



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA.**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DEL Cr Y
Mn EN LA FOTOSÍNTESIS Y EN LOS NIVELES DE
PIGMENTOS Y OSMOLITOS COMPATIBLES DE
*Phaseolus vulgaris, Vigna radiata y Medicago sativa.***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
OSWALDO VALDÉS LÓPEZ.



DIRECTOR DE TESIS: Dr. SERGIO GONZÁLEZ MORENO.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla. Estado de México. 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF) de la FES Iztacala, UNAM; bajo la asesoría del Dr. Sergio González Moreno.

Agradezco al Programa de Alta Exigencia Académica (PAEA) por la beca otorgada durante toda mi licenciatura.

Índice.	Páginas.
Abreviaturas.	3
Resumen	4
1.- Introducción.	5
1.1.- Antecedentes.	7
1.1.1.- Efectos de los Metales Pesados en la fotosíntesis.	7
1.1.2.- Osmolitos.	8
2.- Hipótesis.	9
3.- Objetivo general.	9
3.1 Objetivos particulares.	10
4.- Material y Métodos.	10
4.1.- Obtención de material vegetal.	10
4.2.- Tratamiento con Cr y Mn.	11
4.3.- Concentración de clorofilas y carotenoides.	11
4.4.- Rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno.	11
4.5.- Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del FSII.	11
4.6.- Análisis JIP.	12
4.7.- Medición de Fluorescencia Modulada.	13
4.8.- Aislamiento de Tilacoides.	14
4.8.1 Medición de las reacciones parciales del FSI.	14
4.9.- Cuantificación de osmolitos.	15
4.9.1.- Cuantificación de prolina.	15
4.9.2.- Cuantificación de aminoácidos libres totales (AALT).	15
4.9.3.- Cuantificación de proteína soluble.	15
4.9.4.- Cuantificación de azúcares solubles totales.	16
4.10. Cuantificación de Mn y Cr en tejidos de la planta.	16
5.- Resultados.	16
5.1.- Síntomas visibles.	16
5.2. Pigmentos fotosintéticos.	17
5.3.- Efectos del Cr y Mn en la fotosíntesis.	19
5.3.1.- Rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno.	19
5.3.2.- Emisión de Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> del FSII.	22

Índice.	Páginas.
5.3.2.1.- Efectos del Mn.	22
5.3.2.2.- Efectos del Cr.	26
5.3.3.- Análisis JIP.	28
5.3.3.1.- Efectos del Mn.	28
5.3.3.2.- Efectos del Cr.	41
5.3.4.- Efectos del Cr y Mn en el transporte de electrones del FSI.	48
5.4.- Cambios en el contenido de osmolitos.	54
5.4.1.- Efectos del Mn en los niveles de prolina.	54
5.4.1.2.- Aminoácidos libres totales (AALT).	55
5.4.1.3.- Proteína soluble.	58
5.4.1.4.- Azúcares solubles totales.	59
5.4.2.- Efectos del Cr en los niveles de prolina	59
5.4.2.1.- Aminoácidos libres totales (AALT).	60
5.4.2.2.- Proteína soluble.	62
5.4.2.3.- Azúcares solubles totales.	62
5.5.- Distribución del Cr y Mn en los tejidos de las plantas.	64
6.- Discusión.	67
7.- Conclusiones.	76
8.- Perspectivas.	77
9.- Referencias bibliográficas.	78

Resumen.

Ciertos metales pesados, como el Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} y Mn^{+2} , son considerados como micronutrientes, ya que participan en diversos procesos bioquímicos y fisiológicos que permiten el desarrollo satisfactorio de la planta. Sin embargo, en el suelo donde éstas se desarrollan pueden existir metales que no tienen función alguna (p. ej. Cd y Pb), y cuando éstos, y los considerados micronutrientes, se encuentran en altas concentraciones se tornan tóxicos y pueden provocar diversos efectos que van desde la disminución del crecimiento hasta la muerte de la planta. A pesar de que para la mayoría de los metales pesados ya se han determinado sus sitios de acción, para el caso del Mn y del Cr, aún existen controversias acerca de sus mecanismos y de sus sitios de acción, por lo que este estudio tuvo como objetivo caracterizar los efectos del Cr y Mn en la fotosíntesis, niveles de pigmentos y de solutos compatibles de frijol mungo (*V. radiata*), frijol común (*P. vulgaris*. L. Var. Ojo de Cabra), y alfalfa (*M. sativa*). En este trabajo se observó que ambos metales disminuyeron la concentración de clorofilas, probablemente por la inhibición que éstos causaron a las enzimas δ -aminolevulínico deshidratasa y sintetasa, las cuales participan en la síntesis de clorofilas. Por otro lado, el Mn no afectó el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno de las tres especies, aunque en *P. vulgaris* en el día 8 de tratamiento mostró un incremento en la liberación de oxígeno. A diferencia de lo registrado en los tratamientos con Mn, el Cr provocó un incremento en la liberación de oxígeno de las dos especies de frijol, sin embargo, la emisión de oxígeno fue disminuyendo con el tiempo de exposición, sugiriendo que el Cr puede afectar al Complejo emisor de oxígeno (CEO). En lo que respecta a los efectos del Mn en la fotosíntesis de frijol común y alfalfa, este metal provocó una acumulación de QA^- , que fue reflejado en el incremento del punto J, en los parámetros $\text{Log } \Psi_o$ y $\text{Log } \Psi_o/(1 - \Psi_o)$; además, disminuyó la interacción entre las clorofilas del complejo antena con los centros de reacción, lo cual se observó en el incremento del parámetro Log ABS/CS y en la disminución de Log RC/CS . Estos efectos y la disminución de las reacciones lumínicas ($\text{Log } \phi_o/(1 - \phi_o)$) hicieron que el comportamiento del FSII disminuyera desde los primeros días de tratamiento. Estos resultados demuestran que el Mn sí puede afectar los procesos fotoquímicos y fototermales. A diferencia de alfalfa y frijol común, frijol mungo mostró mecanismos para adaptar su FSII al estrés por Mn, los cuales fueron: 1) ciclo de inactivación y activación de los centros de reacción (CR) y del CEO; 2) disminución en la captación de energía y por tanto del complejo antena. Algunos de estos mecanismos fueron observados en frijol común tratado con 1 mM de Mn. Lo anterior demuestra que los sitios y mecanismos de acción del Mn son: disminución en la re-oxidación de QA^- (incremento de QA^-), inhibición del CEO y de los CR; disminución en la interacción de las clorofilas del complejo antena con los centros de reacción; los cuales provocan el decremento del transporte de electrones.

A diferencia de Mn, se observó que el Cr en alfalfa provocó la disminución del transporte de electrones desde el primer día de tratamiento, mientras que en las dos especies de frijol, todos los parámetros de fluorescencia no se vieron afectados e inclusive indican un incremento en el transporte de electrones, lo cual pudo favorecer el estrés oxidativo.

Finalmente, se observó que en frijol mungo y en alfalfa tratadas con Mn hay una tendencia a incrementar los niveles de prolina, lo cual no fue observado en frijol común; además, solo en frijol mungo en el día 6 se observó la disminución de la concentración de prolina en hoja, sugiriendo que en esta especie se lleva a cabo la oxidación y re-síntesis de este aminoácido para evitar un desequilibrio redox. En el caso de los niveles de azúcares solubles y aminoácidos libres totales, en las tres especies estudiadas no se observó un patrón definido de variación en su concentración. En el caso de los tratamientos con Cr, en las tres especies hubo un incremento de los niveles de prolina y proteína soluble, sugiriendo que estos osmolitos tienen una función osmoreguladora.

1.- Introducción.

Metales pesados como el Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} y Fe^{+2} son micronutrientes esenciales para las plantas, ya que participan en diversos procesos bioquímicos y fisiológicos. Por ejemplo, el Mn es de gran importancia en la fotosíntesis, ya que es un componente del complejo emisor de oxígeno (CEO), con una función transportadora de electrones obtenidos de la fotólisis del agua. Por su parte, el Cu es un componente de la plastocianina en la cadena transportadora de electrones fotosintética y en la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. Así mismo, estos cuatro metales son cofactores de las isoformas de la Superóxido dismutasa (SOD). Sin embargo, existen metales que no tienen ninguna función fisiológica (P. ej. Cr, Pb y Cd), y cuando éstos, e inclusive los que se consideran como esenciales, se encuentran en altas concentraciones se tornan tóxicos para las plantas, afectando de esta forma su desarrollo, su productividad, y además pueden provocar su muerte, (Bowler, *et. al.* 1992. Pandey, *et. al.* 2003. Prasad, 1995. Taiz y Zeiger, 2002).

De acuerdo a varios estudios, se ha determinado que los efectos de los metales pesados dependen del ión y de la concentración del mismo, así como de la especie de la planta y de las condiciones en las que ésta crece. Por ejemplo, los síntomas visibles que provoca el exceso de Mn son la clorosis, la necrosis, decoloración de las raíces y formación de puntos cafés en las hojas (Wisseimer y Horst, 1992. Lydon, 2002). De igual forma, se ha demostrado que la mayoría de los daños que provoca la toxicidad de los metales pesados están asociados a la generación de radicales libres; al bloqueo en el transporte de electrones del fotosistema II; al desequilibrio osmótico, entre otros, (Chen, *et. al.* 2001. Ralph y Burchett, 1998. Rai, *et. al.* 2004).

Aunque para la mayoría de los metales pesados ya se tienen bien ubicados sus sitios de acción, para otros, como el Mn y el Cr, aún no se han dilucidado por completo sus mecanismos de acción. Para el caso del Mn, se han propuesto tres hipótesis con las cuales se ha tratado de explicar los efectos de este metal; éstas son: a) desequilibrio hormonal; b) deficiencia de Fe^{+2} , y c) daño a las enzimas de la maquinaria antioxidativa. Sin embargo, se ha encontrado que las

concentraciones de Fe en hojas no disminuye considerablemente, al igual que la actividad de la catalasa y de la peroxidasa, por lo que se ha descartado el efecto sobre la captación de Fe y por daño a las enzimas de la maquinaria antioxidativa, (Nable, *et. al.* 1988). Sin embargo, se ha observado que la fotosíntesis neta si es afectada por este metal.

En cuanto al efecto del Mn sobre la fotosíntesis, Houtz y colaboradores (1988) mencionan que dicho metal afecta la actividad carboxilasa de la Ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxidasa (Rubisco) y a la regeneración de la Ribulosa 1-5 bisfosfato (RuBP). Ellos atribuyen este efecto a la disminución del Mg^{2+} y a la formación del complejo Rubisco- Mn^{+2} , el cual induce la actividad oxidada de esta enzima. Pese a estos resultados, hay quienes proponen que este metal daña la estructura del cloroplasto y que la actividad carboxilasa no es afectada, (González y Lynch, 1997). A pesar de estas discrepancias, los resultados de Houtz (1988) fueron corroborados en 1997 por Kitao y colaboradores, quienes además mencionan que la eficiencia en la captación de excitones disminuye, lo cual provoca la disminución en la eficiencia cuántica del fotosistema II, un incremento de la cantidad de QA reducidas y en la disipación de energía en forma de calor.

Como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de los metales pesados están relacionados con la generación de radicales libres lo cual provoca el estrés oxidativo. En un caso específico, se ha observado que durante el proceso de oxidación del Cr VI, se genera especies reactivas de oxígeno, (Cervantes, *et. al.* 2001). Esto se ha comprobado en plantas de frijol mungo, en las cuales se observó que la actividad de la catalasa, de la ascorbato peroxidasa y de la superóxido dismutasa se incrementa, (Shanker, *et. al.* 2004. Samantary, 2002). En relación al efecto de este metal en la fotosíntesis, se tiene reportado que daña al CEO y que afecta a la transferencia de electrones, (Apperoth, *et. al.* 2001. Mallick y Mohn. 2003)

Para aminorar los efectos de los metales pesados, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos, como la compartimentalización en vacuolas, síntesis de fitoquelatinas y acumulación de solutos compatibles, (Hall, 2002. Wu, *et. al.* 2002.

Hirschi, *et. al.* 2000), estos últimos como respuesta al desequilibrio hídrico que generalmente ocasionan los metales pesados.

En relación a los solutos compatibles, se ha observado que los principales osmolitos que se acumulan son la prolina, la glicina betaína, el manitol, el sorbitol y la trehalosa, y las funciones que se les han atribuido son las de regular las presiones osmóticas, mantener la conformación cuaternaria de proteínas y enzimas, así como proteger al aparato fotosintético, entre otras, (Hoekstra, *et. al.* 2001. Alia y Saradhi, 1993. Allakhverdiev, *et. al.* 2003).

1.1.-Antecedentes.

1.1.1.-Efecto de los metales pesados en la fotosíntesis.

Se ha demostrado que el fotosistema II (FSII) es el blanco principal de los factores que provocan los distintos tipos de estrés abiótico, (Krüger, *et. al.* 1997). En el caso de los efectos que causan los metales pesados en las reacciones fotosintéticas, Pankovic, *et. al.* (2000) encontró que el Cd disminuye la liberación de oxígeno y la eficiencia cuántica del transporte de electrones del FSII, y además, afecta la regeneración de la ribulosa 1-5 bisfosfato (RuBP).

En contraste, Nable y colaboradores en 1988, mencionan que a pesar de que en las hojas de tabaco se desarrollaron los síntomas visibles que son característicos de la toxicidad del Mn (clorosis, necrosis y puntos cafés), las reacciones parciales del FSI y FSII no se vieron afectadas por este metal, y que sin embargo la fotosíntesis neta si disminuye. Por su parte, Houtz, *et. al.* (1988) reporta que la disminución en la fotosíntesis neta de plantas expuestas a la toxicidad de este metal, es debido a la inhibición de la actividad carboxilasa de la Rubisco; ya que encontraron que las concentraciones de RuBP se incrementan. Estos resultados fueron corroborados por Kitao y colaboradores en 1997, quienes además mencionan que la liberación de oxígeno no se ve afectada, y que sin embargo qP (Actividad fotoquímica) y la eficiencia para la captura de energía de excitación disminuye, y que además se incrementa el número de QA reducidas.

En cuanto a los efectos del Cr en la fotosíntesis de plantas, Apperot, *et. al.* 2003 reportó que disminuye la emisión de oxígeno y el transporte de electrones.

1.1.2.-Osmolitos compatibles.

En la actualidad está ampliamente documentado que para aminorar los daños provocados por distintos tipos de estrés abiótico, las plantas tienden a acumular ciertos solutos compatibles u osmolitos, como la prolina, la glicina betaína, azúcares solubles, proteínas solubles, entre otros, (Naidu, *et. al.* 1991. Good, *et. al.* 1994. Ghoulam, *et. al.* 2002. Chen, *et. al.* 2004).

Referente a los cambios en los niveles de osmolitos provocados por la toxicidad de los metales pesados, se ha reportado que los iones Cu, Zn, Pb, Mg, Cd y Cr,

inducen la acumulación de prolina, (Bassi, *et. al.* 1993. Mohan, *et. al.* 1997. Pandey, *et. al.* 2003). Sin embargo, Chen y colaboradores en el 2001 reportaron que el Mn no provoca la acumulación de dicho aminoácido.

Con relación a lo anterior, Chen, *et. al.* (2001) encontró que la acumulación de prolina en hojas de arroz está fuertemente correlacionada con el incremento de la actividad de la Ornitina aminotransferasa (OAT). Por su parte, Shaw, *et. al.* (2002), menciona que este mismo efecto pero en plantas de *P. aureus* y de *Triticum* es debido a la actividad de la enzima Δ 1- Pirrolin -5- carboxilato sintetasa (P5CS). Así mismo, Mohan, *et. al.* (1997) y Öncel, *et. al.* (2000), encontraron que conforme se acumulaba la prolina, los niveles de azúcares solubles y los de proteína disminuían, lo cual se atribuyó a efectos a nivel bioquímico que estimulan la síntesis y acumulación de este osmolito. Sin embargo, también se ha encontrado que este aminoácido disminuye conforme aumenta el tiempo de exposición al metal y este efecto se ha atribuido a la inhibición de su síntesis, (Bassi, *et. al.* 1993).

Varios investigadores coinciden en que la acumulación de la prolina es debido al déficit hídrico que generan los metales pesados, ya que algunos de ellos disminuyen la transpiración, (Schat, *et. al.* 1997. Chen, *et. al.* 2004.), además de que gran parte de este aminoácido tiende a acumularse en tejidos verdes (hojas y tallos).

A los osmolitos se les ha relacionado con la regulación del desequilibrio osmótico que generan los diferentes tipos de estrés abiótico, incluido el generado por los metales pesados. Sin embargo, aún en la actualidad existen controversias sobre el papel fisiológico que desempeña la prolina, ya que hay autores que mencionan que su acumulación es simplemente una respuesta fisiológica y que no tiene función alguna, (Schat, *et. al.* 1997). A pesar de lo mencionado por este investigador, existen más evidencias sobre su papel protector de enzimas y complejos proteicos, por ejemplo, Sharma, *et. al.* en 1998 reportó que en condiciones *in vitro*, la prolina protege a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y a la Nitrato reductasa de los efectos del Zn, y que reduce los niveles de iones Cd en el medio de ensayo. Inclusive existen reportes que demuestran que también sirve

como capturador de radicales libres; como agente reductor para volver a activar la cadena transportadora de electrones en procesos de recuperación, y como un donador alternativo de electrones en el FSII (Alia, *et. al.* 1991. de Ronde, *et. al.* 2004). Además existen estudios moleculares que demuestran que la prolina protege a las plantas del estrés por salinidad, por sequía y por altas temperaturas, (Kishor, *et. al.* 1995.).

2.- Hipótesis.

El Mn y el Cr pueden afectar a los procesos fotoquímicos de las plantas de alfalfa y de las dos especies de frijol, lo cual se reflejará en la eficiencia en la captación de energía lumínica y en el transporte de electrones, ya que por lo general el fotosistema II es el blanco principal de los factores que provocan los distintos tipos de estrés abiótico, y en el caso del Mn, que se ha reportado que afecta la fijación del CO_2 , cabe la posibilidad de que existan cambios a nivel fotoquímico y fototermal. Así mismo, los niveles de solutos compatibles cambiarán en los distintos tejidos de la planta (hoja, tallo y raíz), como una respuesta a la toxicidad de estos dos metales.

3.-Objetivo general.

Caracterizar los efectos del Mn^{+2} y del Cr VI en la fotosíntesis y en los niveles de pigmentos y osmolitos compatibles de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata* y *Medicago sativa*.

3.1.-Objetivos particulares.

- Caracterizar las respuestas de los Fotosistemas II y I ante la toxicidad del Mn y del Cr.
- Determinar los niveles de acumulación de prolina, aminoácidos libres totales, azúcares solubles totales y proteína soluble.

4.-Material y Métodos.

4.1.-Obtención de material vegetal.

Semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris*. Var L. ojo de cabra) obtenidas en el mercado, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 30 minutos, luego se lavaron varias veces con agua corriente y se dejaron en imbibición durante 12 horas. Posteriormente, las semillas se colocaron en cajas de plástico conteniendo agrolita[®] humedecida a saturación con solución Hoagland sin EDTA- Fe, (KH₂PO₄ 0.136 g/l. KNO₃ 0.505 g/l. Ca(NO₃)₂ 0.82 g/l. MgSO₄ 0.24 g/l. H₃BO₃ 2.86 g/l. MgCl₂ 1.81 g/l. ZnSO₄ 0.22 g/l. CuSO₄.5H₂O 0.08 g/l. H₂MoO₄ 0.02 gl.). La germinación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento a 24 °C con un fotoperiodo de 16 y 8 horas luz y oscuridad respectivamente, con una densidad de flujo fotónico de 60 μmol de fotones. m⁻².s⁻¹., y se mantuvieron en estas condiciones durante ocho días. Cada tercer día se humedeció la agrolita con agua destilada. Después de este tiempo, las plántulas se transplantaron a recipientes de plástico con 700 ml de solución Hoagland sin EDTA- Fe. En este medio de cultivo se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo antes descritas.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) fueron tratadas de igual forma que las de frijol pero después del trasplante en solución Hoagland sin EDTA-Fe se mantuvieron durante 4 días hasta la emergencia del primer par de hojas verdaderas.

4.2.-Tratamientos con Cr y Mn.

Después de 2 días del trasplante de las dos variedades de frijol, y 4 días en el caso de alfalfa, las diferentes unidades fueron tratadas con MnCl₂ 0, 1 o 2 mM, o Cr₂O₂K₇ 0, 0.15 o 0.30 mM.

A los 2, 4, 6 (8 para *P. vulgaris*) días de tratamiento con Mn, y en los dos primeros días de exposición con Cr, se determinaron los niveles de pigmentos fotosintéticos, de osmolitos compatibles, y de la acumulación de estos dos metales en los tejidos vegetales, (hoja, tallo y raíz). En estos mismos días se midió la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII, salvo que en *V. radiata* y

M. sativa, se hizo una medición a los 9 días. El transporte de electrones del FSI se midió a los 5 y 2 días de tratamiento con Mn y Cr, respectivamente.

4.3.-Concentración de clorofilas y carotenoides.

Para cuantificar la clorofila a (Cl *a*), clorofila b (Cl *b*), carotenoides (Car.), clorofila total (CT) y la proporción clorofila *a*/ clorofila *b* (*a/b*); se utilizó el método descrito por Wellburn (1994), para lo cual, 0.3 g (para el caso de frijol), ó 0.1g (en el caso de alfalfa) de hoja se maceraron con acetona al 80% para extraer los pigmentos.

4.4.-Rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno.

