology*, 146: 1697–1706.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): (1-11).
- Hänsch, R. & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 259-266.
- Haque, N., Peralta-Videa, J. R., Jones, G. L., Gill, T. E. & Gardea-Torresdey, J. L. (2008). Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis*

sarothroides Gray) growing in mine tailings in Arizona, USA. *Environmental Pollution*, 153(2): 362-368.

Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M. B. & Bousetta, H. (2009). Photosynthesis and growth response of pea *Pisum sativum* L. under heavy metal stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 1552-1556.

Heckathorn, S., Muller, K., LaGuidice, S., Zhue, B., Barrett, T., Balir, B. & Dong, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany*, 91(9): 1312-1318.

Herrera-Estrella, L. R. & Guevara-García, A. A. (2009). Heavy Metal Adaptation. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons.

Hohl, H. & Varma, A. (2010). Soil: The Living Matrix. En: Sherameti, I. & Varma, A. (Eds.), *Soil Heavy Metals*, Soil Biology, Vol. 19, (pp. 1-18). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Hooda, V. (2007). Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*, 28(2): 367-376.

Hossain, M. A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J.A. & Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, 2012: 1-37.

Hunt, R. (1990). Basic Growth Analysis. Plant Growth Analysis for Beginners. Londres, Reino Unido: Unwin Hyman.

Ippolito, J. A., Ducey, T.F. & Tarkalson, D.D. (2011). Effect of Copper Applications to Soil on Growth and Mineral Contents of Tomato Plants. *Journal of Agricultural Science*, 3(2): 128-148.

Iwasaki, K., Sakurai, K. & Takahashi, E. (1990). Copper Binding by the Root Cell Walls of Italian Ryegrass and Red Clover. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36(3): 431-439.

Jain, R., Shrivastava, A. K., Solomon, S. & Sangeeta, S. (2008). Influence of excess copper on sugarcane metabolism and nutrient composition. *Indian Journal of Plant Physiology*, 13:84–87.

Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants* (4 ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Kaplan, M., Sonmez, S., Sonmez, N. K. & Kaya, H. (2010). Influence of copper and sulphur applications on the growth and nutrient contents of tomato plants. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(3&4): 728-732.
- Ke, W., Xiong, Z., Xie, M. & Luo, Q. (2007). Accumulation, subcellular localization and ecophysiological responses to copper stress in two *Daucus carota* L. populations. *Plant Soil*, 292: 291–304.
- Khatun, S., Babar Ali, M., Hahn, E.-J. & Paek, K.-Y: (2008). Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environmental and Experimental Botany*, 64: 279–285.
- Kopsell, D. E. & Kopsell, D. A. (2007) Copper. En Barker, A. V. & Pilbeam, D. J. (Eds.) *Handbook of Plant Nutrition* (pp. 293-328). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lal, N. (2010). Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants. En: Ashraf, M., Ozturk, M. & Ahmad, M. S. A. (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 35-58). Netherlands: Springer.
- Lambers, H., Chapin, III. F. S. & Pons, T. L. (1998). *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer.
- Lin, S.-L. & Wu, L. (1994). Effects of copper concentration on mineral nutrient uptake and copper accumulation in protein of copper-tolerant and nontolerant *Lotus purshianus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29: 214-228.
- Liu, J., Xiong, 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. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 43–51.
- Lou, L.- q., Shen, Z.- g. & Li, X.- d. (2004). The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany*, 51: 111–120.
- Ma, J. F. & Hiradate S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta*, 211: 355-360.
- Ma, J. F., Hiradate, S. & Matsumoto, H. (1998). High Aluminum Resistance in Buckwheat. II. Oxalic Acid Detoxifies Aluminum Internally. *Plant Physiol.*, 117: 753–759.

- Ma, J.F., Ueno, D., Zhao, F.J. & McGrath, S. P. (2005). Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, 220: 731-736.
- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G. & Marmioli, N. (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 1–13.
- Manara, A. (2012). Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. En: Furini, A (Ed.), *Plants and Heavy Metals* (pp. 27-53). Netherlands: Springer.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Boston, Estados Unidos: Academic Press.
- Martínez, A. Y. (2013). Efecto del aluminio en el crecimiento relativo, tasa fotosintética, y asociación con cristales de oxalato durante el ciclo de vida de *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae). Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Trujillo, M., Sántiz-Gómez, M., Ortiz Castro, R. & Carreón-Abud, Y. (2009). Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *Biológicas*, 11: 122–131.
- Martins, V., Hanana, M., Blumwald, E. & Gerós, H. (2012). Copper Transport and Compartmentation in Grape Cells. *Plant and Cell Physiology*, 53(11): 1866–1880.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J. & Perez-Martin, A. (2013). Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90: 136–142.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J. & Figueroa, M. E. (2008). Growth and photosynthetic responses to copper stress of invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research*, 66: 459-465.
- Matsuura, A., Inanaga, S. & Murata, K. (2005). Differences in Vegetative Growth between Common and Tartary Buckwheat in Saline Hydroponic Culture. *Plant Production Science*, 8(5): 533-538.
- Meza-Figueroa, D., Maier, R., De la O Villanueva, L., Gómez-Alvárez, A., Moreno-Zazueta, A., Rivera, J., Capillo, A., Grandlic, C. J., 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.