El rendimiento cuántico para liberación de oxígeno se determinó en un oxímetro con cámara de disco de hoja (Hansatech Ltd. , King's Lynn, England), midiendo el oxígeno liberado por 15 discos de hoja de 8 mm de diámetro, para el caso del *Vigna radiata* y de *Medicago sativa*, y uno de 3.5 cm para el caso de *Phaseolus vulgaris* ante la exposición de diferentes densidades de flujo fotónico (90 a 900 $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) con una duración de 60 segundos . Los registros se efectuaron a temperatura ambiente y se realizaron después de haber adaptado los discos de hoja durante 3-5 minutos a una densidad de flujo fotónico de 630 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$., proporcionada por una fuente de luz roja emitida por una lámpara de 36 fotodiodos (Hansatech Ltd. , King's Lynn, England). En la cámara de disco de hoja se agregaron 200 μl de NaHCO_3 1M como fuente de CO_2 .

4.5.-Medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila a del FS II.

La cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de alfalfa y de frijol, se registró con un Analizador de la Eficiencia de la Planta (Handy PEA Hansatech Ltd., King's Lynn, England), después de haber adaptado las hojas a la oscuridad por un período de 10 minutos y de aplicar luz de una longitud de onda de 680 nm con una densidad de flujo fotónico de 3,000 $\mu\text{moles de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ mediante una fuente luminosa de 6 fotodiodos y un fotodetector integrado (Hansatech Ltd., King's Lynn, England). La fluorescencia se registró desde los 10 μs hasta los 5s. A partir de los datos de la cinética de fluorescencia se obtuvieron los parámetros: F_0 (Fluorescencia mínima y denota la cantidad de energía captada por los pigmentos antena cuando los centros de reacción permanecen abiertos), F_m (Fluorescencia máxima, indica la cantidad de centros

de reacción cerrados por la actividad fotoquímica), Fv (Fluorescencia variable, la cual está relacionada con la reducción del pool de quinonas), Fv/Fm (Eficiencia de la fotoquímica primaria), (Strasser, et. al. 2000). Los datos obtenidos para cada uno de estos parámetros fueron transferidos del Handy PEA a una PC donde se procesaron con el programa Handy PEA y Biolyzer, (Maldonado-Rodríguez, 2002). Con dichos programas se obtuvieron las cinéticas de la inducción de fluorescencia de la clorofila *a* y los modelos de hoja, con los cuales se representa el flujo de energía; así como los parámetros RC/CSo (Centros de reacción activos por sección transversal), TRo/CS (Captura de excitones por sección transversal), ETo/CS (Transporte de electrones por sección transversal), Dlo/CS (Disipación de energía en forma de calor) ABS/CSo (Tamaño del complejo antena) y P.I. (Índice de rendimiento).

4.6.-Análisis OJIP.

Para el análisis de los cuatro puntos de las cinéticas (OJIP) de la inducción polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a*, se consideraron los siguientes datos: la intensidad de la fluorescencia de los primeros 50 μ s, la cual es considerada como F_0 , donde todos los centros de reacción (RC) están abiertos; la fluorescencia máxima (F_m), donde los RC están cerrados; la emisión de fluorescencia a los 2 ms (F_{2ms} ó J) y a los 30 ms (F_{30ms} ó I).

Para monitorear de una forma más completa el comportamiento del FS II, se empleo una serie de proporciones ó rendimientos de flujo de energía que se basan en los cinco postulados de la teoría de flujo de energía en biomembranas propuesta por Strasser (1981). Las proporciones consideradas en este trabajo fueron:

- $\psi_0 = 1 - VJ$; donde $VJ = (F_{2ms} - F_0)/(F_m/F_0)$, ó ETo/TRo. Esta proporción indica la eficiencia con la que un excitón capturado puede mover un electrón más allá de QA^- dentro de la cadena transportadora de electrones.
- $\phi_{E_0} = [1 - (F_0/F_m)] \cdot (1 - VJ) = (ETo/RC) / (ABS/RC) = ETo/ABS$. Esta proporción indica el rendimiento cuántico del transporte de electrones.
- $\phi_{P_0} = [1 - (F_0/F_m)] = (TRo/RC) / (ABS/RC) = TRo/ABS$. Está proporción refleja el rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria, y es definido

como la proporción del flujo de energía total capturada por los centros de reacción del FS II y utilizada para la fotoquímica primaria.

- $[1-(Vk/VJ)]_{\text{Tratamiento}}/[1-(Vk/VJ)]_{\text{control}} =$ Fracción de Complejos emisores de oxígeno activos. Donde VK es la fluorescencia variable a los 300 μ s = $(F_{300\mu s}-F_{50\mu s})/(F_m-F_{50\mu s})$; VJ es la fluorescencia variable a los 2 ms = $(F_{2ms}-F_{50\mu s})/(F_m-F_{50\mu s})$
- Log PI_{ABS} o DF (Fuerzas Totales de Conducción): Representa la densidad de Centros de Reacción (Log RC/ABS), la eficiencia de las reacciones lumínicas (Log $\phi_{Po}/(1-\phi_{Po})$) y la eficiencia de las reacciones oscuras o fototermales (Log $\psi_o / (1-\psi_o)$).

El flujo de energía a través del FSII se puede representar de una forma específica (RC) ó por sección transversal (CS), en este caso se representó de esta última forma. Al considerar que los parámetros ABS, TRo, ETo, y Dlo representan el flujo de energía, éstos fueron utilizados para construir los modelos de hoja con los cuales se esquematizó el flujo de energía en el FS II.

4.7.-Medición de fluorescencia Modulada.

Para determinar qP (Actividad fotoquímica, la cual se relaciona con la disminución de la fluorescencia debido a la oxidación de QA⁻ por la transferencia de electrones a NADP⁺, y/o también es un indicativo del grado de centros de reacción que están abiertos) y qNP (Actividad no fotoquímica, que refleja la disminución de la fluorescencia por la disipación de energía en forma de calor y por la formación del Δ pH a través de la membrana tilacoidal), (Bolhär, *et. al.* 1993. D'Haese,*et. al.* 2004), se registró la Fluorescencia Modulada con un fluorómetro FMS (Hansatech Ltd., King's Lynn, England), siguiendo el protocolo descrito por Genty en 1989: Fo se determinó al aplicar un pulso débil de luz y de inmediato se aplicó por 1 s un pulso saturante de luz de 8000 μ mol de fotones. $m^{-2}.s^{-1}$ para determinar la fluorescencia máxima (Fm) en las hojas adaptadas a la oscuridad. Después, la hoja fue iluminada con luz actínica de 500 μ mol de fotones. $m^{-2}.s^{-1}$. Una vez que la hoja alcanzó el estado constante de la fotosíntesis, se registró la fluorescencia de estado constante (Fs) y al aplicar por 0.8 s un pulso saturante de luz de 8000 μ mol de fotones. $m^{-2}.s^{-1}$ se determinó la fluorescencia máxima en el estado adaptado a

la luz (F_m'). Al obtener este parámetro la luz actínica se apagó, y la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz (F_o') se determinó por la iluminación de luz roja por un período de 3 segundos. Estos últimos datos se utilizaron para calcular q_P y q_{NP} ; las ecuaciones para obtenerlos fueron las siguientes: $q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ y $q_{NP} = 1 - (F_m' - F_o')/(F_m - F_o)$.

4.8.-Aislamiento de tilacoides.

20 gramos de hojas de frijol ó de alfalfa se homogenizaron en un medio de homogenización que estaba a punto de nieve y que contenía Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.8, NaCl 20 mM, $MgCl_2$ 5 mM. El homogenizado se filtró a través de 8 capas de gasa y una de algodón intermedia y el filtrado se centrifugó a 5000 rpm durante 60 segundos a 2 °C. Las pastillas se resuspendieron en un volumen pequeño de medio de homogenización y en seguida se les agregó un medio que contenía Tricina-KOH 10 mM, NaCl 150 mM pH 8 y una temperatura de 4 °C; luego se juntaron los resuspendidos en un solo tubo de centrifuga y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos. La pastilla resultante se resuspendió con medio de homogenización y se mantuvo en hielo hasta y durante su uso.

4.8.1-Medición de las reacciones parciales del FSI .

La actividad del transporte de electrones de la cadena completa (FSII-FSI) y del FSI se midieron polarográficamente en un oxímetro Gilson Mod. IC., con electrodo tipo Clark y con una fuente de luz acoplada (proyector con lámpara de halógeno de 100 W, Hansatech). Los ensayos se hicieron a una intensidad lumínica $1100 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; a 30 °C y en 1 ml de solución que contenía buffer de reacción (Sorbitol 0.2 M, $MgCl_2$ 10 mM, Hepes ac. Libre 100 mM, azida de sodio 5 mM pH 7.6), los reactivos Metil viologeno 0.1 M, (Para las reacciones de la cadena completa) DCMU 50 μM , Ácido ascórbico 1mM, DCPIP 0.1 M (Para las reacciones parciales del FSI) y 50 μg de clorofila. (Hall, *et. al.* 1993. Hipkins, *et. al.* 1992).

4.9.-Cuantificación de osmolitos.

Para la determinación de los siguientes osmolitos se utilizó 0.1 g (para el caso de alfalfa) ó 0.5 g (para el caso de las dos variedades de frijol) de tejido fresco de

hojas, tallos y raíces. Para cada soluto se hicieron tres repeticiones en cada tejido, y todas las extracciones se hicieron a temperatura ambiente.

4.9.1-Cuantificación de prolina.

La concentración de prolina en hojas, tallos y raíces se determinó por el método descrito por Bates, *et. al* (1973).

4.9.2.-Cuantificación de aminoácidos libres totales.

La concentración de estos solutos se determinó por el método de ninhidrina. Para la extracción de los aminoácidos, el tejido fresco se maceró en 5 ml de etanol al 80 %. El macerado se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 2 ml para mezclarla con 3 ml de cloroformo y uno de agua destilada; esta mezcla se agitó en vortex, y de la fase superior se tomó una alícuota de 0.2 ml para hacerla reaccionar con ninhidrina. Esta mezcla se mantuvo por 15 minutos en baño María. Al cabo de este tiempo se dejaron enfriar y se le agregó 2 ml de Etilen glicol monometil éter (Metilcelosolve); después de agitar los tubos, se leyó su absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro Shimadzu de luz visible y haz dividido. La concentración de los aminoácidos se determinó con una curva patrón de glicina en rango de 50 µg/ml.

4.9.3.-Cuantificación de proteína soluble.

El tejido fresco de hojas, tallos y raíces se maceró con 4 ml de agua destilada y el macerado se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó y de él se tomó una alícuota de 0.2 ml para hacerla reaccionar con 5 ml del reactivo Bradford. La concentración se determinó con una curva patrón de albúmina en el rango de 50 µg/ml.

4.9.4.-Cuantificación de azúcares solubles totales.

La concentración de azúcares solubles se determinó por el método de antrona, para lo cual el tejido fresco se maceró con 6 ml de etanol al 95%; el macerado resultante se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y la pastilla se lavó con 4 ml de etanol al 70 % al centrifugarla a la misma velocidad por 10 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se juntó con el anterior y de esta mezcla se tomó una alícuota de 0.2 ml y se hizo reaccionar con 3ml de antrona; esta mezcla se puso en baño María durante 30

minutos. Posteriormente se leyó su absorbancia a 625 nm. La concentración se determinó con una curva patrón de glucosa.

4.10.-Cuantificación de Mn y Cr en tejidos de plantas.

Muestras de 0.5 g (Peso fresco) de raíz, tallo y hoja se secaron durante 48 horas para obtener su peso seco y luego se digirieron con 5 ml de HNO₃ concentrado durante una hora a 250 °C. La concentración de Cr y Mn se determinó con un espectrofotómetro de absorción atómica PYE UNICAM SP 192.

Para determinar si existían diferencias significativas entre todos los datos del control y de los tratamientos, se utilizó el estadístico T- student para muestras independientes, aplicando niveles de significancia de 0.05, 0.025 y 0.0025.

5.-Resultados.

5.1-Síntomas visibles.

En las dos especies de frijol (*P. vulgaris* y *V. radiata*) a partir del tercero y cuarto día de exposición a las dos concentraciones de Mn (1 y 2 mM), se observó la presencia de puntos cafés en las hojas. En el caso de *P. vulgaris*, éstos se observaron en los trifolios. En las plantas de alfalfa (*M. sativa*), los síntomas visibles consistieron en clorosis, necrosis y reducción del tamaño de las hojas, los cuales fueron más severos en el tercer trifolio y en las plantas con 2 mM de Mn. A pesar de estar bajo las mismas concentraciones de Mn, en esta especie no se observaron motas cafés como fue el caso de las dos especies de frijol. Pese a estas diferencias en los síntomas visibles, en las dos especies de frijol y en alfalfa los efectos se fueron acentuando conforme aumentaba el tiempo de exposición al

metal; así mismo, la magnitud de los síntomas también dependió de la concentración del Mn.

Por otro lado, el principal síntoma visible provocado por el Cr en las plantas de alfalfa fue la pérdida de turgencia, la cual se reflejó en la flacidez de las mismas. Para el caso de *P. vulgaris* y *V. radiata*, los efectos consistieron en la reducción del tamaño de las hojas y necrosis, tanto del primero como del segundo trifolio. Al igual que el Mn, los efectos provocados por el Cr dependieron del tiempo de exposición y de la concentración del mismo. Esto se pudo apreciar mejor en alfalfa, ya que los efectos se empezaron a notar desde el primer día de exposición a la concentración de 0.3 mM , y en el segundo día, estas plantas murieron.

5.2.-Pigmentos fotosintéticos.

Durante el tratamiento con Mn 1 y 2 mM la Cl *a*, Cl *b*, carotenoides y clorofila total disminuyeron en *P. vulgaris*, (Figura1), lo cual fue más evidente en plantas con 2 mM y cuando el tiempo de exposición fue mayor. En esta misma especie a los dos días de tratamiento con 1 mM, se registró un aumento en la relación *a/b*, sin embargo, no se mantuvo durante todo el tratamiento. La disminución de Cl *a*, Cl *b* y clorofila total también se registró en *V. radiata*, mientras que la concentración de carotenoides y la relación *a/b* se mantuvieron sin cambios, (Figura 1). A diferencia de las dos especies de frijol tratadas con Mn, en *M. sativa*, la disminución de Cl *a*, Cl *b* y clorofila total se observó a partir del cuarto día de tratamiento, y no se registró cambio alguno en la concentración de carotenoides. Cabe mencionar, que al igual que en *P. vulgaris*, a los dos días de tratamiento con 2 mM, también se registró un aumento en la relación *a/b*, (Figura 1).

Los cambios provocados por el Cr en la concentración de pigmentos se muestran en la figura 2. En el caso de *M. sativa*, durante los dos días de tratamiento, la Cl *a*, clorofila total y la relación *a/b* disminuyeron, lo cual no se observó en Cl *b* y carotenoides. En contraparte, en *P. vulgaris*, en el día dos y cinco de tratamiento, la Cl *a*, Cl *b*, carotenoides, clorofila total se incrementaron. Un efecto similar al anterior fue registrado en *V. radiata* a los dos días de tratamiento con 0.30 mM y

sin cambios con 0.15 mM. En el tercero (en *V. radiata*) y en el séptimo día (en *P. vulgaris*) de tratamiento todos estos parámetros disminuyeron.

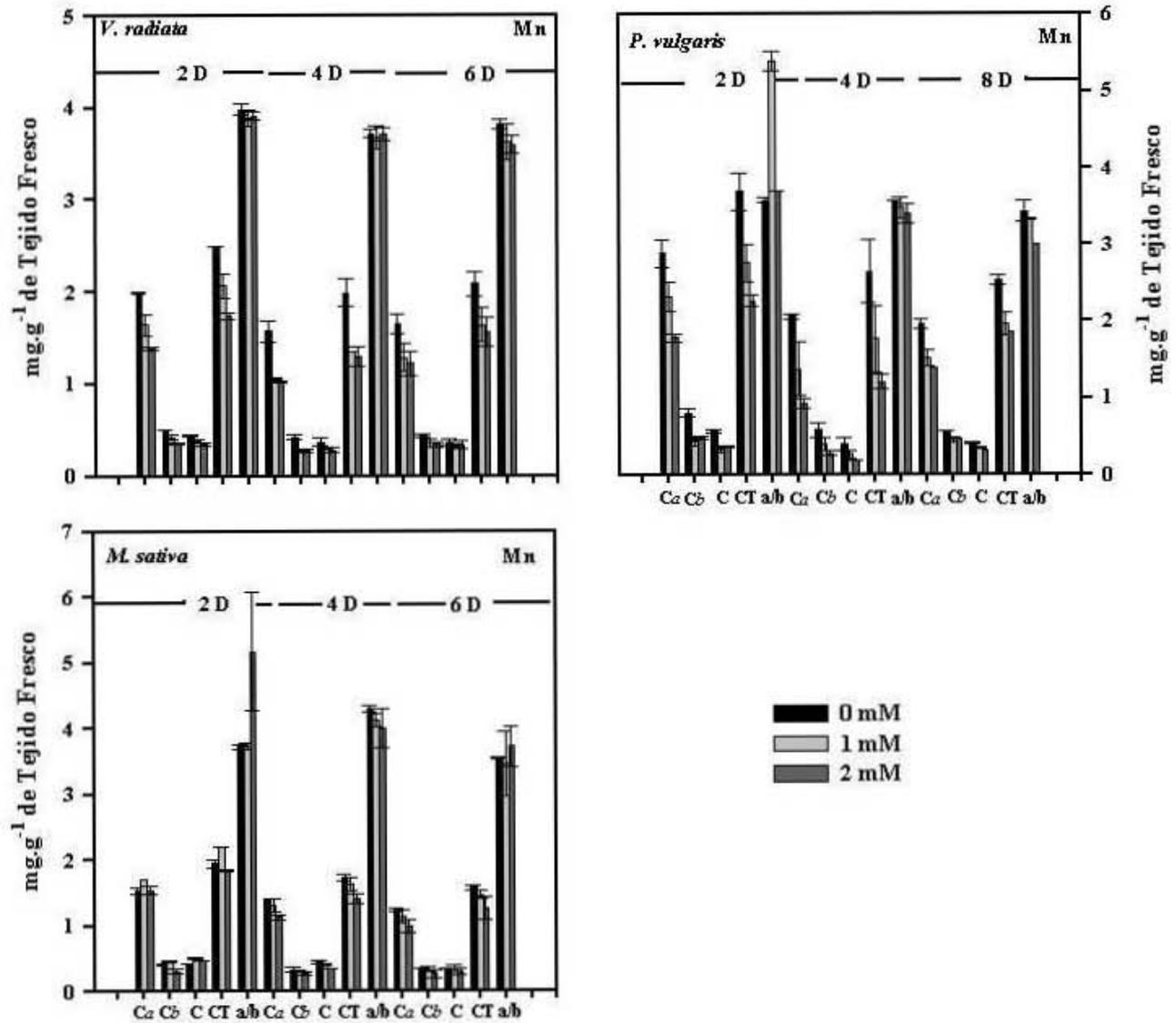


Figura 1: Efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Las barras representan la media de dos muestras de hojas diferentes, y las líneas sobre ellas indican el error estándar. Ca (Clorofila a), Cb (Clorofila b), C (Carotenoides), CT (Clorofila Total), a/b (clorofila a/clorofila b).

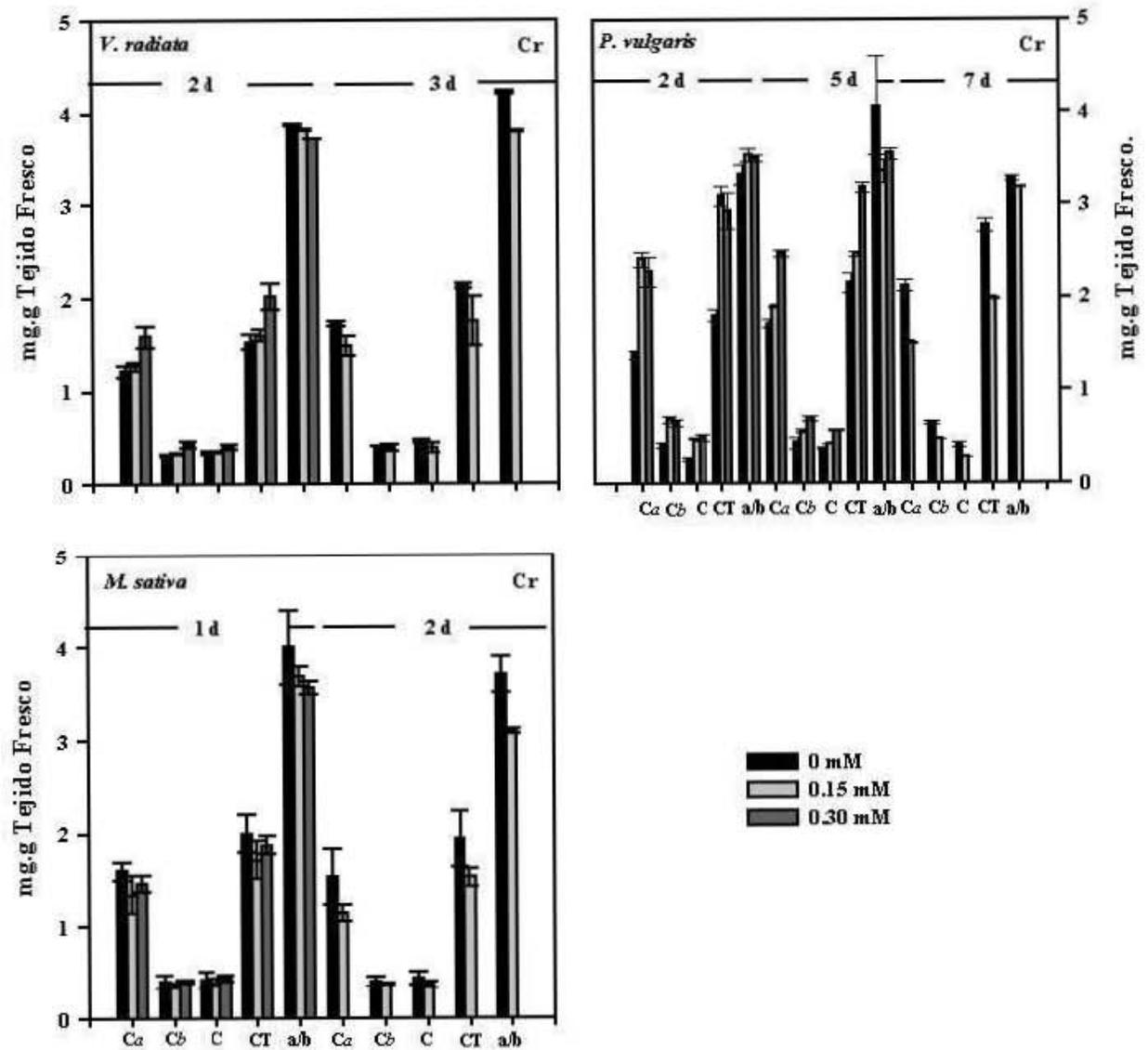


Figura 2: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Las barras representan la media de dos muestras de hojas diferentes, y las líneas sobre ellas indican el error estándar. Ca (Clorofila a), Cb (Clorofila b), C (Carotenoides), CT (Clorofila Total), a/b (clorofila a / clorofila b).

5.3.-Efectos del Cr y Mn en la Fotosíntesis.

5.3.1.Rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno.

En las dos especies de frijol y en alfalfa, tratadas con Mn 1 y 2 mM, no se observaron cambios significativos en la liberación de oxígeno, sin embargo, a los 8 días de tratamiento con 2 mM de Mn se incrementó la liberación de oxígeno en *P. vulgaris* en el rango de exposición a luz de 360 hasta 900 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de densidad lumínica, (Figura 3 y 4).

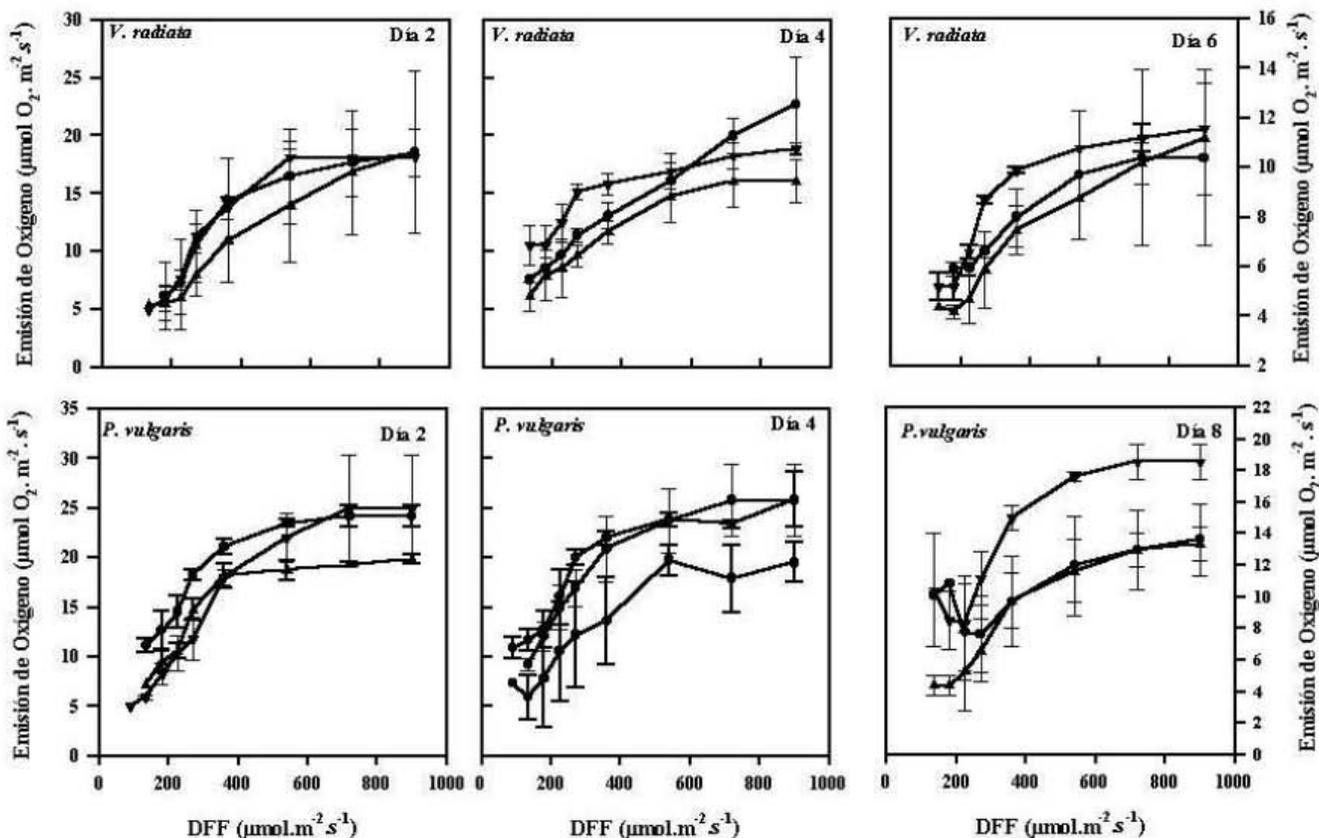


Figura 3: Efectos del Mn 1 y 2 mM en el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno de hojas de *V. radiata* y *P. vulgaris*. (●) Control (▲) 1 mM (▼) 2 mM. Cada una de las líneas representa la media de 4 repeticiones con muestras diferentes, y la barra sobre cada una de ellas indica el error estadístico.

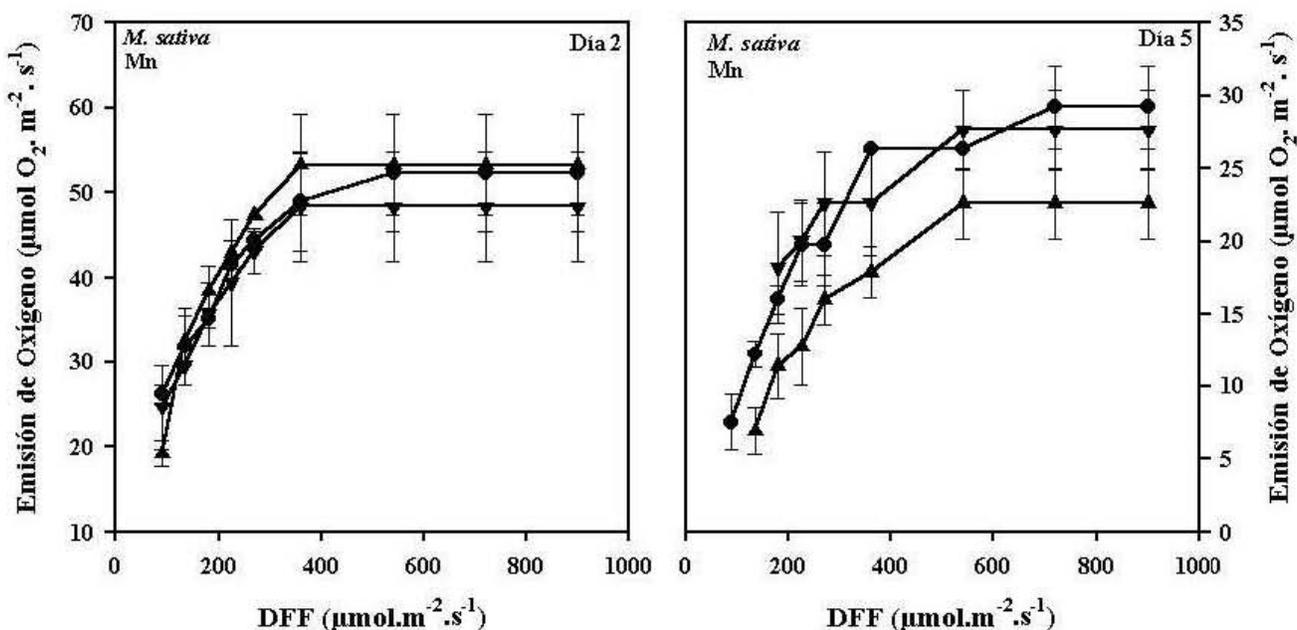


Figura 4: Efectos del Mn 1 y 2 mM en el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno de hojas de *M. sativa*. (●) Control (▲) 1 mM (▼) 2 mM. Cada una de las líneas representa la media de 4 repeticiones con muestras diferentes, y la barra sobre cada una de ellas indica el error estadístico.

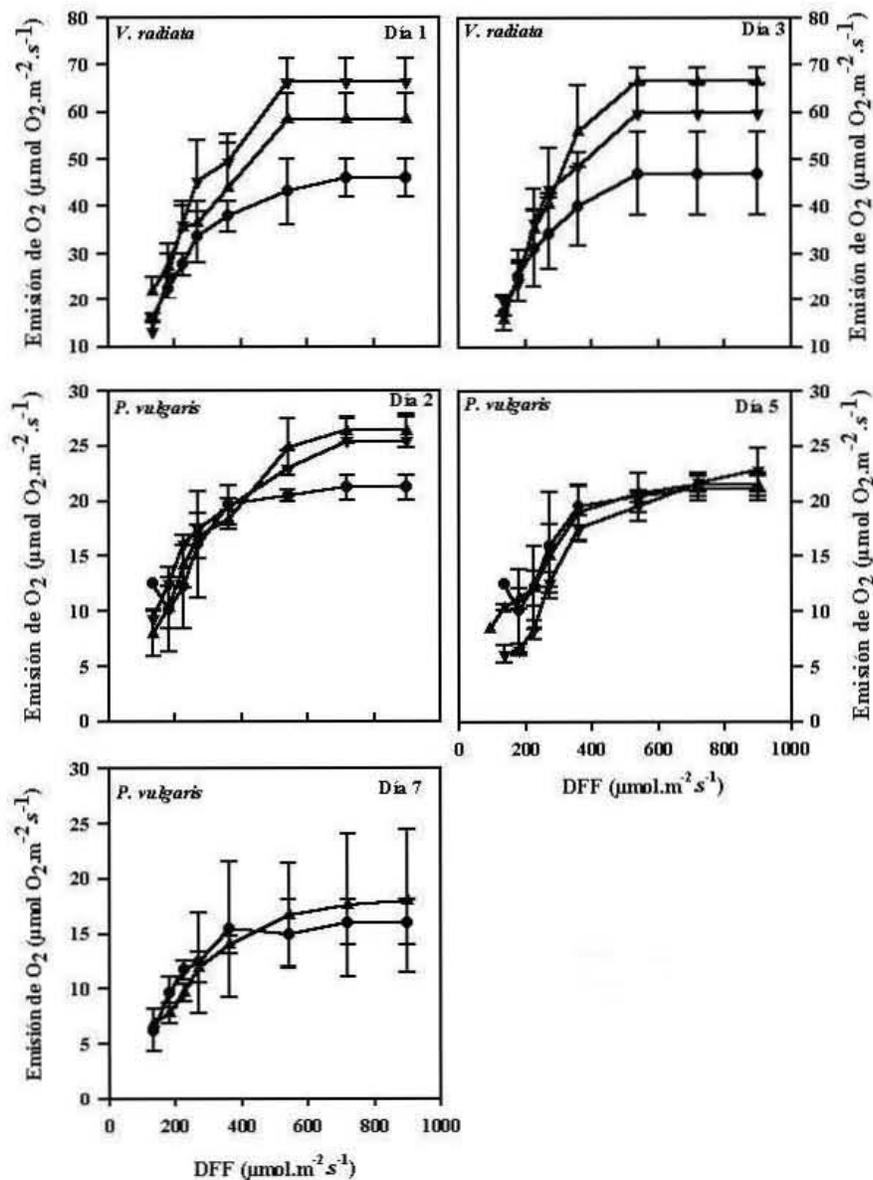


Figura 5.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno de hojas de *P. vulgaris* y *V. radiata*. (●) Control (▲) 1 mM (▼) 2 mM. Cada una de las líneas representa la media de 4 repeticiones con muestras diferentes, y la barra sobre cada una de ellas indica el error estadístico.

El tratamiento de 1 día con Cr produjo el incremento de la liberación de oxígeno en *V. radiata* expuesta a 560 hasta 900 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de densidad lumínica, dicho efecto se mantuvo solo en las plantas con 0.15 mM de Cr, ya que con 0.30 mM no hubo diferencias significativas con respecto al control. Un comportamiento similar fue observado en *P. vulgaris* (Figura 5). Cabe mencionar que este parámetro no se determinó en *M. sativa*, ya que el tamaño de sus hojas dificultaron su manipulación para este fin. Por otro lado, estos resultados demuestran que ante una exposición relativamente corta al Cr, la liberación de oxígeno en estas dos

especies de frijol se incrementa por el efecto de este metal, y sin embargo, conforme se incrementa el tiempo de exposición al Cr el CEO puede ser afectado por este metal.

5.3.2.-Emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FS II.

5.3.2.1.-Efectos del Mn.

El tratamiento de *M. sativa* con Mn 1 y 2 mM durante 4 días de tratamiento no produjo alteraciones en los parámetros Fo, Fm, Fv y Fv/Fm, (Tabla 1), sin embargo, en el día 6 la fluorescencia máxima y variable disminuyen, siendo mayor este efecto en las plantas tratadas con 2 mM. La disminución de estos parámetros se mantuvo hasta el noveno día, y posteriormente la fluorescencia mínima (Fo) de los dos tratamientos se incrementó con respecto al control, y además, la eficiencia de la fotoquímica primaria (Fv/Fm) disminuyó en el tratamiento con 2 mM.

En contraste, en *V. radiata*, desde los dos primeros días de tratamiento con Mn 2 mM, Fo, Fm y Fv disminuyen con respecto al control y al tratamiento con 1 mM, (Tabla 2). Dicha tendencia a disminuir se mantuvo hasta el día nueve, en donde a diferencia de alfalfa, Fo disminuyó en los dos tratamientos, y el parámetro Fv/Fm no fue afectado en ambos tratamientos.

A diferencia de *M. sativa* y *V. radiata*, en *P. vulgaris*, Fo, Fm y Fv se incrementaron significativamente en el día dos; sin embargo, estos tres parámetros disminuyeron gradualmente conforme avanzó el tratamiento con Mn. Este efecto fue más severo en las plantas con 2 mM, en las cuales Fv/Fm disminuyó en el octavo día, (Tabla 2).

Los datos anteriores indican que los efectos del Mn en la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII dependen de la especie, de la concentración y del tiempo de exposición al Mn, ya que solo en alfalfa en el día nueve se registró el aumento de la fluorescencia mínima (Fo), lo cual pudo deberse a una oxidación deficiente de QA⁻, afectando de esta forma a procesos fototermales, como la reducción de QB y PQH, lo cual se reflejó en la disminución de los parámetros Fm y Fv, que están relacionados con el cierre de centros de reacción por la reducción de QA, y con la reducción del pool de quinonas, respectivamente. Además, dejan en claro que ante una exposición de Mn 2mM si se afectan los procesos fotoquímicos, tal y

como se refleja en el decremento de Fv/Fm. Por otra parte, los parámetros de fluorescencia de las dos especies de frijol indican que estas plantas tienen mecanismos adaptativos ante el estrés por Mn, ya que la disminución de Fo está asociada a la reducción de la captación de energía lumínica para evitar efectos inhibitorios a nivel fotoquímico y fototermal, probablemente por la baja demanda de NADPH por parte del Ciclo de Calvin, ya que en otros estudios se ha demostrado que el Mn afecta la actividad carboxilasa de la Ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxidasa (Rubisco), (Nable, *et. al*, 1988. Kepova; *et. al*. 2004), y además, con estos resultados se demuestra que *V. radiata* tiene mayor capacidad a adaptarse, ya que a lo largo de todo el tratamiento el parámetro Fv/Fm no es afectado.

Días	[Mn] mM	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Q _p	Q _{NP}
<i>M. sativa</i>							
2	0	613.8±61.1	3004.8±256.4	2391±288.8	0.79±0.04	0.88±0.06	0.165±0.06
	1	578.8±154.2	3135.2±280.8	2586.3±164.7	0.82±0.03	0.88±0.03	0.137±0.03
	2	588.3±102.4	3095.3±330.4	2507±266.3	0.81±0.02	0.88±0.04	0.159±0.05
4	0	592.2±57.3	3075.5±72.2	2483.3±72.2	0.80±0.02	0.87±0.05	0.2±0.09
	1	530±34.1	2952.2±190.4	2422.2±165	0.82±0.007	0.9±0.01	0.11±0.01a
	2	550±70.9	2902.8±177.8	2352.3±194.2	0.81±0.03	0.92±0.007a	0.12±0.03
6	0	690.5±56.1	3424.7±179.4	2734.2±162.1	0.79±0.01	0.91±0.03	0.11±0.03
	1	646.5±10.7	2965.7±232.9b	2319.2±215.1c	0.78±0.03	0.90±0.01	0.11±0.02
	2	609.5±82.3	2843.5±317.2b	2234±259.2c	0.78±0.02	0.91±0.02	0.11±0.01
9	0	598.2±21.3	3112.2±99.3	2514±87.1	0.81±0.006	0.92±0.01	0.12±0.03
	1	730.3±84.7b	2686.3±170.4c	1956±214.98b	0.72±0.04	0.88±0.04a	0.13±0.03
	2	752±59.72b	2406.6±290.7b	1654.6±247.6c	0.68±0.03c	0.76±0.1b	0.17±0.06
Días	[Cr] mM	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Q _p	Q _{NP}
<i>M. sativa</i>							
1	0	624.7±63.1	3076.5±1803	2451.8±12.73	0.79±0.01	0.83±0.01	0.18±0.05
	0.15	715.8±100.5a	3064.1±209.3	2348.3±214.3	0.77±0.03	0.86±0.09	0.12±0.02c
	0.30	913.2±220.4b	2839.8±306.4	1926.6±412.9b	0.67±0.09	0.89±0.04	0.12±0.01c
2	0	642.3±70.61	2991.7±131.6	2349.4±121.5	0.79±0.02	0.91±0.02	0.14±0.04
	0.15	1518.4±231.6c	2395.7±249.3c	982.25±352.7c	0.37±0.07c	0.78±0.09c	0.31±0.1c

Tabla 1: Parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de plantas de alfalfa (*M. sativa*) tratadas con Mn 1 y 2 mM y Cr 0.15 y 0.30 mM. Los datos presentados son la media y el error estándar de 10 repeticiones con hojas diferentes. a) $\alpha=0.025$. b) $\alpha=0.0025$, y c) $\alpha=0.0005$, de nivel de significancia.

Por otro lado, en la tabla 1 también se puede apreciar que en *M. sativa* solo en el cuarto día de tratamiento con Mn 2 mM se registró el aumento de Q_P y la disminución de Q_{NP} , y en los días dos, seis y nueve (solo en Q_{NP}) no se registraron cambios significativos en estos dos parámetros, mientras que en el día nueve Q_P disminuyó, y Q_{NP} del tratamiento con 2 mM se incrementó. Los resultados de Q_P indican que la oxidación de QA^- debido al transporte de electrones para la formación de NADPH, es deficiente, además corroboran lo observado en el aumento de F_o y en la disminución de F_m y F_v en este mismo día.

Uno de los mecanismos adaptativos que han desarrollado la mayoría de las plantas es disipar el exceso de energía lumínica en forma de calor para evitar los daños oxidativos. Relacionado a esto, la formación y/o aumento de Q_{NP} depende de la formación de un ΔpH a través de la membrana tilacoidal para que de esta forma entre a los tilacoides la enzima violaxantina depoxidasa (VDE), que cataliza la formación de anteraxantina y zeaxantina, (D'Haese, *et. al.* 2004). Los resultados obtenidos a partir de *M. sativa*, a pesar de que en la mayoría de ellos no se encontraron diferencias significativas, muestran una clara tendencia a disminuir (solo en el noveno día con 2 mM se incrementa), lo cual hace suponer que existe un ΔpH pequeño que evita que la enzima VDE entre a los tilacoides y se lleve a cabo la depoxidación de las violaxantinas y por tanto no se incrementa Q_{NP} , por lo que probablemente estas plantas sean propensas a daños oxidativos.

En *V. radiata*, aunque en los días 2 y 9 no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, (Tabla 2), se observa que los valores de Q_P de 1 y 2 mM se mantienen por encima de los del control, demostrando que la oxidación de QA^- es más eficiente que la de *M. sativa*, por lo que en esta especie de frijol no hay efectos inhibitorios en las fases fotoquímica y fototermal. Al igual que en alfalfa, Q_{NP} muestra una tendencia a disminuir, lo cual se puede deber a que esta planta disminuye la captación de energía tal y como se observó en el decremento de F_o , por lo que esta disminución de Q_{NP} pudo deberse a un mecanismo regulatorio para evitar acumular NADPH y ATP, y además, no se disipa energía en forma de calor, ya que la energía lumínica que es captada es

ocupada en su mayoría para la actividades fotoquímicas, lo cual coincide con lo observado en Fv/Fm.