Mijovilovich, A., Leitenmaier, B., Meyer-Klaucke, W., Kroneck, P. M. H., Götz, B. & Küpper, H. (2009). Complexation and Toxicity of Copper in Higher Plants. II. Different Mechanisms for Copper versus Cadmium Detoxification in the Copper-Sensitive Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype). *Plant Physiology*, 151:715–731.

Mizuno, T., Nakagawa, M., Ono, H., Sugiura, D., Tamura, H. & Obata, H. (2010). Isolation of multidrug resistance associated protein like gene from lead hyperaccumulator common buckwheat and its lead detoxification ability. *Plant Biotechnology*, 27: 39–46.

Murphy, A. & Taiz, L. (1995). A new vertical mesh transfer technique for metal tolerance studies in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108: 29-38.

Myśliwa-Kurdziel, B. & Strzałka, K. (2002). Influence of Metals on Biosynthesis of Photosynthetic Pigments. En Prasad, M. N. V. & Strzałka, K. (Eds.) *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 201-227). Netherlands: Springer.

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett*, 8:199–216.

Navari-Izzo, F. & Rascio, N. (2011). Heavy Metal Pollution: Damage and Defense Strategies in Plants. En: Pessaraki, M. (ed.) *Handbook of Plant and Crop Stress* (3 ed.) (pp. 675- 711). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar-Alonso, I. & López-Moya. J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2): 10-25.

Nikolić, D.B., Samardžić, J. T., Bratić, A. M., Radin, I. P., Gavrilović, S. P., Rausch, T. & Maksimović, V. R. (2010). Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu (2+) and Cd (2+) treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3488–3494.

Orroño, D. I. (2002). Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias.

Ouzounidou, G. (1994). Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 34(2): 165-172.

- Palmer, C. M. & Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology*, 5(5): 333-340.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A. M. & Karataglis, S. (2001). Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany*, 88: 207-214.
- Pavek, P.L.S. (2014). Plant Guide for buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman Plant Materials Center. Pullman, WA.
- Peng, H., Yang, X. & Tian, S. (2005). Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science*, 6b(5): 311-318.
- Percival, G. C. (2004). Evaluation of Physiological Tests as Predictors of Young Tree Establishment and Growth. *Journal of Arboriculture*, 30(2): 80-91.
- Pérez-Amaro. J. A., García, M. E., Enriquez, Q. J. F., Quero, C. A., Pérez, P. J. & Hernández, G. A. (2004). Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto "mulato" (*Brachiaria híbrido*, cv). *Tecnología Pecuaria Mexicana*, 42(3): 447-458.
- Pineda, R. (2004). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de cinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus* L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina. Tesis Doctoral. Universidad de Colima.
- Prieto-Méndez, J., González-Ramírez, C. A., Román Gutiérrez, A. D. & Prieto García, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 29–44.
- Quinet, M., Cawoy, V., Lefèvre, I., Van Miegroet, F., Jacquemart, A.-L. & Kinet, J.-M. (2004). Inflorescence structure and control of flowering time and duration by light in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Experimental Botany*, 55(402): 1509–1517.
- Ramírez-Rodríguez, V., López-Bucio, J. & Herrera-Estrella L. (2005). Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. En: Jenks, M. A. & Hasegawa, P. M. (Eds.), *Plant Abiotic Stress* (pp. 145- 170). Oxford: Blackwell Publishing.

- Rascio, N. & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180: 169–181.
- Ratan, P. & Kothiyal, P. (2011). *Fagopyrum esculentum* Moench (common buckwheat) edible plant of Himalayas: A Review. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 1(4): 426-442.
- Reeves, R. D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. En: Morel, J-L., Echeverria, G. & Goncharova, N. (Eds.) *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils* (pp. 25-52). Netherlands: Springer.
- Reich, P. B., Ellsworth, D.S. & Walters, M.B. (1998). Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis–nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Functional Ecology*, 12: 948–958.
- Rousseau, R. M., Willis, J. P. & Duncan, A.R. (1996). Practical XFR calibration procedures for major and trace elements. *X-Ray Spectrometry*, 25: 179–189.
- Rueda-Saa, G., Rodríguez-Victoria, J. A. & Madriñán-Molina, R. (2011). Metodologías para establecer valores de referencia de metales pesados en suelos agrícolas: Perspectivas para Colombia. *Acta Agronómica*, 60(3): 213-218.
- Ruvalcaba-Sil, J. L., Ramírez-Miranda, D., Aguilar-Melo, V. & Picazo, F. (2010). SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. *X-Ray Spectrometry*, 39: 338–345.
- Salt, D.E., Kato, N., Krämer, U., Smith, R.D. & Raskin, I. (2000) The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. En: Terry, N. & Bañuelos, G.S. (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (pp.189-200). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sánchez-Viveros, G. (2012). Mecanismos de tolerancia del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre. Tesis Doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Sánchez-Viveros, G., González-Mendoza, D., Alarcón, A. & Ferrera-Cerrato, R. (2010). Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(3): 365–368.

- Saxena, P. & Misra, N. (2010). Remediation of Heavy Metal Contaminated Tropical Land. En: Sherameti, I. & Varma, A. (Eds.), *Soil Heavy Metals*, Soil Biology, Vol. 19, (pp. 431-477). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schützendübel, A. & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection and mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351- 1365.
- Shah, R. F., Ahmad, N., Masood, K. R., Peralta-Videa, J. R. & Ahmad, F.D. (2010). Heavy Metal Toxicity in Plants. En: Ashraf, M., Ozturk, M. & Ahmad, M. S. A. (Eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation* (pp. 71-97). Netherlands: Springer.
- Sharma, S. S. & Dietz, K-J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4): 711–726.
- Shen, R., Iwashita, T. & Ma, J. F. (2004). Form of Al changes with Al concentration in leaves of buckwheat. *Journal of Experimental Botany*, 55(394): 131-136.
- Shu, X., Yin, L., Zhang, Q. & Wang, W. (2011). Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(3):893-902.
- Song, Z.Z., Duan, C. L., Guo, S. L., Yang, Y., Feng, Y. F., Ma, R. J. & Yu, M. L. (2015). Potassium contributes to zinc stress tolerance in peach (*Prunus persica*) seedlings by enhancing photosynthesis and the antioxidant defense system. *Genetics and Molecular Research*, 14(3): 8338-8351.
- Sonmez, S. (2007). Effect of copper applications to soil on growth and mineral contents of tomato plants. *Asian Journal of Chemistry*, 19(3): 2151-2160.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5 ed.). Massachusetts, Estados Unidos: Sinauer Associates Inc.
- Tamura, H., Honda, M., Sato, T. & Kamachi, H. (2005). Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Plant Research*, 118: 355–359.
- Tani, F. H. & Barrington, S. (2005). Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environmental Pollution*, 138: 548–558.

- Tsutsumimoto, K. & Tsuji, K. (2007). Time-resolved x-ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants. *X-Ray Spectrometry*, 36: 324-327.
- Vassilev, A. & Yordanov, I. (1997). Reductive Analysis of Factors Limiting Growth of Cadmium-treated Plants: A Review. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23(3-4): 114-133.
- Vassilev, A., C. Lidon, F., do Céu Matos, M., C. Ramalho, J. & Yordanov, I. (2002). Photosynthetic Performance and Content of Some Nutrients in Cadmium- and Copper-treated Barley Plants. *Journal of Plant Nutrition*. 25(11): 2343-2360.
- Vázquez-Glaría, A., González Torres, L. R., Berazaín Iturralde, R. & Eldis Bécquer Granados, E. (2006). Flora de la región ultramáfica (serpentinícola) de Guamuhaya. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 27: 75-84.
- Vera, A. G. (2006). Estudio del efecto de cobre sobre poblaciones tolerantes y no tolerantes al metal de la especie *Mimulus luteus* var. *variegatus*. Tesis de licenciatura. Universidad de Santiago de Chile.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sossé, B. & Badot, P.-M. (2002). Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science*, 163: 53-58.
- Vinod, K., Awasthi, G. & Chauhan, P. K. (2012). Cu and Zn tolerance and responses of the Biochemical and Physiochemical system of Wheat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(3): 203-213.
- Vogel-Mikuš, K., Pelicon, P., Vavpetič, P., Kreft, I. & Regvar, M. (2009). Elemental analysis of edible grains by micro-PIXE: Common buckwheat case study. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B* 267: 2884-2889.
- Xia, Y., Qi, Y., Yuan, Y., Wang, G., Cui, J., Chen, Y., Zhang, H. & Shen, Z. (2012). Overexpression of *Elsholtzia haichowensis* metallothionein 1 (EhMT1) in tobacco plants enhances copper tolerance and accumulation in root cytoplasm and decreases hydrogen peroxide production. *Journal of Hazardous Materials*, 233-234: 65-7.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76: 167-179.

- Yang, M. J., Yang, X. E. & Römheld, V. (2002). Growth and nutrient composition of *Elsholtzia splendens* Nakai under copper toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, 25(7): 1359-1375.
- Yang, Z. & Chu, C. (2011). Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. En: Shanker, A. & Venkateswarlu, B. (Eds.), *Abiotic Stress in Plants Mechanisms and Adaptations* (pp. 59-78). ISBN: 978-953-307-394-1, InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plantsmechanismsandadaptations/towards-understanding-plant-response-to-heavy-metalstressInTech>
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Braz. Journal of Plant Physiology*, 17 (1): 145-156.
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5): 409–430.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y. & Duo, L. (2010). Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in Turfgrass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2): 7–11.
- Zheng, S. J., Ma, J. F. & Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. 1. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*, 117: 745-751.