Días	[Mn] mM	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Q _P	Q _{NP}
<i>V. radiata</i>							
2	0	493.9±24.23	2897.9±77.87	2404±56.61	0.83±0.005	0.55±0.03	0.34±0.04
	1	490.2±13.13	2894.2±93.18	2406±85.56	0.83±0.003	0.67±0.11	0.22±0.03c
	2	466.1±22.24a	2750±132.82a	2284±121.7a	0.83±0.008	0.64±0.11	0.20±0.03c
4	0	487.1±16.82	2843.8±85.62	2356.7±74.28	0.83±0.004	0.68±0.08	0.25±0.06
	1	463.1±39.20	2558.2±195.1b	2095±189.5b	0.82±0.002	0.79±0.08a	0.19±0.04
	2	457.1±27.74c	2566.1±170.9b	2111±151.2c	0.82±0.008	0.83±0.03c	0.13±0.06b
6	0	483±18.11	2855.8±130	2373±113.9	0.83±0.003	0.76±0.06	0.23±0.03
	1	471.8±21.36	2459±387.04a	1987±389.7a	0.80±0.037	0.88±0.02c	0.13±0.02b
	2	439.8±26.34c	2528.7±237.9b	2088.9±136b	0.82±0.007	0.83±0.03c	0.18±0.001b
9	0	498±23.64	2861.1±149.9	2363±136.2	0.83±0.008	0.83±0.07	0.19±0.047
	1	398±49.63c	2140.8±346.6c	1743±299.9c	0.81±0.011	0.88±0.03	0.17±0.017
	2	423±28.27c	2318.6±241.1c	1895±217.9c	0.82±0.121	0.87±0.07	0.19±0.021
<i>P. vulgaris</i>							
2	0	506.2±16.53	2898.8±32.07	2393±17.45	0.83±0.004	0.76±0.06	0.19±0.06
	1	656.3±42.50c	3744.5±189.8c	3088±148.69c	0.83±0.004	0.71±0.06	0.17±0.02
	2	638.7±30.44c	3722±142.15c	3083±113.89c	0.83±0.004	0.79±0.06	0.18±0.03
4	0	686.7±6.44	3964.7±66.54	3278±64.76	0.83±0.004	0.82±0.06	0.22±0.05
	1	700.5±20.01	3864.8±67.03b	3164±53.80b	0.82±0.004	0.80±0.09	0.24±0.05
	2	643±16.97c	3787.5±29.61b	3144±21.57b	0.83±0.005	0.86±0.04	0.16±0.03a
8	0	718.5±38.17	3893.8±170.76	3176±136.33	0.82±0.005	0.66±0.08	0.25±0.06
	1	638.8±42.14b	3372±244.2a	2733±220.99a	0.80±0.02	0.65±0.09	0.26±0.05
	2	510.3±29.39c	2168.7±497.7c	1658±469.45c	0.75±0.057	0.6±0.064	0.20±0.03

Tabla 2: Parámetros de fluorescencia de la clorofila a del FSII de plantas de frijol mungo (*V. radiata*) y frijol común (*P. vulgaris*) tratadas con Mn 1 y 2 mM . Los datos presentados son la media y el error estándar de 10 repeticiones con hojas diferentes. a) $\alpha=0.025$. b) $\alpha=0.0025$, y c) $\alpha=0.0005$, de nivel de significancia.

Por su parte, en *P. vulgaris* durante todo el tratamiento con Mn 1 y 2 mM Q_P y Q_{NP} no disminuyen, salvo en el cuarto día con 2 mM, en el cual el segundo parámetro disminuyó, por lo que esta variedad de frijol tiene solo mecanismos adaptativos a bajas concentraciones de Mn (1mM).

5.3.2.2.-Efectos del Cr.

En la tabla 1 se muestran los parámetros de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de *M. sativa* tratada con Cr 0.15 y 0.30 mM. En ella se puede observar que en el primer día de tratamiento la fluorescencia mínima (F_o) de los dos tratamientos se incrementó, sin embargo, los parámetros F_m y F_v de las plantas con 0.15 mM no disminuyeron, caso contrario al tratamiento con 0.30 mM, en el cual F_v si disminuye. Ya en el segundo día, en donde las plantas con 0.30 mM mueren, el incremento de F_o fue acompañado de la disminución de la fluorescencia máxima, fluorescencia variable y de la eficiencia de la fotoquímica primaria. Este efecto también fue observado en esta misma especie tratada con Mn, por lo que el incremento de F_o provocado por el Cr se debe a una oxidación deficiente de QA^- , que es reflejado en la disminución de Q_p ; además, se demostró que el Cr si afecta a los procesos fotoquímicos del FSII de las plantas de *M. sativa*, así mismo, estas plantas tienden a disipar más energía en forma de calor, lo cual se observó en el incremento gradual de Q_{NP} . Este comportamiento indica que el transporte de electrones fue disminuido por este metal.

A diferencia de *M. sativa*, en *V. radiata* durante el primer día de exposición, en los dos tratamientos se registró un aumento de los parámetros F_m y F_v ; dicho efecto se mantuvo en las plantas con 0.15 mM durante todo el tratamiento, pese que en el día 2 y 3 no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3). En el caso del tratamiento con 0.30 mM, en el día dos, los valores de los parámetros F_o , F_m y F_v fueron similares a los del control, sin embargo en el día tres éstos volvieron a incrementarse.

Estos datos sugieren que el Cr incrementa el transporte de electrones en *V. radiata*, y pese a lo observado en alfalfa, este metal no afectó a las reacciones fotoquímicas y fototermales de esta especie; inclusive la eficiencia en la oxidación de QA^- se incrementó desde el primer día de tratamiento con 0.30 mM, y desde el segundo día con 0.15 mM; aunado a esto, el parámetro Q_{NP} tendió a disminuir, sugiriendo que esta planta no incrementa la disipación de energía en forma de calor, porque la energía lumínica que es captada es aprovechada en su mayoría en las reacciones fotoquímicas, tal y como se observó en el parámetro F_v/F_m .

Un efecto similar al observado en *V. radiata*, solo fue registrado en el día dos en *P. vulgaris*, (Tabla 3), ya que a partir del día cinco, los parámetros Fm y Fv disminuyeron, lo cual es precedido del incremento de Fo, indicando que en esta especie de frijol el Cr si puede afectar los eventos fotoquímicos y fototermales ante una exposición prolongada. Sin embargo, Q_P se incrementó durante todo el tratamiento, mientras que Q_{NP} disminuyó.

Días	[Cr] mM	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Q _P	Q _{NP}
<i>V. radiata</i>							
1	0	497.3±44.98	2886.2±106.09	2369±88.17	0.83±0.013	0.77±0.04	0.22±0.008
	0.15	465.9±18.31	2975.2±91.45a	2509±80b	0.84±0.004	0.69±0.09a	0.15±0.02c
	0.30	505.5±32.53	3011.1±100.6a	2506±81.38b	0.83±0.0008	0.84±0.04b	0.18±0.03c
2	0	510.7±22.43	3006±89.81	2495±82.62	0.83±0.007	0.79±0.06	0.17±0.02
	0.15	491.1±25.06	3074.8±100.7	2584±83.7a	0.84±0.005	0.74±0.04	0.16±0.01
	0.30	512.9±24.47	3008.7±101.7	2496±112.9	0.83±0.012	0.85±0.03b	0.15±0.01
3	0	478.8±25.80	2918.7±132.2	2440±114.2	0.84±0.006	0.73±0.04	0.24±0.02
	0.15	489.3±36.57	2977±168.84	2488±145.4	0.84±0.008	0.83±0.03c	0.16±0.01c
	0.30	519±44.61	2992.1±101.6	2473±92.41	0.83±0.014	0.76±0.05a	0.19±0.03b
<i>P. vulgaris</i>							
2	0	724.5±51.5	3392.5±141.5	2668±90	0.79±0.007	0.68±0.11	0.27±0.04
	0.15	645.7±9.44	3552.7±59.19a	2907±59.3c	0.82±0.004	0.78±0.05	0.23±0.02
	0.30	717±18.76	3817±109.97c	3100±106.4c	0.81±0.006	0.86±0.04b	0.24±0.03
5	0	663.7±40.2	3669.8±179.2	3006±160.1	0.82±0.009	0.57±0.08	0.28±0.03
	0.15	639±13.36	3438.8±108.9a	2799±114.7a	0.81±0.008	0.75±0.09b	0.27±0.08
	0.30	726.4±37.3a	3539.3±68.74a	2789±88.2a	0.79±0.013	0.76±0.04c	0.11±0.02c
7	0	684.2±21.6	3730.8±199.2	3047±182.7	0.82±0.007	0.74±0.08	0.28±0.05
	0.15	721.3±55.3	3680.5±93.6	2959±58.87	0.80±0.011	0.81±0.09	0.21±0.05a
	0.30	785±27.85c	3530.8±297.4a	2746±276	0.78±0.013	-----	-----

Tabla 3: Parámetros de fluorescencia de la clorofila a del FSII de plantas de frijol mungo (*V. radiata*) y frijol común (*P. vulgaris*) tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Los datos presentados son la media y el error estadístico de 10 repeticiones con hojas diferentes. a) $\alpha=0.025$, b) $\alpha=0.0025$, y c) $\alpha=0.0005$, de nivel de significancia. (-----) no determinados.

5.3.3.-Análisis J.I.P.

5.3.3.1-Efectos del Mn.

Las cinéticas de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de plantas de *P. vulgaris*, *V. radiata* y *M. sativa*, tratadas con Mn 1 y 2 mM, indican que ambas plantas modificaron sus procesos fotoquímicos y fototermales. Lo anterior resultó en cambios sustanciales de la forma característica de la cinética de emisión de la fluorescencia graficada en escala logarítmica de tiempo, (Figuras 6, 7 y 8). Estos cambios fueron dependientes de la concentración y del tiempo de exposición a este metal, así como de la especie, ya que estas modificaciones fueron más evidentes en *M. sativa*, en la cual, desde los dos primeros días de tratamiento se registró un aumento del punto J, y se mantuvo durante la mayor parte del tratamiento, con la excepción del sexto día, en donde el punto I empezó a disminuir con respecto al control, (Figura 6). Un aumento en el punto J es un indicativo de que existe una acumulación de QA⁻, en donde puede o no existir flujo de electrones más allá de este aceptor reducido. En este caso, en los primeros cuatro días, a pesar de este efecto, si se llevó a cabo la reducción de QB (punto I) y de PQH (punto P). Sin embargo, a partir del sexto y hasta el noveno día de exposición al Mn, la reducción de QB y PQH disminuyó, lo cual se reflejó en el decremento de los puntos I-P. Estos resultados reafirman que ante un tratamiento de 6-9 días con Mn, los eventos fototermales (reducción de QB y PQ) son afectados por este metal; así mismo, indican que el aparato fotosintético de las plantas de *M. sativa* pierden gradualmente la capacidad de transportar electrones más allá de QA⁻, y además corroboran lo observado en los parámetros Fo, Fm, Fv, Q_P y Q_{NP}.

El incremento del punto J, en *V. radiata* solo fue registrado en el día 2, (Figura 7), ya que conforme aumentó el tiempo de exposición al Mn, este punto fue disminuyendo, lo mismo que los puntos I-P, pero a diferencia de *M. sativa*, esta disminución fue proporcional al decremento de J, y no tienden a desaparecer, con lo cual se descarta la existencia de un efecto inhibitorio en la fase fototermal. Lo anterior demuestra que esta especie de frijol tiene mecanismos regulatorios a nivel fotoquímico y fototermal para hacer frente al estrés por Mn, y a la vez, para

adaptar su aparato fotosintético a la demanda de NADPH por parte del Ciclo de Calvin.

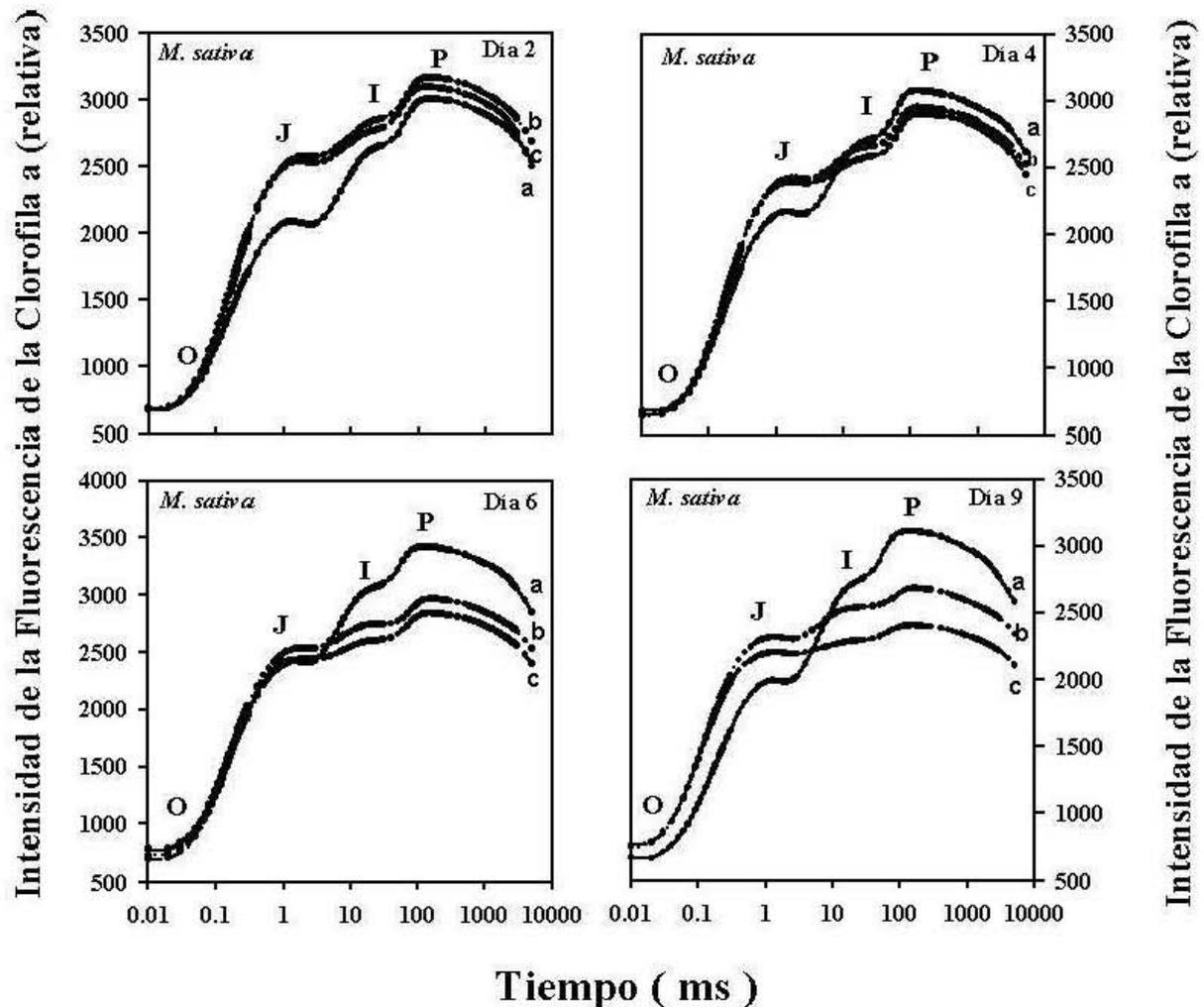


Figura 6.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de alfalfa (*M. sativa*) tratadas con Mn 1 y 2 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. (a) 0 mM; (b) 1mM; (c) 2 mM.

A diferencia de *M. sativa* y de *V. radiata*, en *P. vulgaris*, en el día dos la fase fotoquímica (O-J) y fototermal (I-P) se incrementan con respecto al control; sin embargo, a partir del día cuatro, ambas fases empiezan a disminuir, siendo más evidente este efecto en el octavo día, en el cual el flujo de electrones de las plantas con 2 mM disminuyó en más del 50%, (Figura 8). Estos cambios en las cinéticas de emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* indican que esta

especie solo posee mecanismos regulatorios a bajas concentraciones de Mn (en este caso 1mM), ya que una concentración de 2mM puede provocar efectos inhibitorios como lo hace notar la cinética y los parámetros de emisión de fluorescencia de plantas de *P. vulgaris* con esta concentración de Mn.

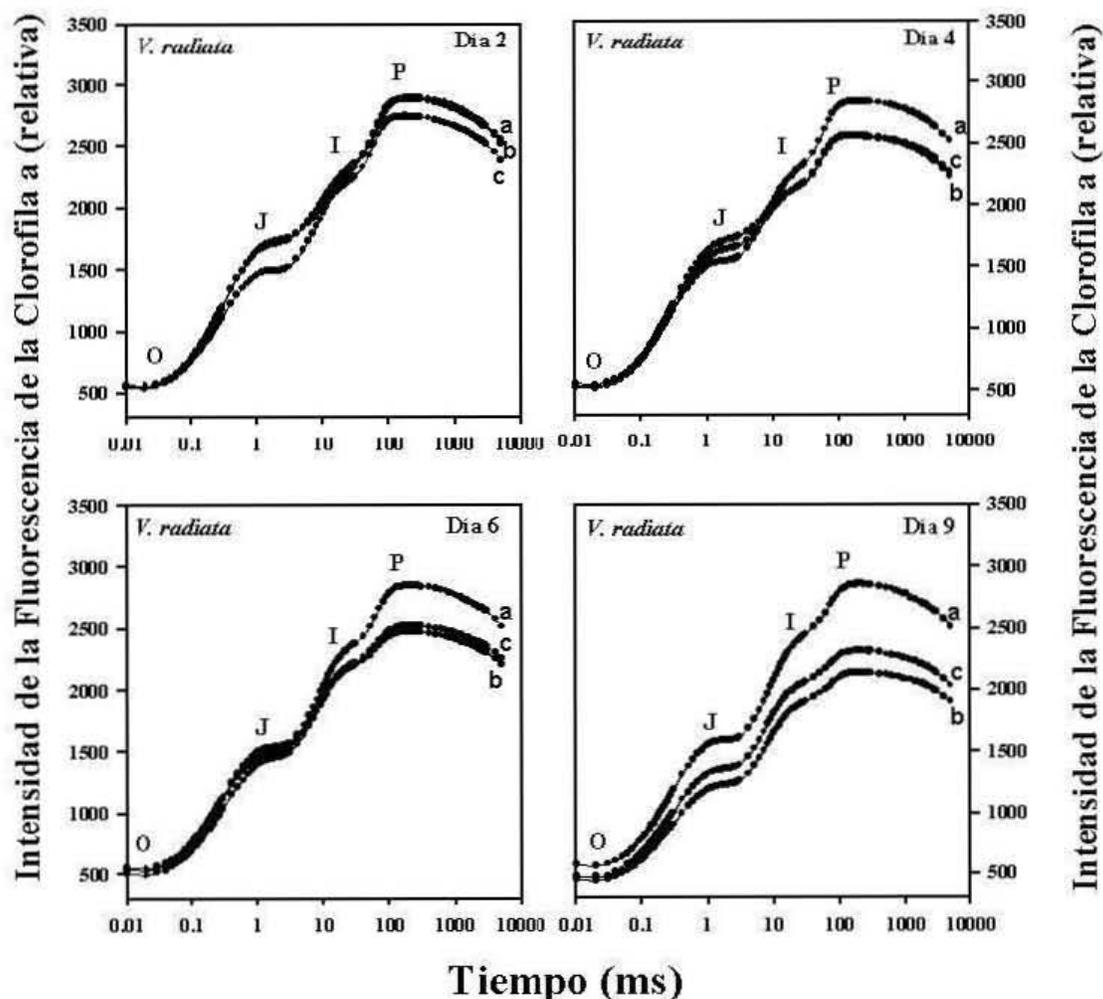


Figura 7.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de frijol mungo (*V. radiata*) tratadas con Mn 1 y 2 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. (a) 0 mM; (b) 1mM; (c) 2 mM.

El flujo de energía (ABS/CS₀; TR₀/CS; ET₀/CS; D₁₀/CS, y RC/CS₀) puede ser representado gráficamente con modelos de hoja. En el caso de *M. sativa*, (Figura 9) pese al incremento en la concentración de Mn, a lo largo de todo el tratamiento el tamaño del complejo antena (ABS/CS₀) no disminuyó considerablemente,

indicando que los dos tratamientos captan la misma cantidad de energía de excitación que el control; lo cual se reflejó en el tamaño de TRo/CS (Captación de energía de excitación). Sin embargo, la cantidad de excitones utilizada para el transporte de electrones fue menor en los dos tratamientos, tal y como se observa en el decremento de ETo/CS (Transporte de electrones). Pese a esta diferencia, en los seis primeros días de tratamiento, la cantidad de energía disipada en forma de calor (Dlo/CS) no difirió con respecto al control, solo se incrementó en el día 9, donde ETo/CS disminuyó en más del 50% debido a la acumulación de QA⁻ y por la deficiente reducción de QB y PQH. Así mismo, en estos modelos de hoja se puede apreciar que en los tratamientos existe una disminución e incremento periódico de los centros de reacción (en los modelos de hoja se muestran como puntos negros, que indican inactivación, y puntos blancos, representando los centros de reacción activos).

Al igual que en *M. sativa*, en *V. radiata* durante todo el tratamiento con Mn, no hubo diferencias significativas en los parámetros ABS/CS y TRo/CS, (Figura 10) pero en este caso, la disminución de ETo/CS solo se da en el cuarto día, ya que en los días 6 y 9 este parámetro no difirió considerablemente con respecto al control. De igual forma, en esta especie de frijol también se observó un ciclo de activación e inactivación de los centros de reacción, lo cual pudo ayudar a mantener el transporte de electrones al mismo nivel que el control. Estos resultados demuestran que *V. radiata* además de los mecanismos de adaptación a nivel fotoquímico y fototermal, tiene otro a nivel centros de reacción.

Un efecto similar al observado en *V. radiata* fue registrado en *P. vulgaris*, pero con la diferencia de que en el octavo día con Mn 2 mM, ETo/CS si disminuyó en comparación con Mn 1mM y con el control, lo cual concuerda con lo observado en las cinéticas de emisión polifásica y en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* de esta especie, (Figura 11).

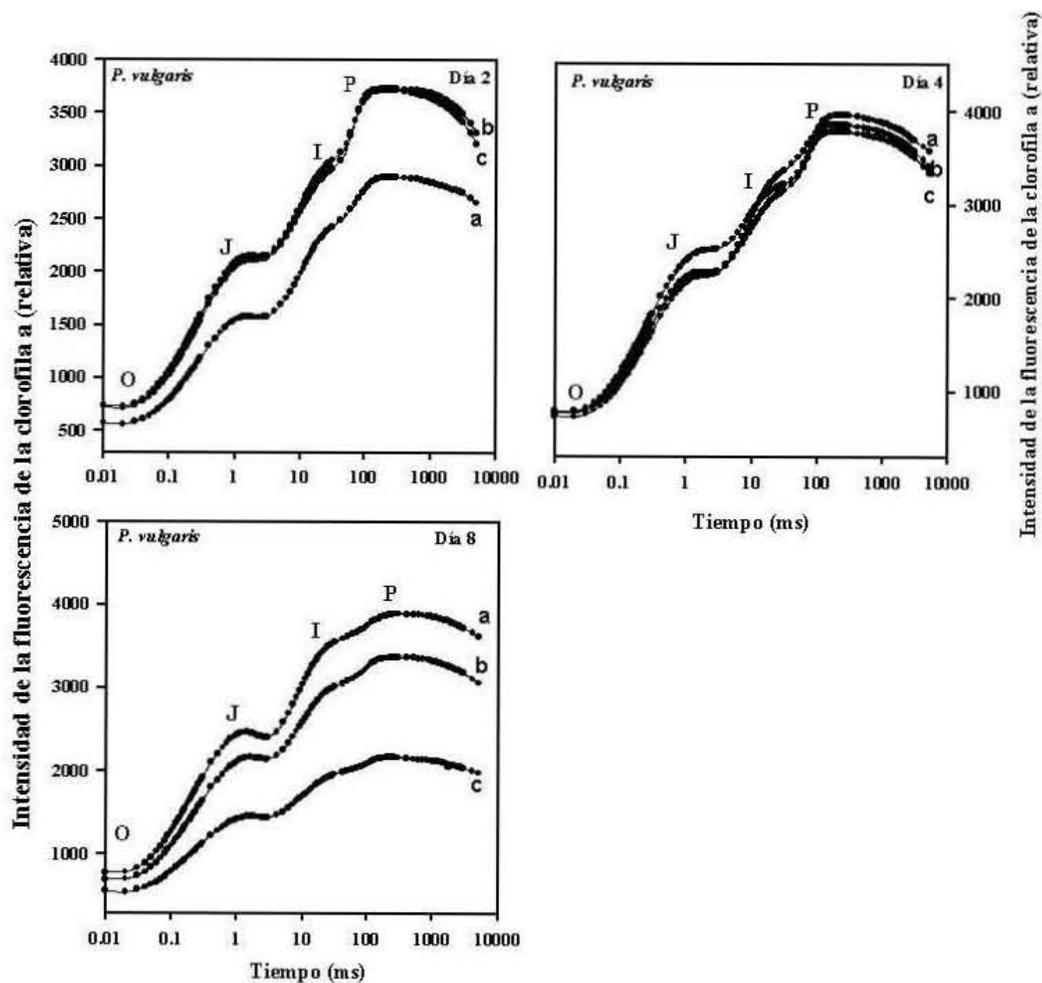


Figura 8.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de frijol común (*P. vulgaris*) tratadas con Mn 1 y 2 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. (a) 0 mM; (b) 1 mM; (c) 2 mM.

Con el propósito de identificar más sitios de inactivación y/o de adaptación ante el estrés por Mn, se calculó la fracción de complejos emisores de oxígeno (CEO) activos con la ecuación $[1-(VK/VJ)]_{\text{tratamiento con Mn}} / [1-(VK/VJ)]_{\text{Control}}$, con la cual se observó, que al igual que en los centros de reacción, en el CEO existe un ciclo de activación e inactivación, (Figura 12). Lo anterior demuestra que *V. radiata* tiene mecanismos adaptativos a nivel CEO, y además, indican que este metal no afecta la actividad del complejo emisor de oxígeno, tal y como se observó en el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno, (Figura 3).

M. sativa

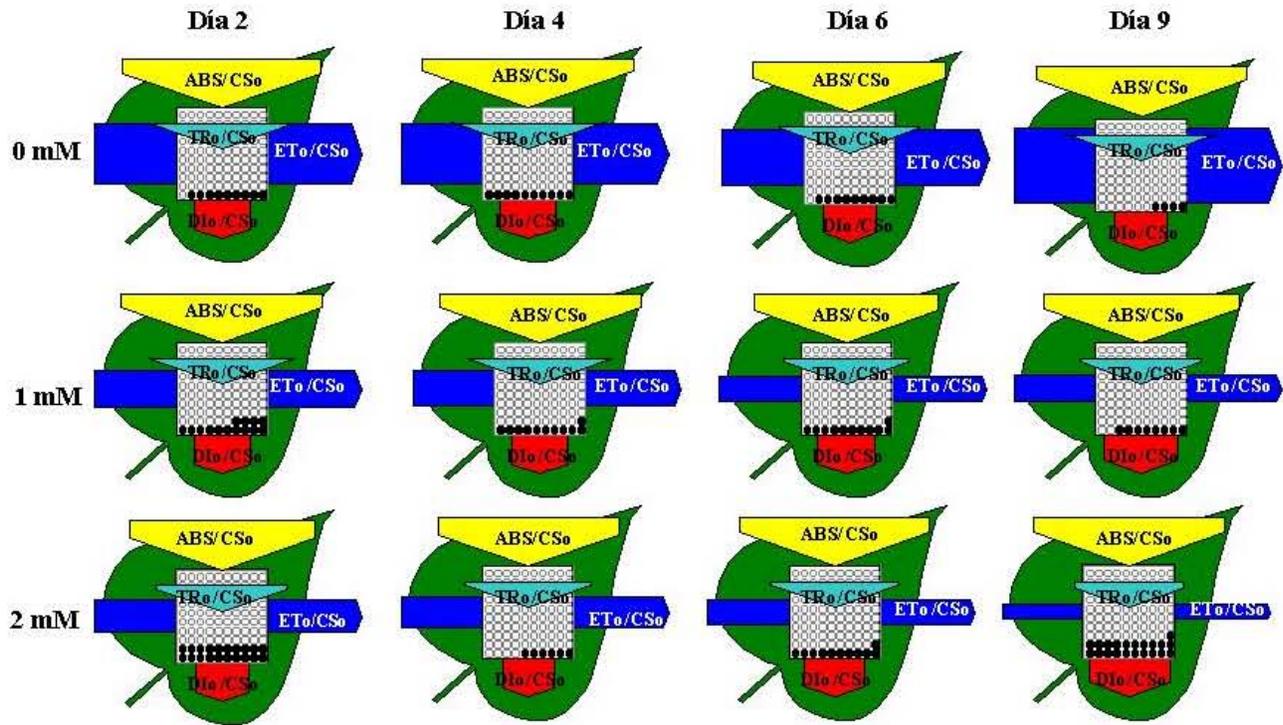


Figura 9.: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *M. sativa* tratadas con Mn 1 y 2 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

El ciclo de activación e inactivación de los CEO no se observó en *P. vulgaris* y *M. sativa*. En el primer caso, durante los ocho días de tratamiento, la fracción de CEO activos se incrementó, siendo mayor esta diferencia en el octavo día, en el cual también se registró un incremento en la liberación de oxígeno en las plantas con 2 mM (Figura 3). En el caso de *M. sativa*, se observó que conforme aumentó el tiempo de exposición al Mn 1 y 2 mM la cantidad de CEO disminuyó, aunque cabe mencionar que en el sexto día no existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, sin embargo, en el noveno día si existe una disminución considerable. Estos últimos resultados indican dos aspectos: por un lado, que en *M. sativa* en una exposición al Mn no mayor a seis días el CEO no fue dañado, tal y como se demostró con el rendimiento cuántico para la liberación de oxígeno (Figura 4), y por otro lado, que en esta planta, ante una exposición prolongada a este metal (9 días) el CEO si se dañó, lo cual, además de la deficiente oxidación

de QA^- , puede ser otro de los factores por los cuales el transporte de electrones disminuyó; por lo tanto el Mn en *M. sativa* afectó las actividades fotoquímicas.

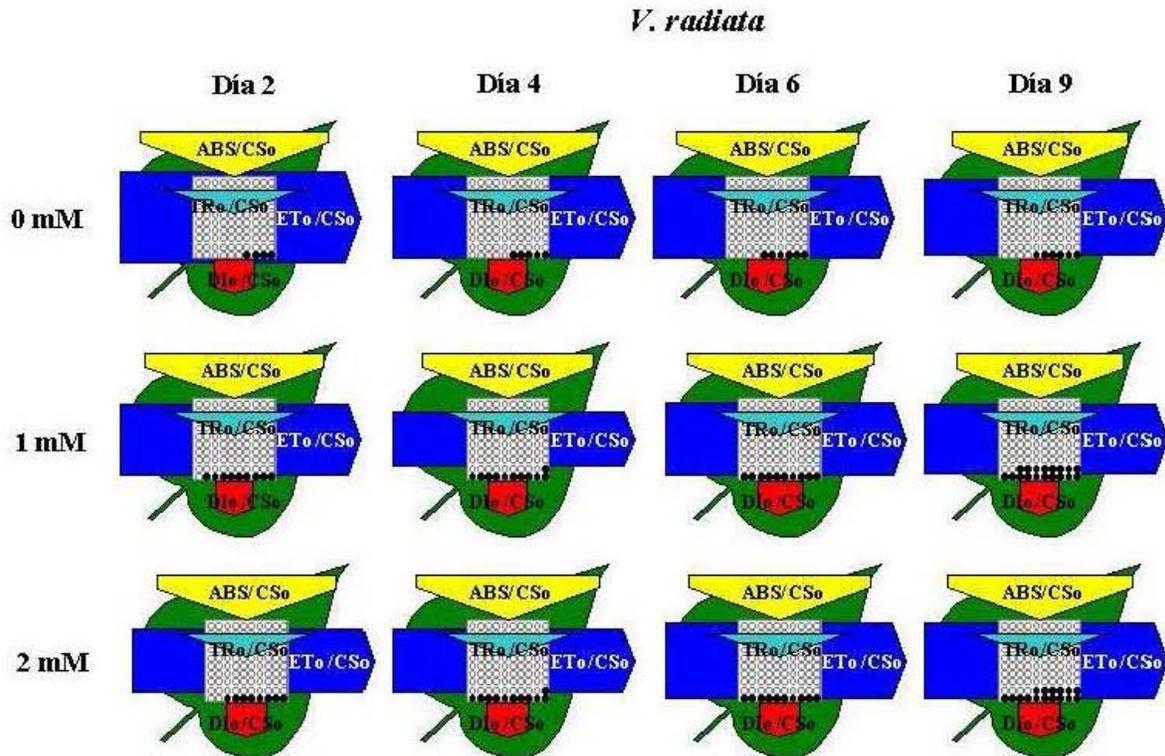


Figura 10.: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *V. radiata* tratadas con Mn 1 y 2 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

Por otro lado, al calcular la eficiencia para el transporte de electrones ($\text{Log } \varphi_{EO}$) y con la que un excitón puede mover un electrón más allá de QA^- ($\text{Log } \Psi_0$), en *V. radiata* se observó que a pesar que durante los primeros cuatro días de tratamiento ambos parámetros disminuyeron, a partir del sexto día ambas eficiencias mostraron una recuperación y/o adaptación al estrés por Mn, caso contrario a *M. sativa*, la cual mostró una clara tendencia a disminuir conforme se incrementó la concentración y el tiempo de exposición, (Figura 13). En el caso de *P. vulgaris*, no hay una marcada tendencia a adaptarse.

P. vulgaris

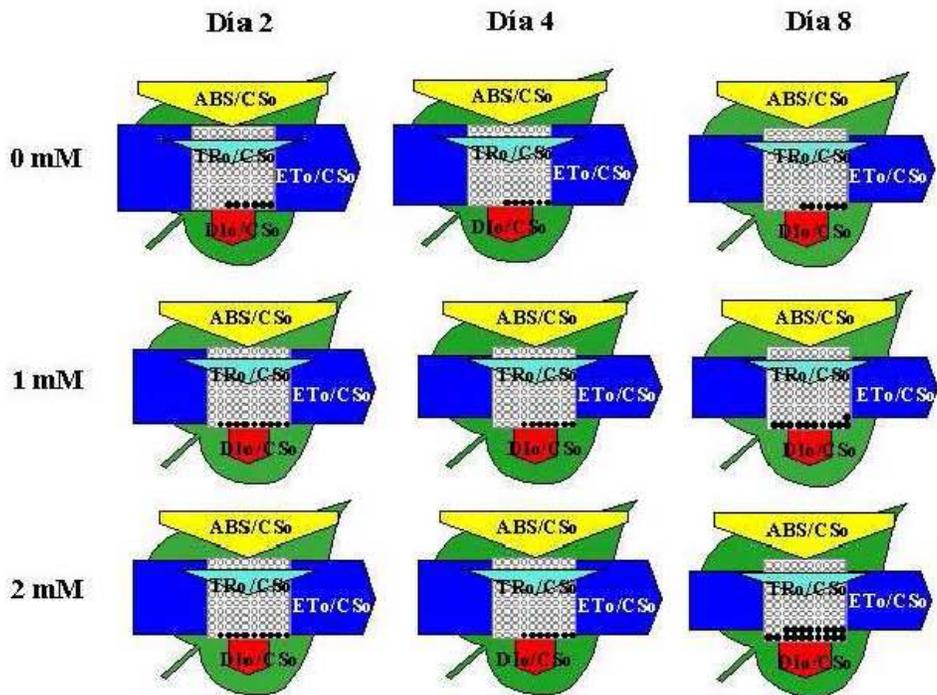


Figura 11: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *P. vulgaris* tratadas con Mn 1 y 2 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

Todo lo anterior corrobora que el aparato fotosintético de *V. radiata* puede adaptarse al estrés por Mn, y además, que en *M. sativa* este metal si afectó los procesos fotoquímicos y fototermales.

La vitalidad de una planta y/o el comportamiento de su FSII ante cualquier tipo de estrés, puede ser valorada mediante el parámetro denominado Índice de rendimiento (PI) o con el logaritmo de PI_{ABS} que representa las fuerzas totales de conducción (DF_{ABS}). DF_{ABS} es construido en analogía a la ecuación de Nerts que describe el potencial redox. De esta forma, DF_{ABS} es la suma de la densidad de centros de reacción (Log RC/ABS); de la eficiencia de las reacciones lumínicas ($\text{Log } \phi_{P_0}/(1-\phi_{P_0})$), y de la eficiencia de las reacciones fototermales ($\text{Log } \Psi_0/(1-\Psi_0)$) (Bueno, *et. al.* 2004. Apperont, *et. al.*, 2004). En la figura 14 se puede observar que el comportamiento del FSII de *V. radiata* ante el estrés por Mn disminuyó durante los primeros cuatro días, lo cual se debió a la disminución en las reacciones lumínicas ($\text{Log } \phi_{P_0}/(1-\phi_{P_0})$) registrada en el cuarto día de tratamiento; por el comportamiento de los centros de reacción (Log RC/CS) y por el decremento en la

eficiencia de las reacciones fototermiales ($\text{Log } \Psi_o/(1-\Psi_o)$). Al analizar detenidamente cada uno de los componentes de DF, se observó que el principal factor de este comportamiento del FSII es por la disminución en la eficiencia de las reacciones fototermiales. Sin embargo, DF mostró una recuperación desde el sexto día, lo cual coincide con el incremento de $\text{Log } \Psi_o/(1-\Psi_o)$, $\text{Log } \phi_{P_o}/(1-\phi_{P_o})$, con la inactivación y activación de centros de reacción (Log RC/ABS), y con la disminución en la captación de energía lumínica (Log ABS/CS). Estos resultados confirman que *V. radiata* tiene mecanismos a nivel fotoquímico (Captación de luz, CEO, CR) y fototermal (transporte de electrones más allá de QA^-) para hacer frente al estrés por Mn.

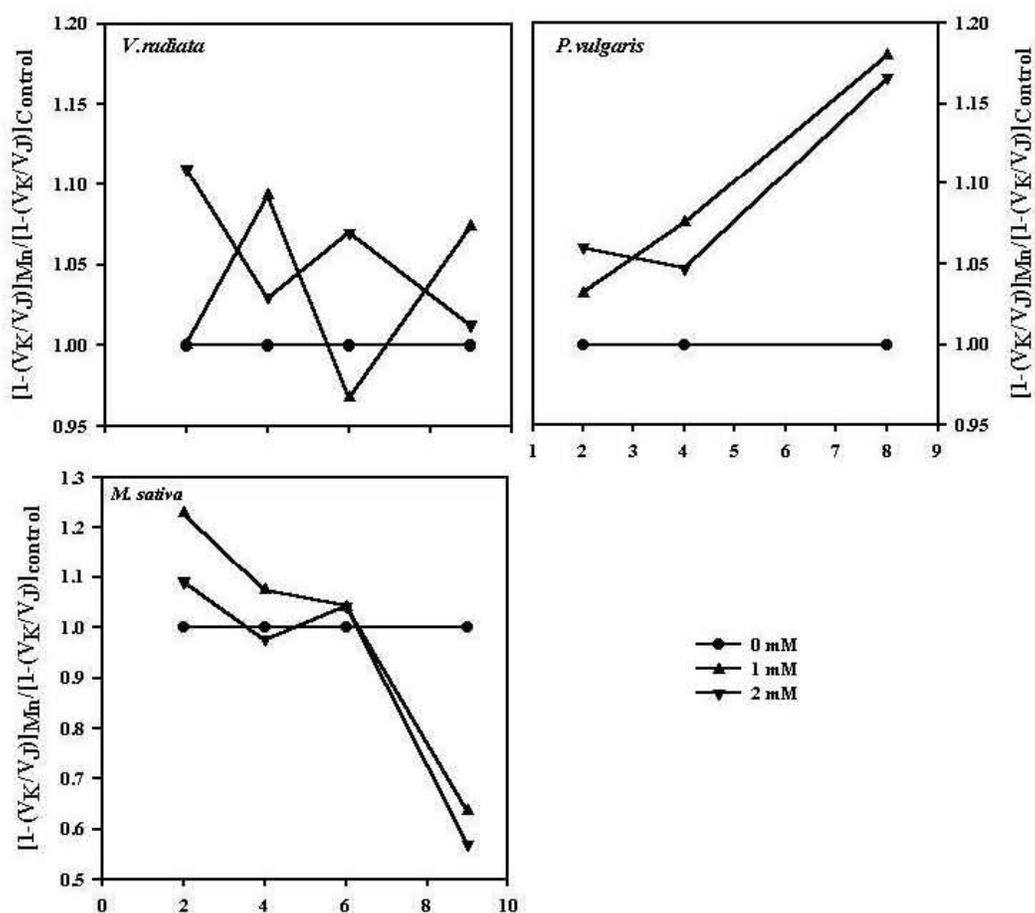


Figura 12: Fracción de Complejos Emisores de Oxígeno activos de plantas de *M. sativa*, *V. radiata* y *M. sativa*, tratadas con Mn 1 y 2 mM. (●) Control (▲) 1 mM (▼) 2 mM Cada trazo es la media de 10 repeticiones.

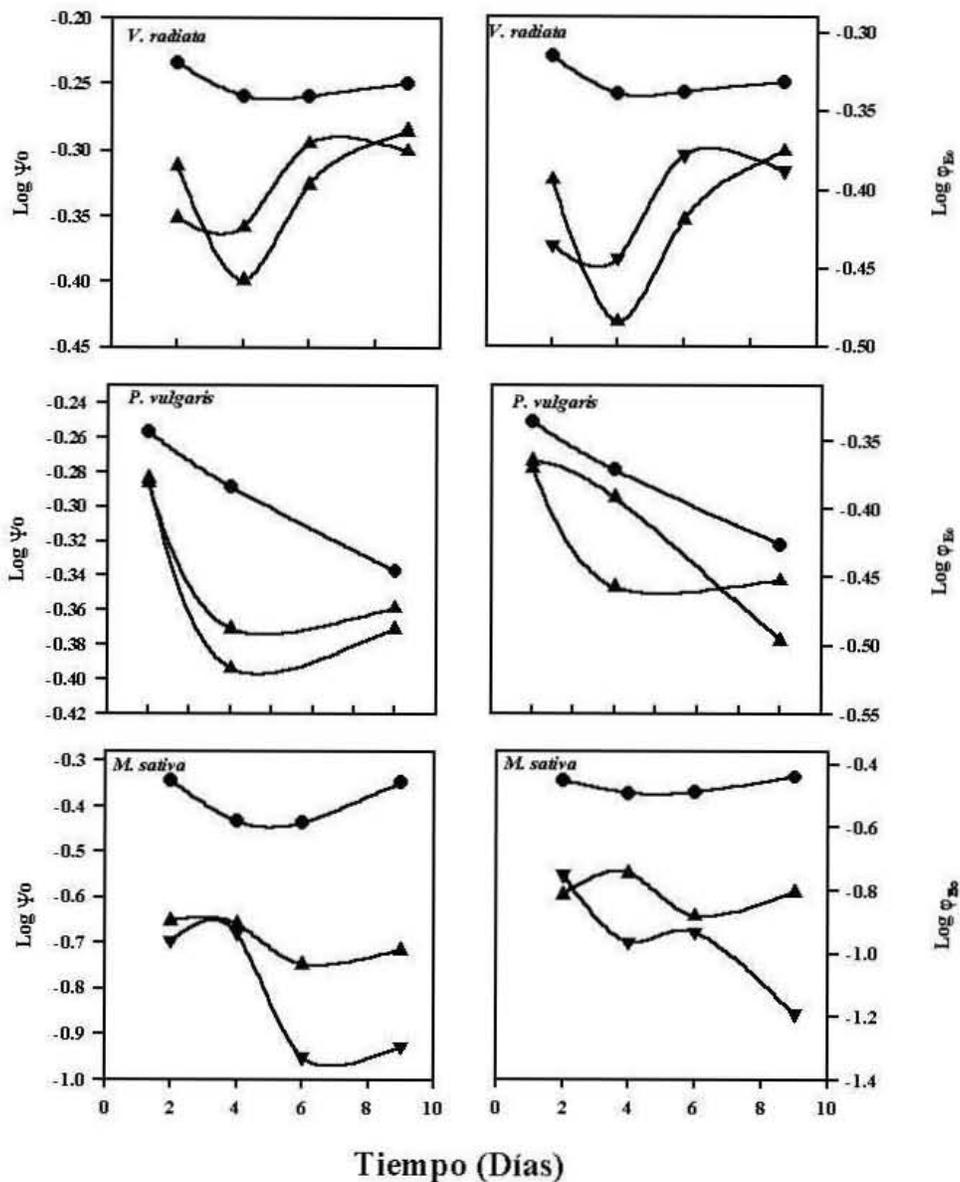


Figura 13.: Alteraciones de las eficiencias en flujo de energía de *M. sativa*, *V. radiata* y *P. vulgaris*, tratadas con Mn 1 y 2 mM. Cada trazo es la media de 10 repeticiones. (●) Control (▲) 1 mM (▼) 2 mM.

En el caso de *P. vulgaris*, a pesar de que en el control se registró una ligera disminución de DF durante todo el tratamiento, (Figura15), la concentración de 2mM de Mn fue la que más afectó al comportamiento del FSII, ya que con 1mM se observó que su actividad se mantiene casi constante desde el cuarto día de tratamiento, esto también se observó en los componentes de DF, con la excepción de Log ABS/CS. Todo esto demuestra que el *P. vulgaris* puede adaptarse a bajas

concentraciones de Mn, ya que con 2 mM los eventos fotoquímicos y fototermales son afectados.

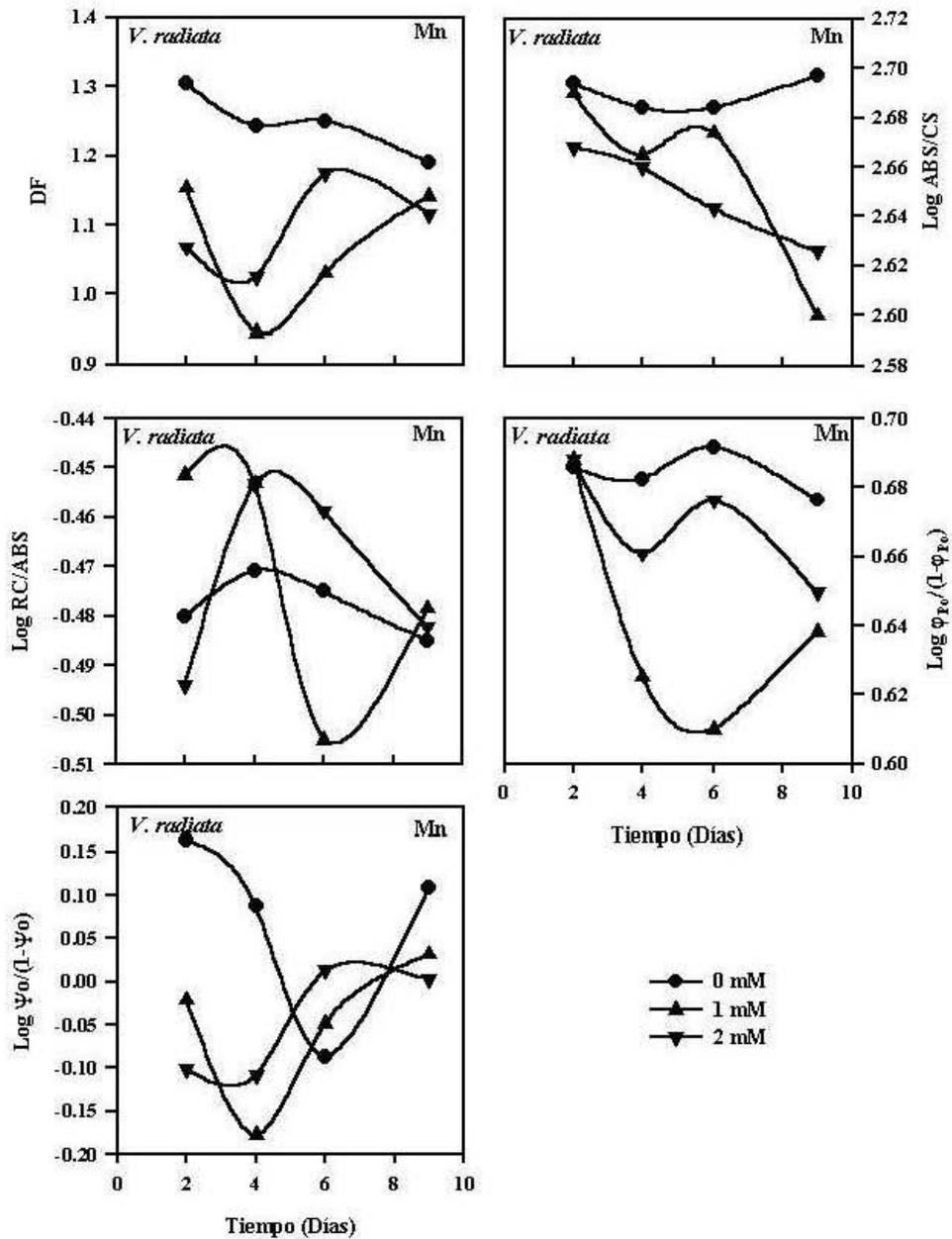


Figura 14.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en el comportamiento del FSII de *V. radiata* evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

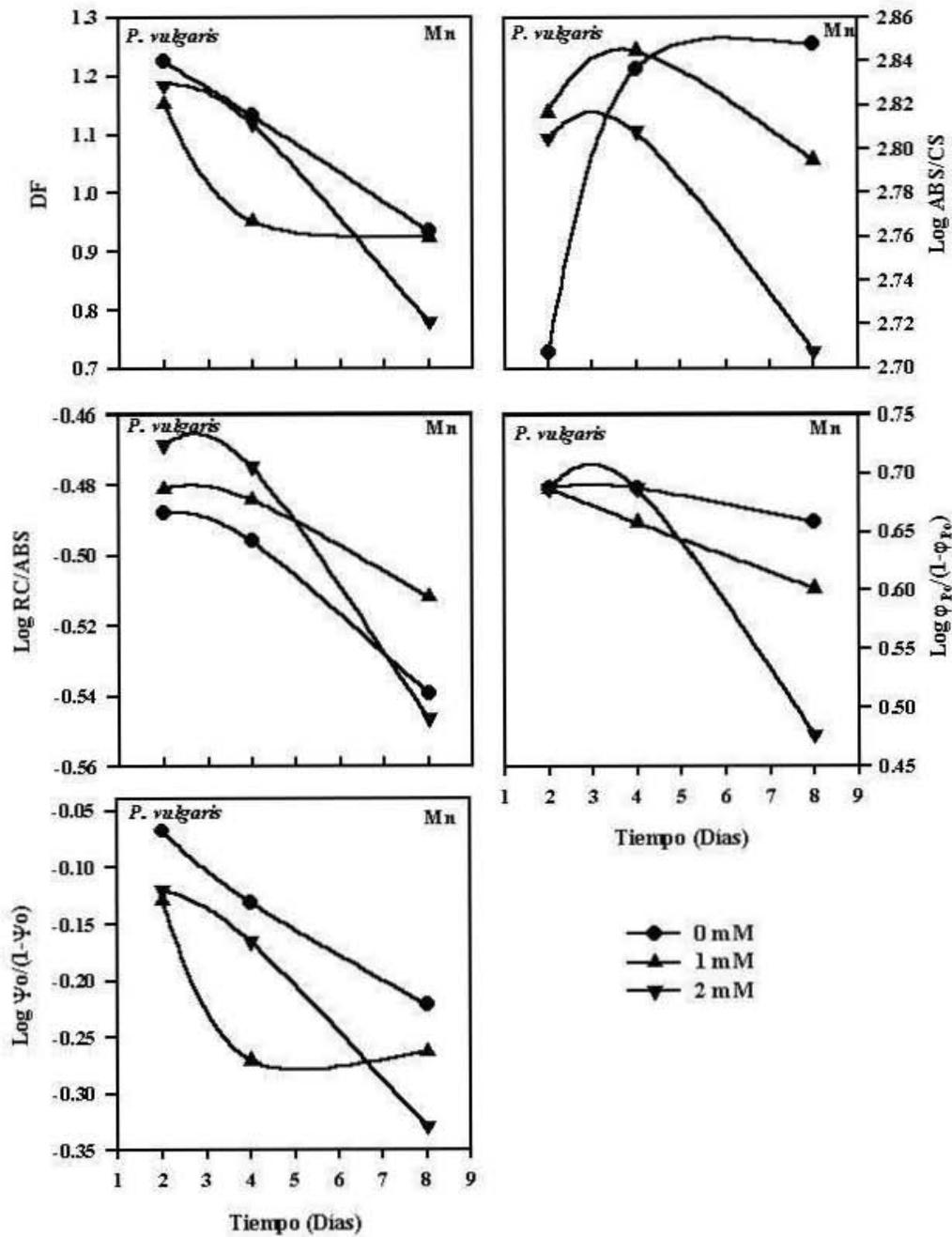


Figura 15.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en el comportamiento del FSII de *P. vulgaris*, evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

A diferencia de *V. radiata*, el comportamiento del FSII de *M. sativa* mostró una clara tendencia a disminuir desde los dos primeros días de tratamiento, lo cual fue atribuido al decremento de las reacciones lumínicas ($\text{Log } \phi_{Po}/(1-\phi_{Po})$) y fototermiales ($\text{Log } \Psi_o/(1-\Psi_o)$), a la inactivación de centros de reacción (Log RC/ABS) y al incremento gradual en la captación de energía lumínica

(Log ABS/CS) , (Figura 16); con estos resultados se demuestra que el Mn en ciertas especies vegetales, en este caso *M. sativa*, si afecta las reacciones fotoquímicas desde los primeros días de exposición.

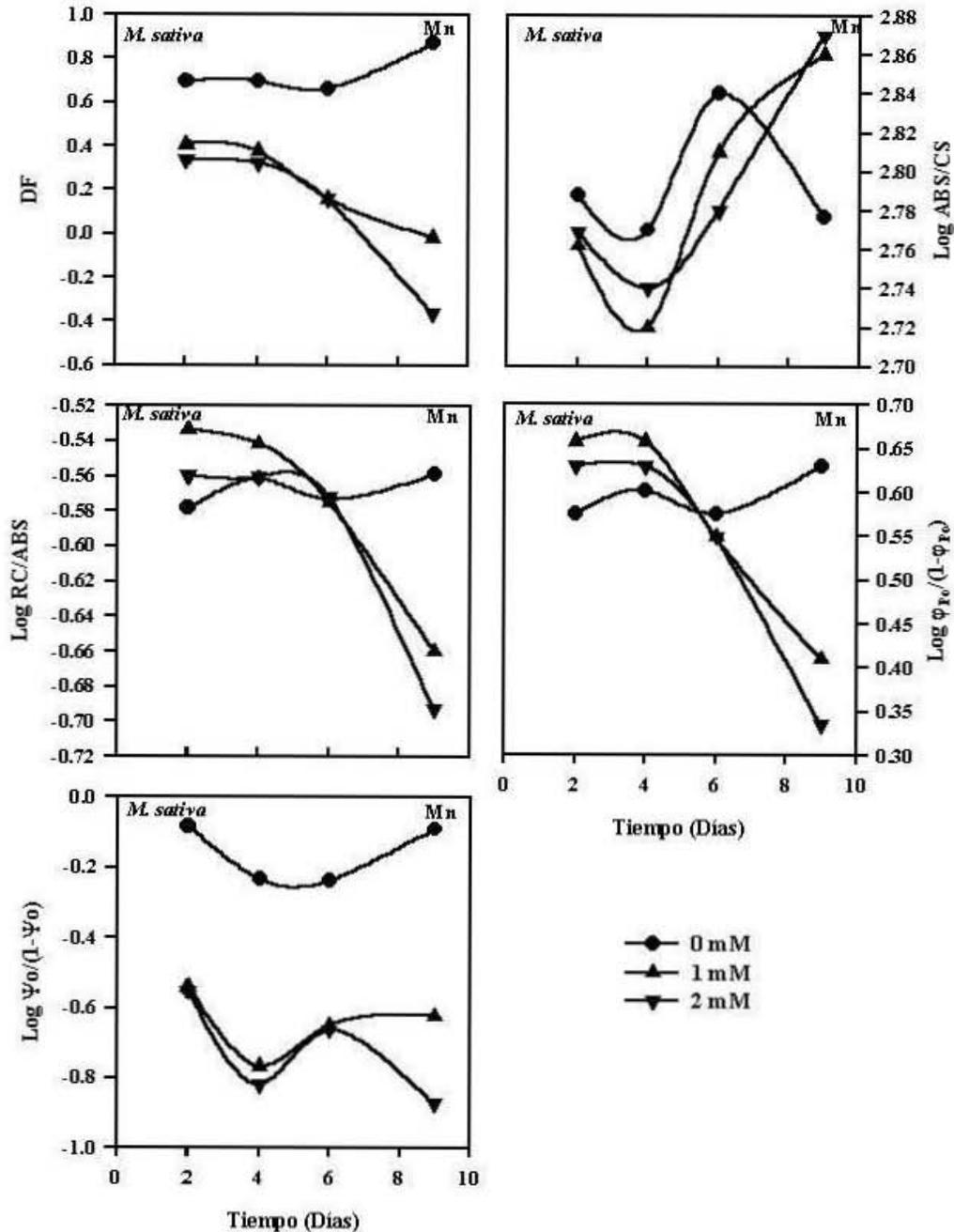


Figura 16.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en el comportamiento del FSII de *M. sativa*, evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

5.3.3.2.-Efectos del Cr.

A diferencia de los cambios provocados por el Mn en las cinéticas de emisión polifásica de la clorofila *a* del FSII de *V. radiata*, en los tratamientos con Cr 0.15 y 0.30 mM, solo en el día dos se registró un aumento en el punto J, el cual disminuyó en los días consecutivos, en donde no se observaron cambios considerables en las cinéticas. En *P. vulgaris*, solo en el día cinco con 0.15 mM, los cuatro puntos de la cinética disminuyeron en comparación del control y del tratamiento con 0.30 mM. Estos datos hacen suponer que este metal no afectó considerablemente los eventos fotoquímicos y fototermales en estas dos especies de frijol (Figuras 17 y 18).

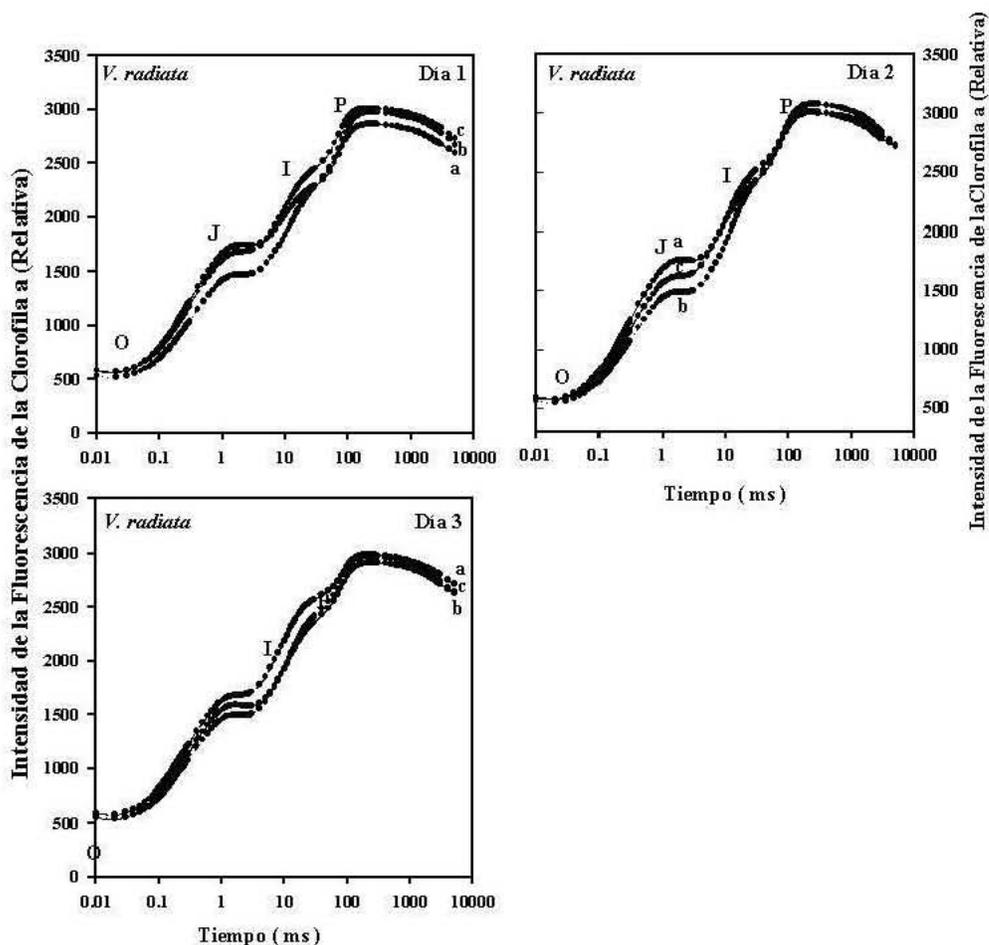


Figura 17.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de frijol mungo (*V. radiata*) tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. (a) 0 mM; (b) 0.15 mM; (c) 0.30 mM.

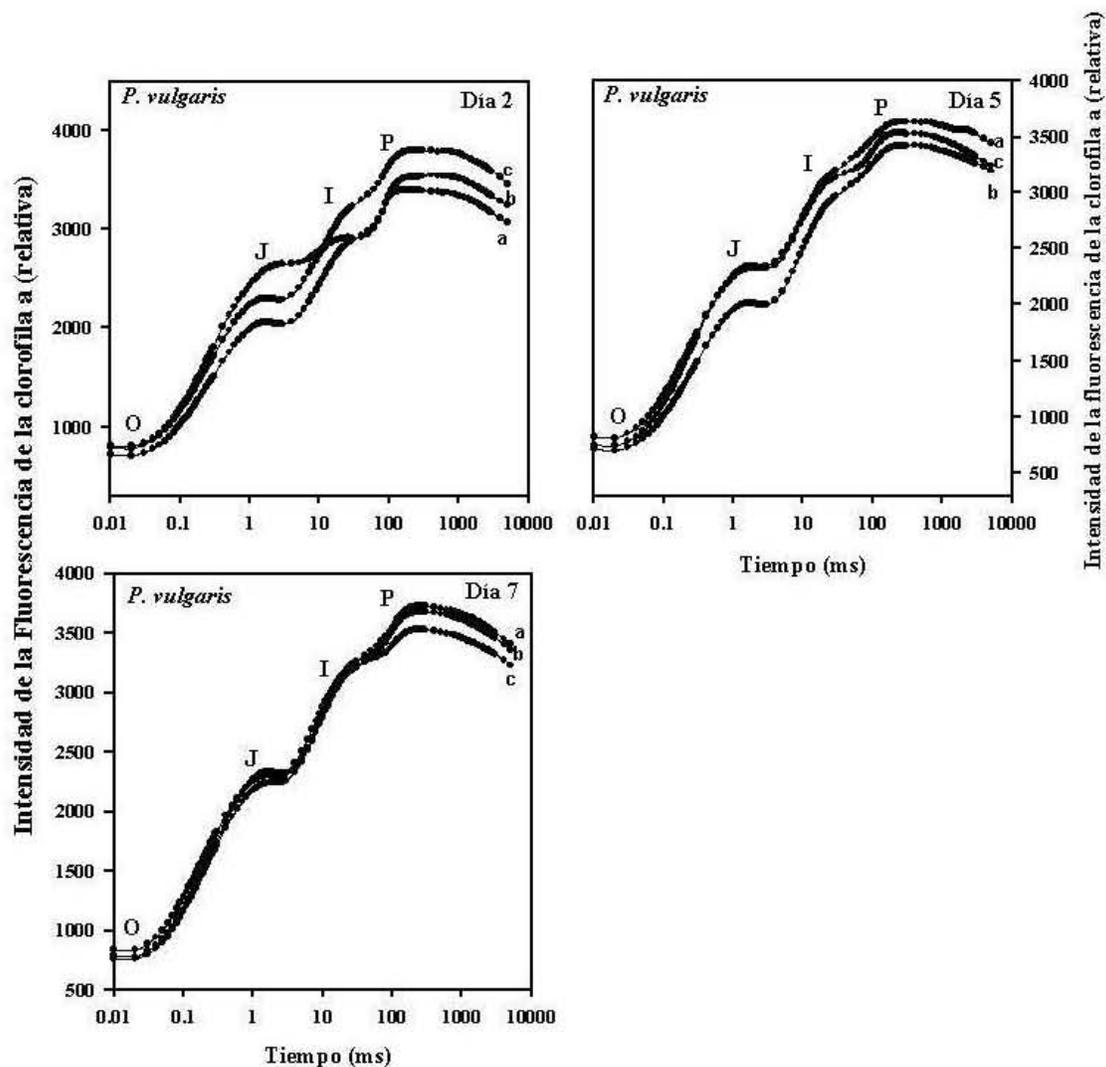


Figura 18.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de frijol común (*P. vulgaris*) tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. a) 0 mM; b) 0.15 mM; c) 0.30 mM.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio dejan en claro que las respuestas de las plantas a los diferentes metales pesados, en este caso Cr y Mn, son especie – específicas, ya que las cinéticas de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de *M. sativa* tratada con las mismas concentraciones de Cr, indican que este metal, al menos en esta especie, si afecta a los procesos fototermiales (reducción de QB y PQH), puesto que se registró un aumento de los puntos O-J, acompañado desde el primer día con 0.30 mM y en el segundo día con 0.15 mM, de la disminución de los puntos I-P, (Figura 19). Así mismo, se comprueba que el Cr provocó una oxidación deficiente de QA⁻, lo cual se reflejó en el incremento de J (acumulación de QA⁻), en la disminución de I-P y en los parámetros de emisión

de fluorescencia, por lo que este metal también afecta a los procesos fotoquímicos y fototermales. Sin embargo, a pesar de que el punto I desaparece, aún existe una ligera reducción de PQH, ya que se formó una pequeña inflexión que corresponde al punto P, esto pudo haber sido por la reducción de PQH mediante cloro-respiración, (Haldimann, *et. al.*2004), o por la presencia de un donador alternativo de electrones como la prolina, (De Ronde, *et. al.* 2004).

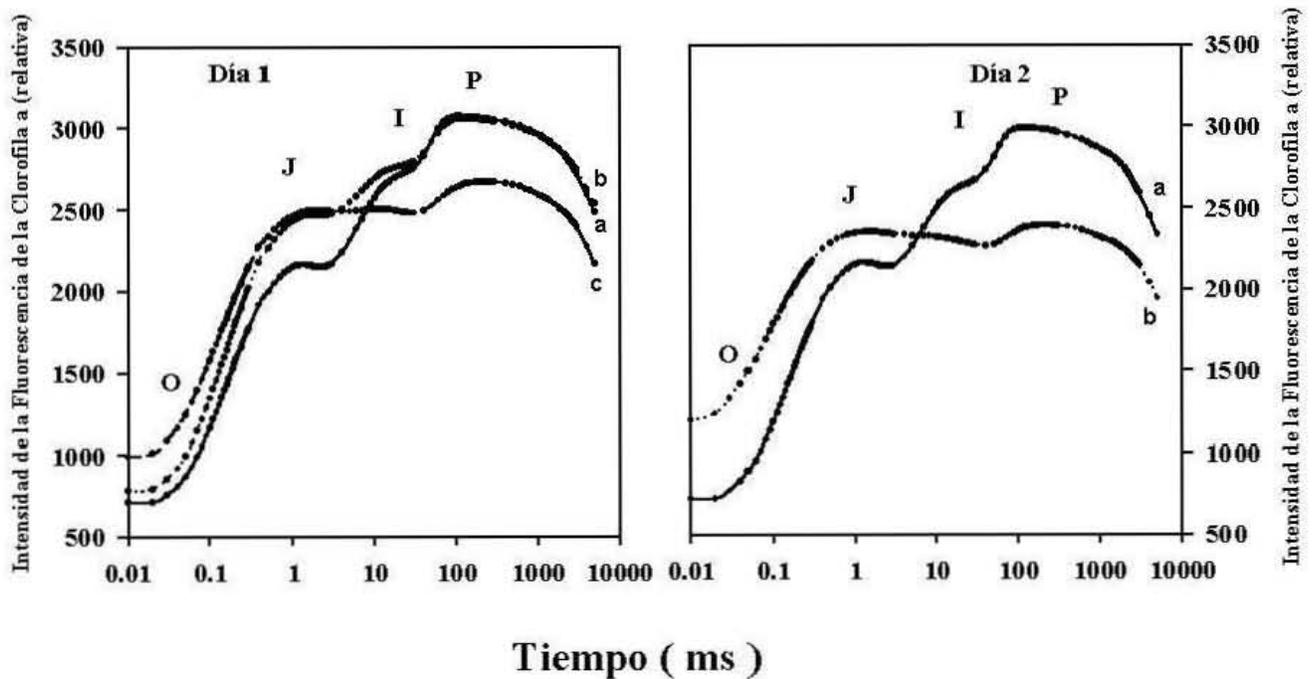


Figura 19.: Cinéticas de emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* del FSII de hojas de alfalfa (*M. sativa*) tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM y adaptadas por 10 minutos a la oscuridad. Cada cinética representa la media de 10 repeticiones de hojas diferentes. a) 0 mM; b) 0.15 mM; c) 0.30 mM.

En los modelos de hoja de *V. radiata*, (Figuras 20) se puede apreciar que durante los primeros días de tratamiento el transporte de electrones (ETo/CS) se incrementó. Sin embargo, en el último día de exposición al Cr, se observó que con una concentración de 0.15 mM, ETo/CS es similar al del control, caso contrario en el tratamiento con 0.30 mM en el cual este parámetro empezó a disminuir. Un efecto similar fue registrado en *P. vulgaris*, (Figura 21) pero en este caso el transporte de electrones disminuyó a partir el día cinco y del día siete con 0.30 y 0.15 mM, respectivamente. Estos resultados dejan en claro que en una exposición

relativamente prolongada al Cr, el transporte de electrones si disminuye. Lo anterior confirma lo observado en los parámetros de emisión de fluorescencia. En contraste, en *M. sativa* desde el primer día de exposición al Cr, la captación de energía de excitación (TRo/Cs) y el transporte de electrones (ETo/CS) disminuyeron, lo cual fue acompañado del incremento de la disipación de energía en forma de calor (Dlo/CS), (Figura 22). Estos efectos fueron más severos en el día dos, ya que los parámetros TRo/CS y ETo/CS de las plantas con 0.15 mM disminuyen en un 90 %, mientras que Dlo/CS se incrementó el doble del control.

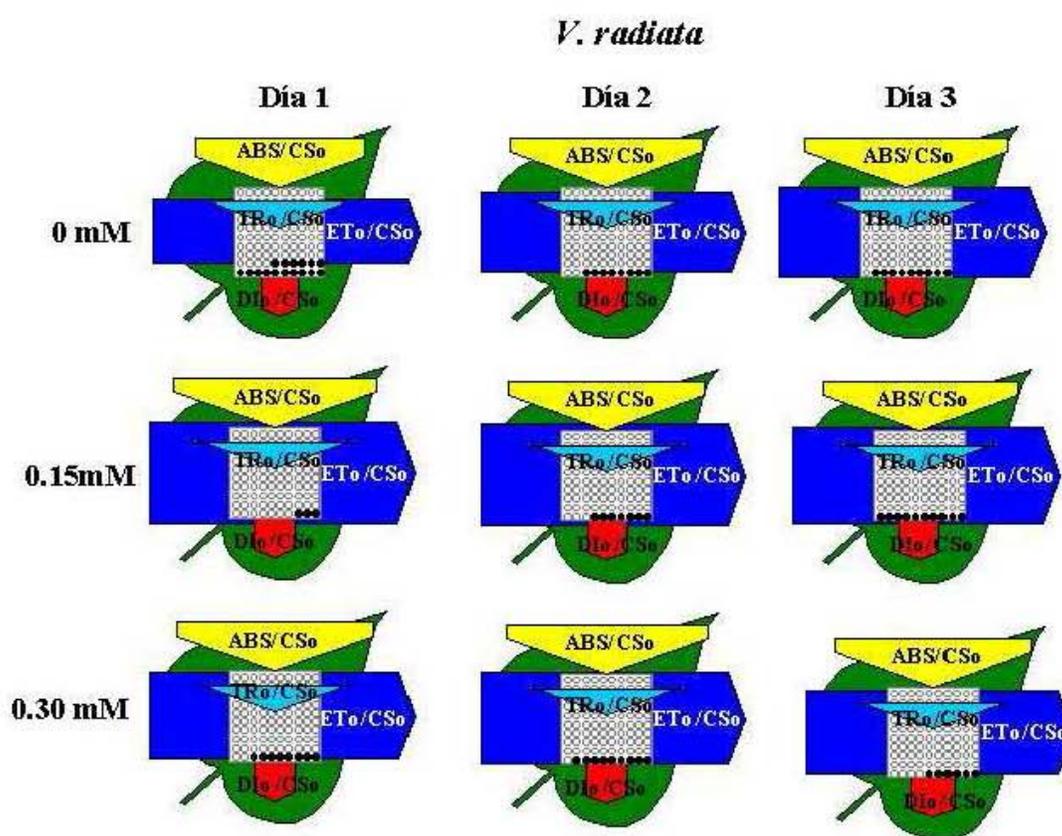


Figura 20.: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *V. radiata* tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

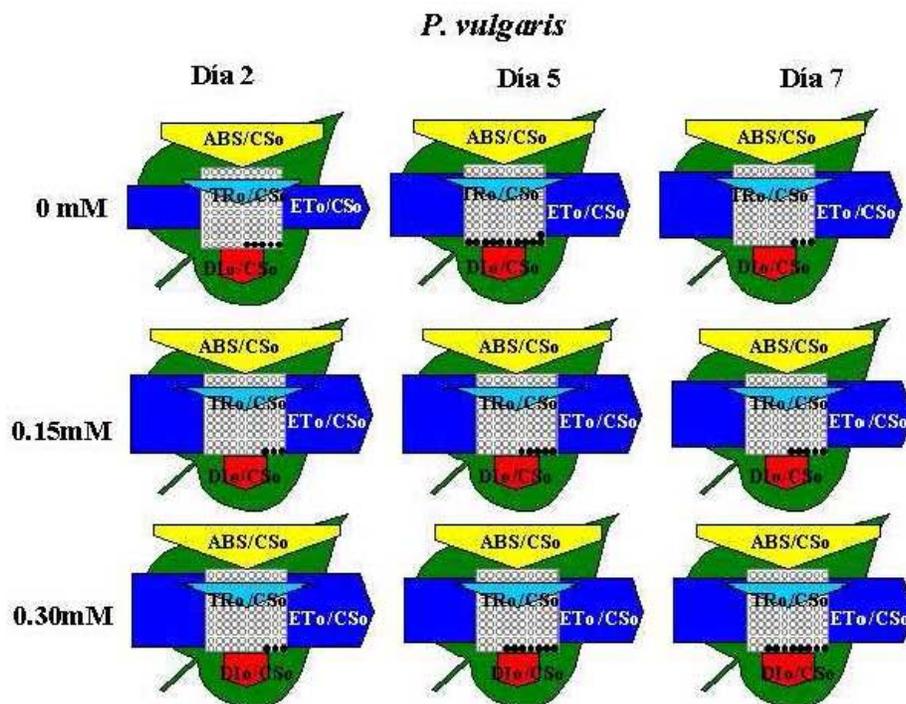


Figura 21: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *P. vulgaris* tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

La disminución en la captación de energía de excitación (TRo/CS), registrada en *M. sativa*, pudo deberse a la disminución en la interacción de las moléculas de clorofila del complejo antena entre los centros de reacción o por la disminución en la fracción de CEO activos, y como se muestra en la figura 23.

En el caso de *V. radiata*, se observó que con Cr 0.30 mM, la fracción de complejos emisores de oxígeno activos disminuyó gradualmente, lo cual fue una de las causas por la cuales el transporte de electrones disminuyó, y además coincide con lo observado en la liberación de oxígeno. En cambio, el tratamiento con Cr 0.15 mM mostró un ciclo de activación e inactivación, que probablemente haga que ETo/CS sea similar al del control (Figura 13). Un efecto similar al del tratamiento con 0.30 mM fue observado con esta misma concentración en *P. vulgaris*, ya que con 0.15 mM en el séptimo día disminuye dicha fracción.

Relacionado a la disminución en el transporte de electrones en *M. sativa*, otra de las causas que provocó este efecto fue la acumulación de QA⁻ y/o la deficiente reducción de QB, ya que la eficiencia con la que un excitón puede mover un electrón más allá de QA⁻ (Log Ψo) disminuyó drásticamente, trayendo como

consecuencia el decremento en la eficiencia del transporte de electrones observado tanto en los modelos de hoja como en el parámetro ϕ_{E_0} , (Figura 24). En el caso de las dos especies de frijol, se observa que otra de las causas por las cuales ET_0/CS disminuyó gradualmente con Cr 0.30 mM, es por el decremento gradual de $\text{Log } \Psi_0$ y de $\text{Log } \phi_{E_0}$, (Figura 24).

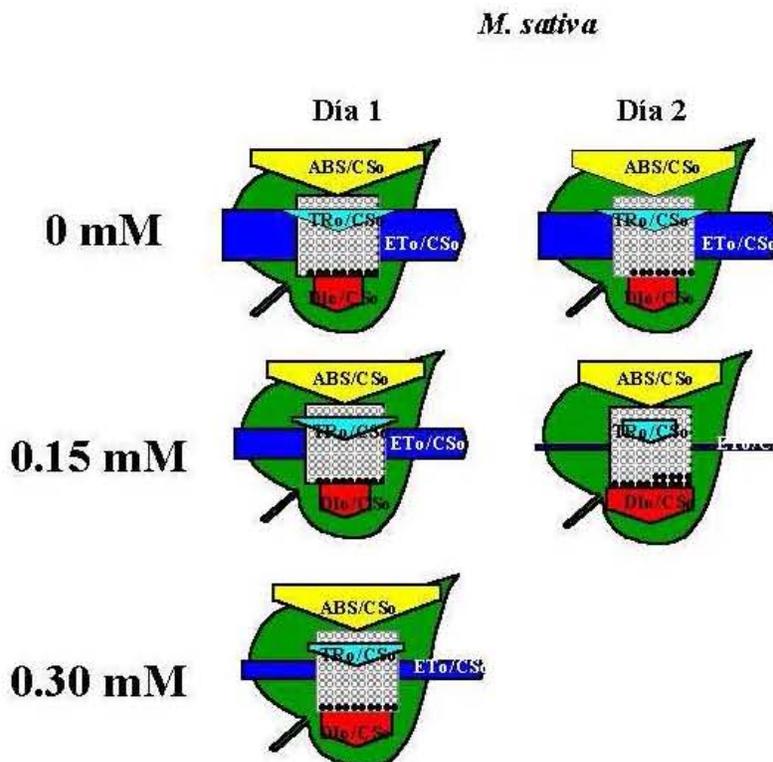


Figura 22: Modelos de hoja para el flujo de energía (absorción, captura de excitones, disipación y transporte de electrones) por sección transversal de hojas de plantas de *M. sativa* tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Cada imagen es la media de 10 repeticiones. El ancho de cada flecha corresponde a la intensidad del flujo de energía. Los puntos negros representan la cantidad de centros de reacción inactivos.

Con respecto al comportamiento general del FSII de *M. sativa*, en la figura 25 se observa que DF disminuyó drásticamente conforme aumentó el tiempo de exposición y la concentración del Cr, lo cual probablemente se debió a la disminución en la interacción entre las clorofilas del complejo antena y los centros de reacción, tal y como se demuestra en el incremento de Log ABS/CS y en el decremento de Log RC/ABS . Además, la disminución de la vitalidad de las plantas

de *M. sativa*, también fue provocada por el decremento en la eficiencia de las reacciones lumínicas ($\text{Log } \phi_{\text{P}0}/(1-\phi_{\text{P}0})$) y de la eficiencia de las reacciones fototermales ($\text{Log } \Psi_0/(1-\Psi_0)$); por lo que con estos resultados se confirma que el Cr afectó las reacciones fotoquímicas y fototermales de *M. sativa*.

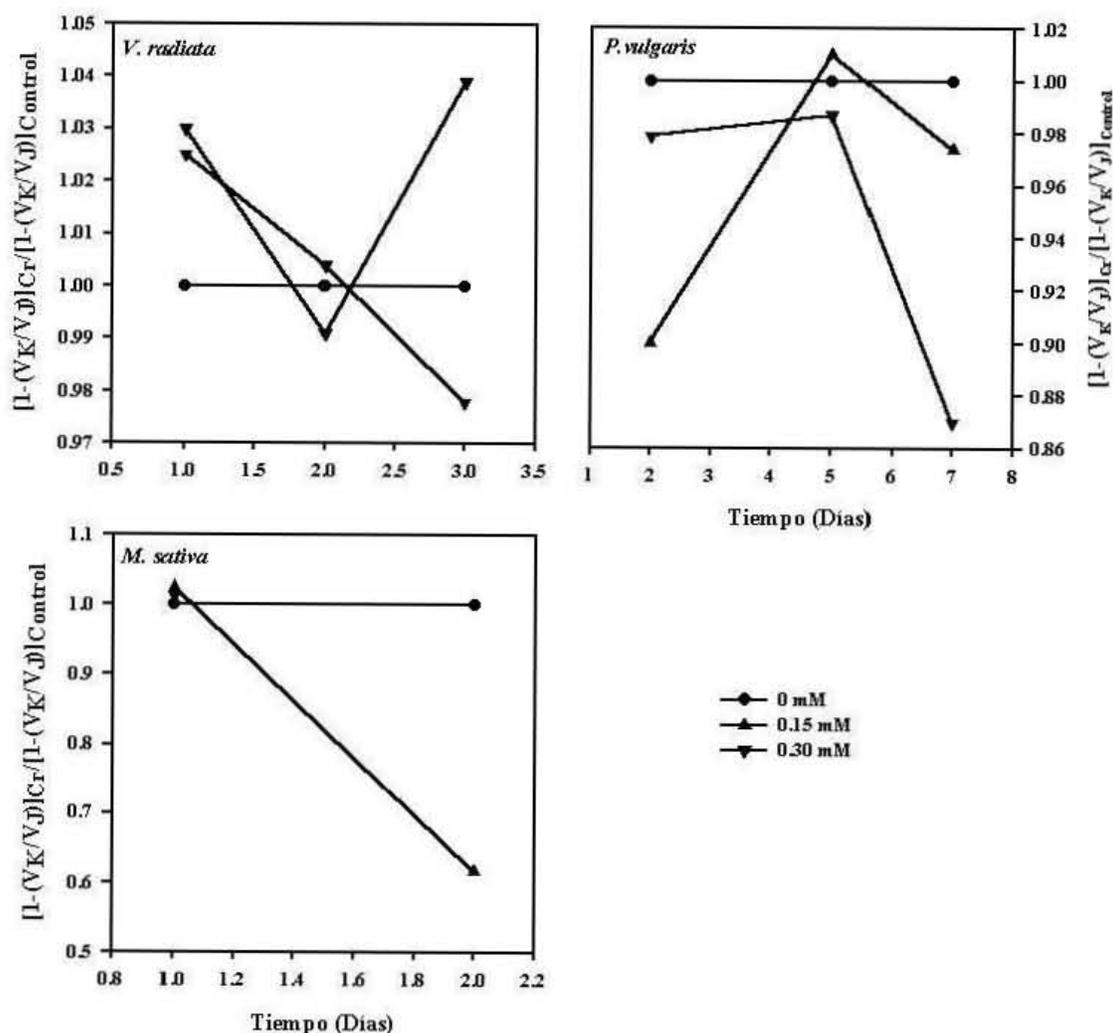


Figura 23: Fracción de Complejos Emisores de Oxígeno activos plantas de *M. sativa*, *V. radiata* y *P. vulgaris*, tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. (●) 0 mM (▲) 0.15 mM (▼) 0.30 mM. Cada trazo es la media de 10 repeticiones.

A pesar de que los valores de DF de *V. radiata*, tratada con Cr, se mantuvieron por encima del control en los primeros días, se observó que conforme avanzó el tiempo de exposición, este parámetro fue disminuyendo gradualmente, lo cual se debió a la disminución en la eficiencia de las reacciones lumínicas y fototermales,

y del decremento en la interacción de las clorofilas del complejo antena y de los centros de reacción, tal y como se demostró con el incremento en Log ABS/CS y Log RC/ABS; aunque cabe mencionar que este efecto fue dependiente del tiempo de exposición y de la concentración del Cr. Este mismo efecto fue observado en *P. vulgaris*, (Figuras 26 y 27), por lo que el Cr puede afectar a las actividades fotoquímicas y fototermales en una exposición prolongada a este metal.

5.3.4.Efectos del Cr y Mn en el transporte de electrones del FSI.

En la figura 28 se muestran los efectos del Mn 1 y 2 mM y del Cr 0.15 y 0.30 mM en el transporte de electrones del FSI de las tres especies que fueron estudiadas. En ella se observa que en las plantas de *M. sativa* con Mn 1 mM la actividad del FSI se incrementó dos veces más con respecto al control y al tratamiento con 2 mM, lo cual fue acompañado del aumento del transporte de electrones de la cadena completa. Sin embargo, pese que en el tratamiento con 2 mM se incrementa la actividad de la cadena completa, no se encontraron diferencias significativas entre el transporte de electrones del FSI de este tratamiento con la del control.

El incremento de la actividad del FSI también fue registrada en las plantas de *V. radiata* con Mn 1mM, pero en este caso, el aumento fue menor en comparación al registrado en *M. sativa*, y además, la actividad de la cadena completa no se incrementó. En el caso del tratamiento con 2 mM, no se encontraron diferencias significativas con respecto al control, tanto en la cadena completa como en las reacciones parciales del FSI, (Figura 28).

A diferencia de *M. sativa* y *V. radiata*, en *P. vulgaris* se observó un incremento de la cadena completa, lo cual dependió de la concentración de Mn presente en el medio de crecimiento; sin embargo, en ambos tratamientos la actividad del FSI disminuyó, (Figura 28)

Los datos obtenidos de las plantas tratadas con Mn, confirman que *V. radiata* puede adaptarse al estrés por Mn, ya que en ella no fueron afectadas considerablemente las reacciones de la cadena completa y del FSI, caso contrario a *P. vulgaris* y *M. sativa*, en las cuales si fueron afectadas.

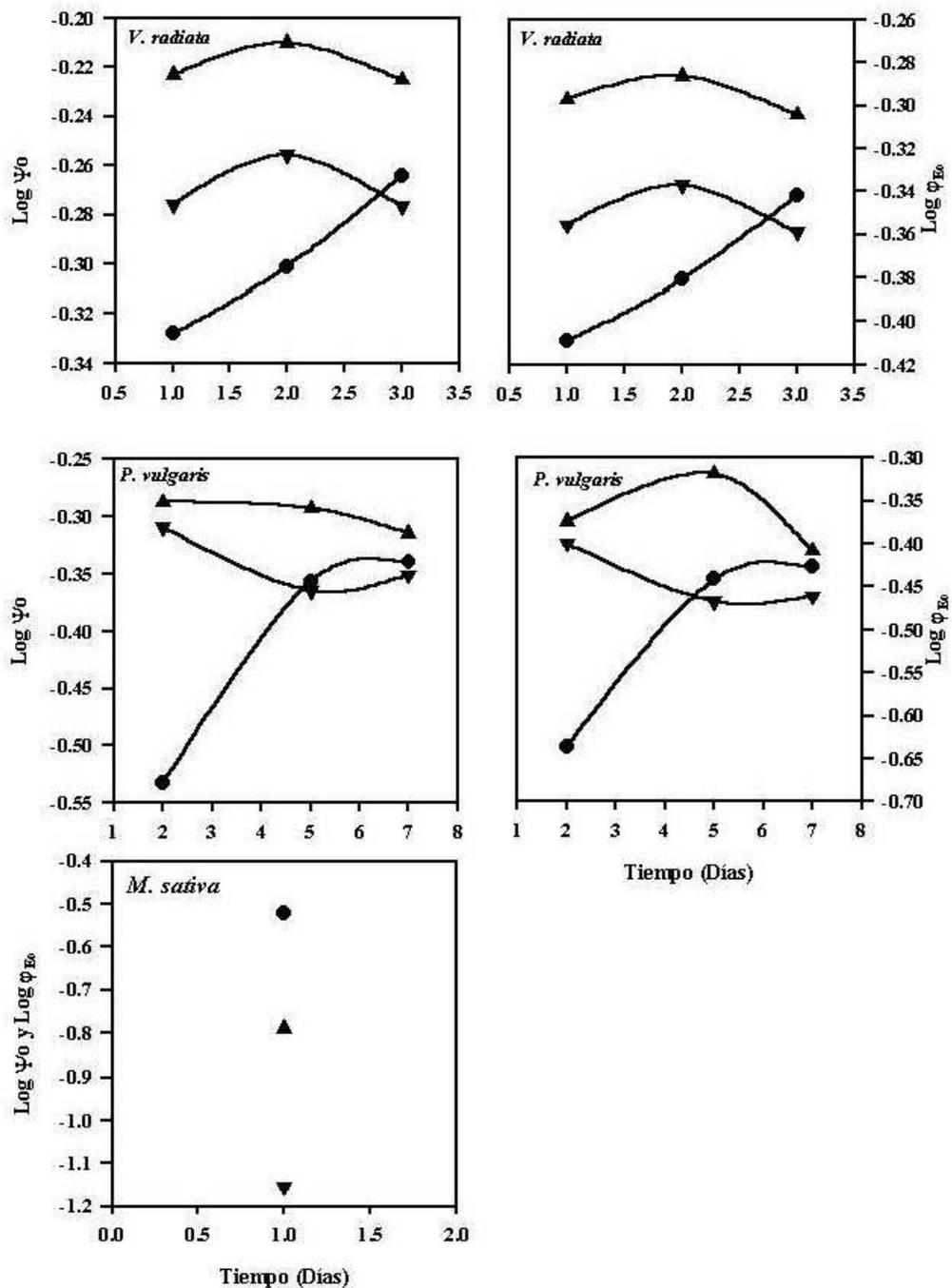


Figura 24.: Alteraciones de las eficiencias en flujo de energía de *M. sativa*, *V. radiata* y *P. vulgaris*, tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Cada trazo es la media de 10 repeticiones. (●) 0 mM (▲) 0.15 mM (▼) 0.30 mM.

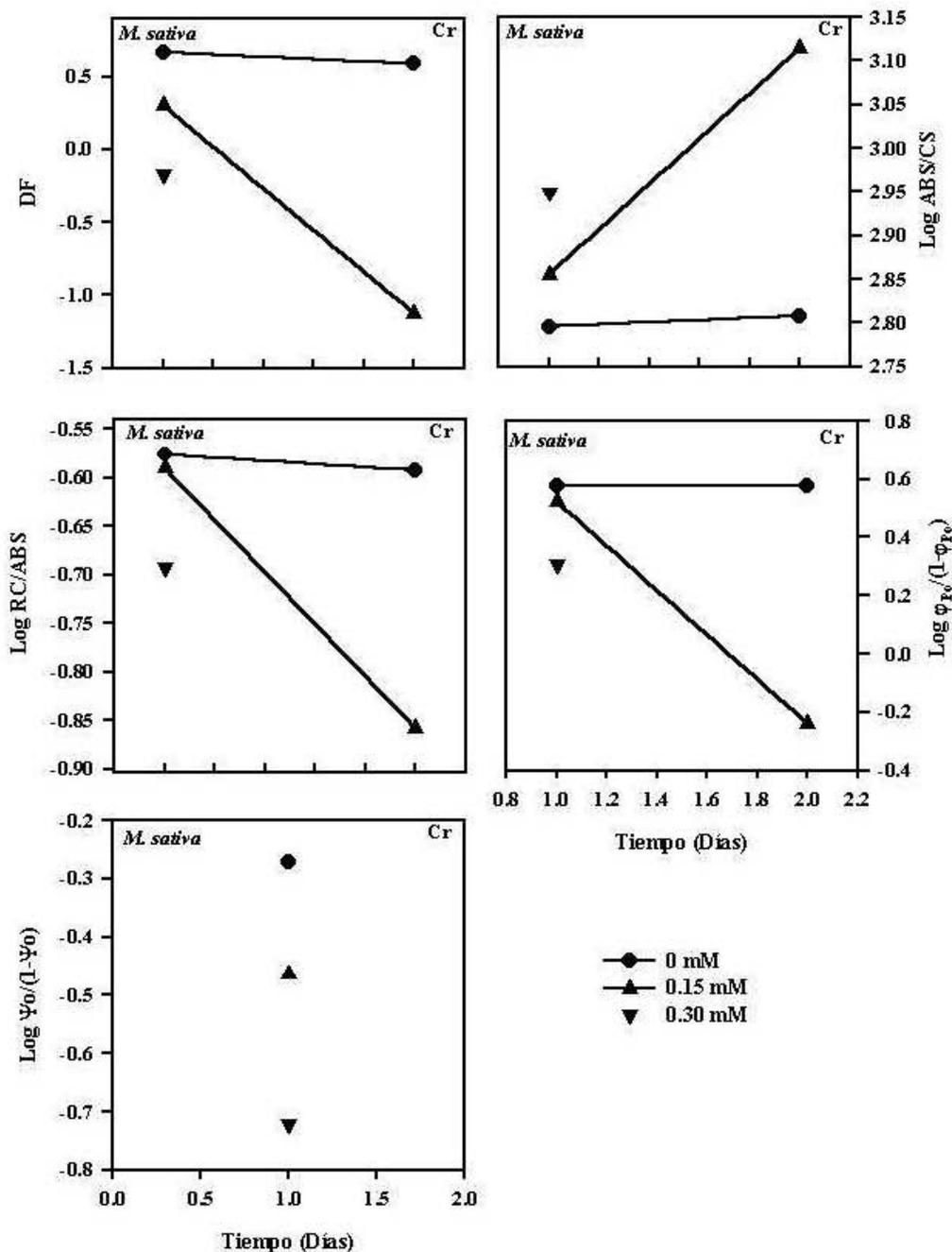


Figura 25.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en el comportamiento de FSII de *M. sativa*, evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

Quizá una de las causas por las que la cadena completa de *P. vulgaris* se incrementó, fue por el aumento de la fracción de CEO activos, (Figura 13), los cuales pudieron haber mantenido un aporte constante de electrones y quizá mayor a los aportados por el ascorbato y el DCPIP. Aunado a esto, probablemente el Citb/f fue afectado por el Mn y de esta forma disminuyó el transporte de electrones

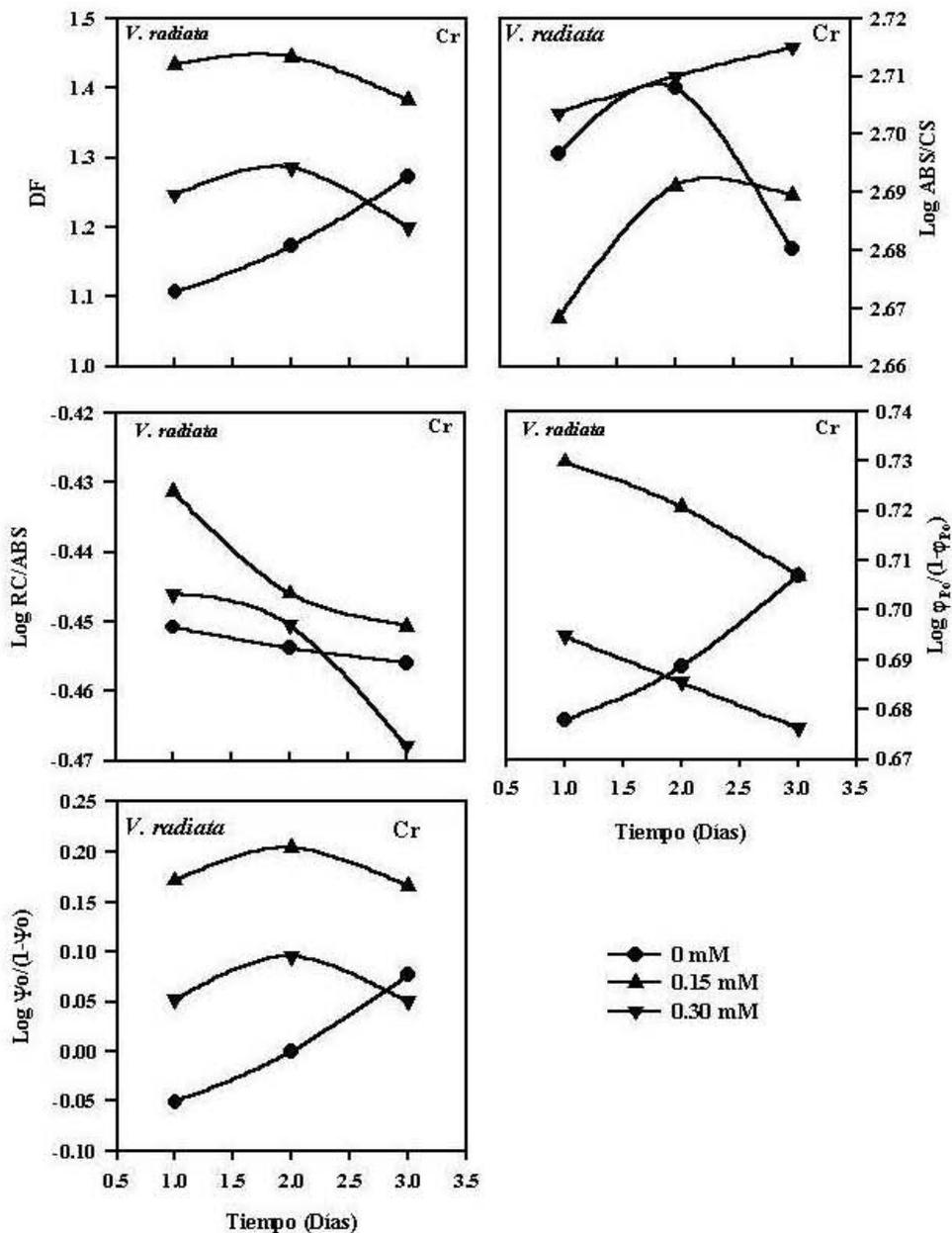


Figura 26.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en el comportamiento de FSII de *V. radiata*, evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

del FSI, (Perales, 2001), sin embargo, esto no desencadenó la disipación de energía en forma de calor (Figura 11), ya que estas plantas tendieron a disminuir la captación de energía, que fue reflejado en el parámetro F_o (Tabla 2). Por otro lado, el incremento en la actividad del FSI en plantas de *M. sativa*, pudo ser un indicativo de que el transporte de electrones cíclico fue activado y/o incrementado por el efecto del Mn.

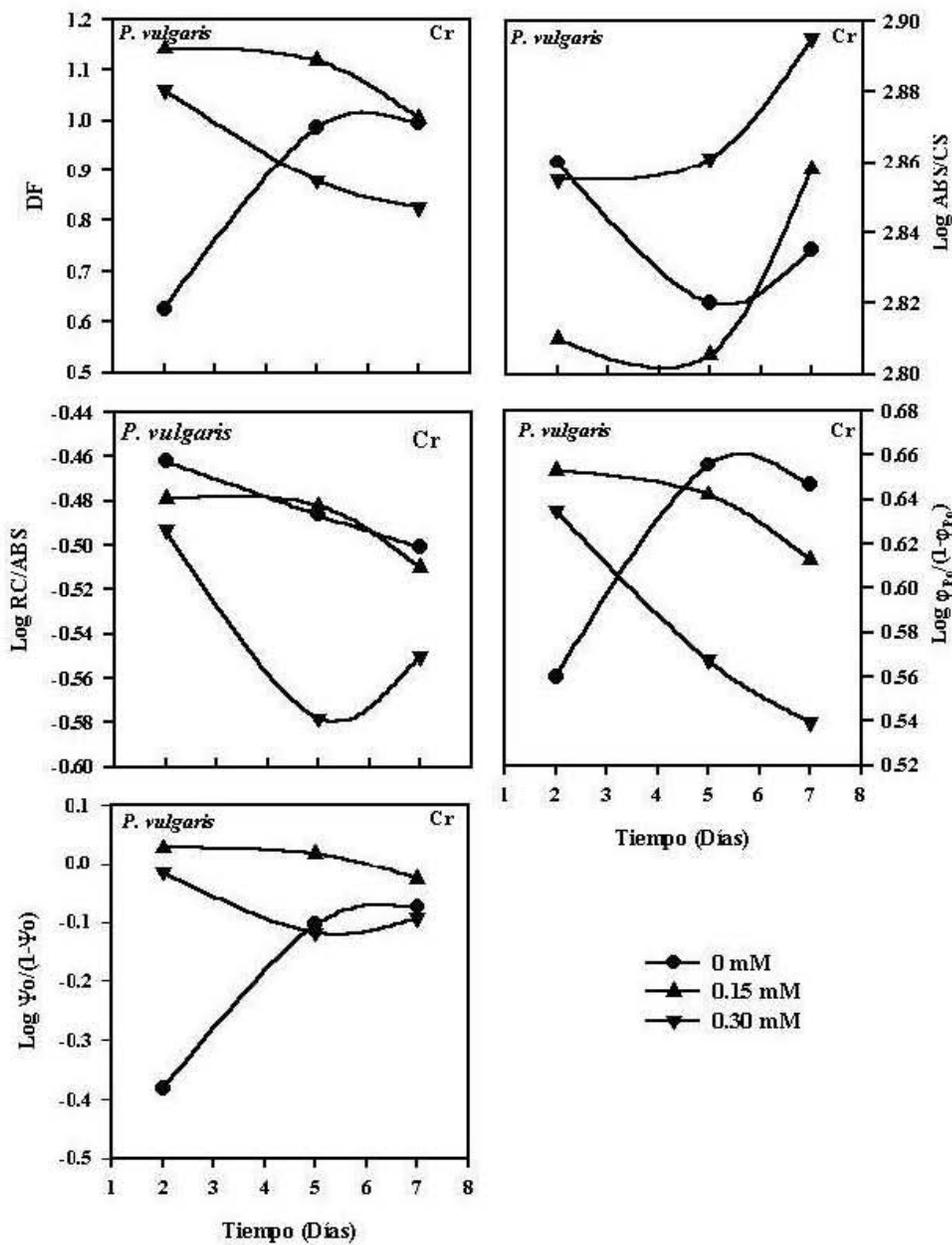


Figura 27.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en el comportamiento de FSII de *P. vulgaris*, evaluado con el parámetro DF y con cada uno de sus componentes (Ver detalles en el texto). Los valores graficados son la media de 10 repeticiones.

En el caso de los efectos del Cr, se observó que este metal disminuye la actividad de la cadena completa y del FSI de *P. vulgaris*, (Figura 28), caso contrario a *V. radiata*, en la cual no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento con Cr 0.15 mM, mientras que con Cr 0.30 mM se incrementó dos veces el transporte de electrones del FSI en comparación con el control y el tratamiento con 0.15 mM.

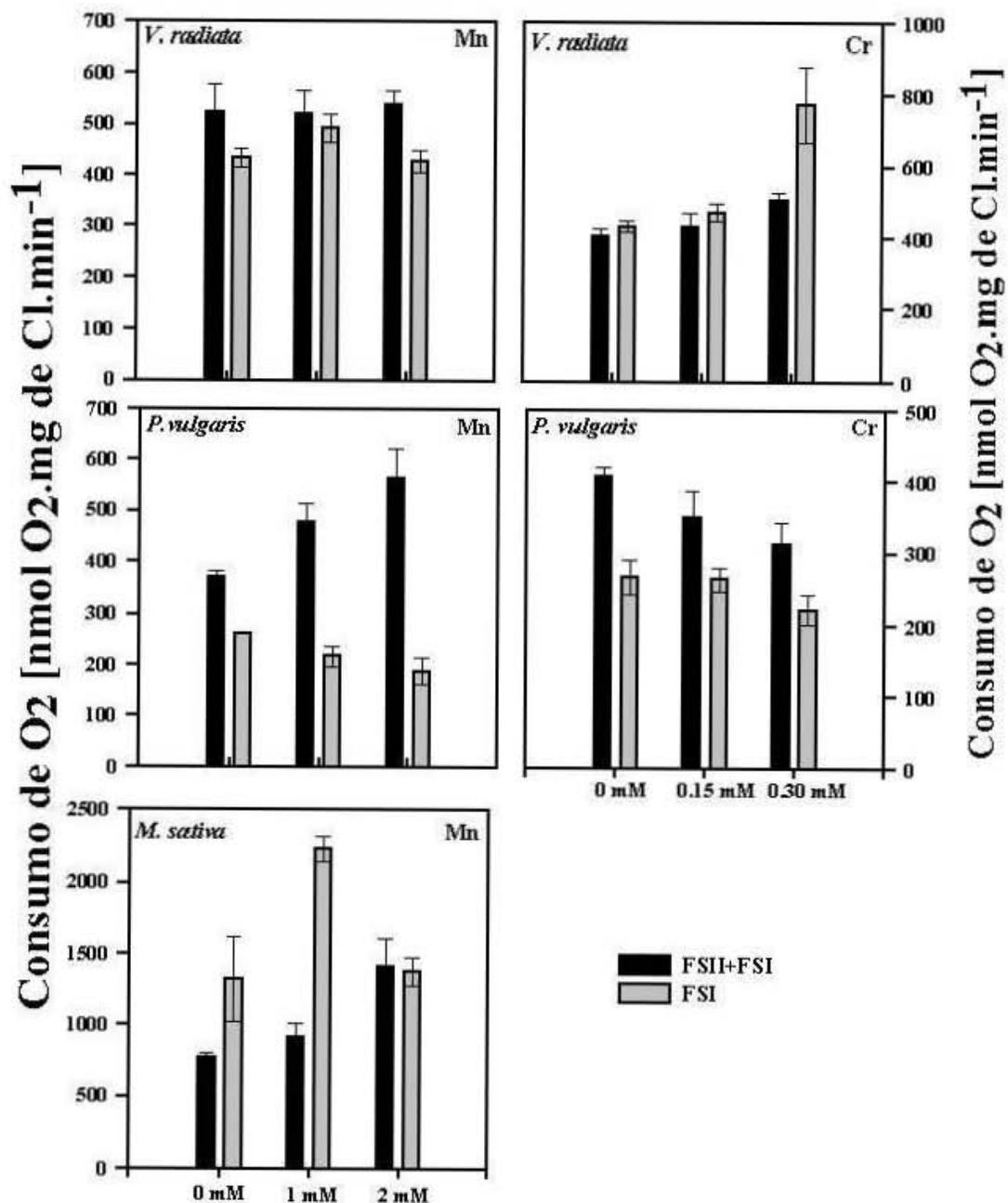


Figura 28: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM y Mn 1 y 2 mM en el transporte de electrones del FSI y de la cadena completa (FSII+FSI) en plantas de *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados son la media y el error estándar de seis repeticiones. En *M. sativa* con Cr no se determinó, ya que el efecto fue inmediato y esto impidió la manipulación de la muestra.

Los datos anteriores confirman lo observado con el análisis JIP realizado en estas dos especies de frijol. Así mismo, el incremento de la actividad del FSI en *V. radiata* pudo ayudar a oxidar los acarreadores de electrones del FSII, y de esta forma evitar la inhibición del transporte de electrones de este fotosistema, además, esto

explica el porque no se incrementó la disipación de energía en forma de calor, (Figura 20). Sin embargo, un aumento en la actividad del FSI puede propiciar la generación de especies reactivas de oxígeno y por tanto desencadenar el estrés oxidativo, lo cual ya ha sido observado en estudios anteriores, (Asada, 1999. Samantary, 2002).

5.4. Cambios en el contenido de osmolitos.

5.4.1. Efectos del Mn en los niveles de prolina.

En la figura 29 se muestran los efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de prolina en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. En ella se puede observar que en *V. radiata* durante los primeros cuatro días de exposición a este metal la concentración de prolina en hojas y tallos de los dos tratamientos se incrementó, sin embargo, en el sexto día, a partir del cual se registró la recuperación del aparato fotosintético, la concentración de este osmolito disminuyó, al grado de que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Este comportamiento también fue registrado en la raíz, salvo que la disminución de este soluto compatible inicia desde el cuarto día de tratamiento.

A diferencia de *V. radiata*, en *M. sativa* no se registró la disminución de la concentración de prolina en hojas, ya que durante todo el tratamiento se incrementó. Lo anterior sugiere que en esta especie vegetal no se llevó a cabo la oxidación de este aminoácido, tal y como lo hacen sugerir los datos obtenidos a partir de *V. radiata*. En lo que respecta a los niveles de prolina en tallo y raíz, en el primer caso, solo en el sexto día se incrementó la concentración, ya que en los días 2 y 4 disminuyó con 1 y 2 mM, respectivamente. En la raíz, en los cuatro primeros días de tratamiento no se registraron cambios significativos, mientras que en el día seis la concentración disminuyó.

En contraparte, en *P. vulgaris* no se registró una clara tendencia a incrementar la concentración de prolina en los tres tejidos (hoja, tallo y raíz), ya que únicamente en el día dos se incrementó 21 % en hoja, mientras que en el día 8 disminuyó en un 50% con 2 mM y se mantuvo sin diferencias en el tratamiento con 1 mM. Así mismo, en la raíz solo en el día 4 con 1 mM se incrementó, y en el sexto con 2 mM disminuyó.

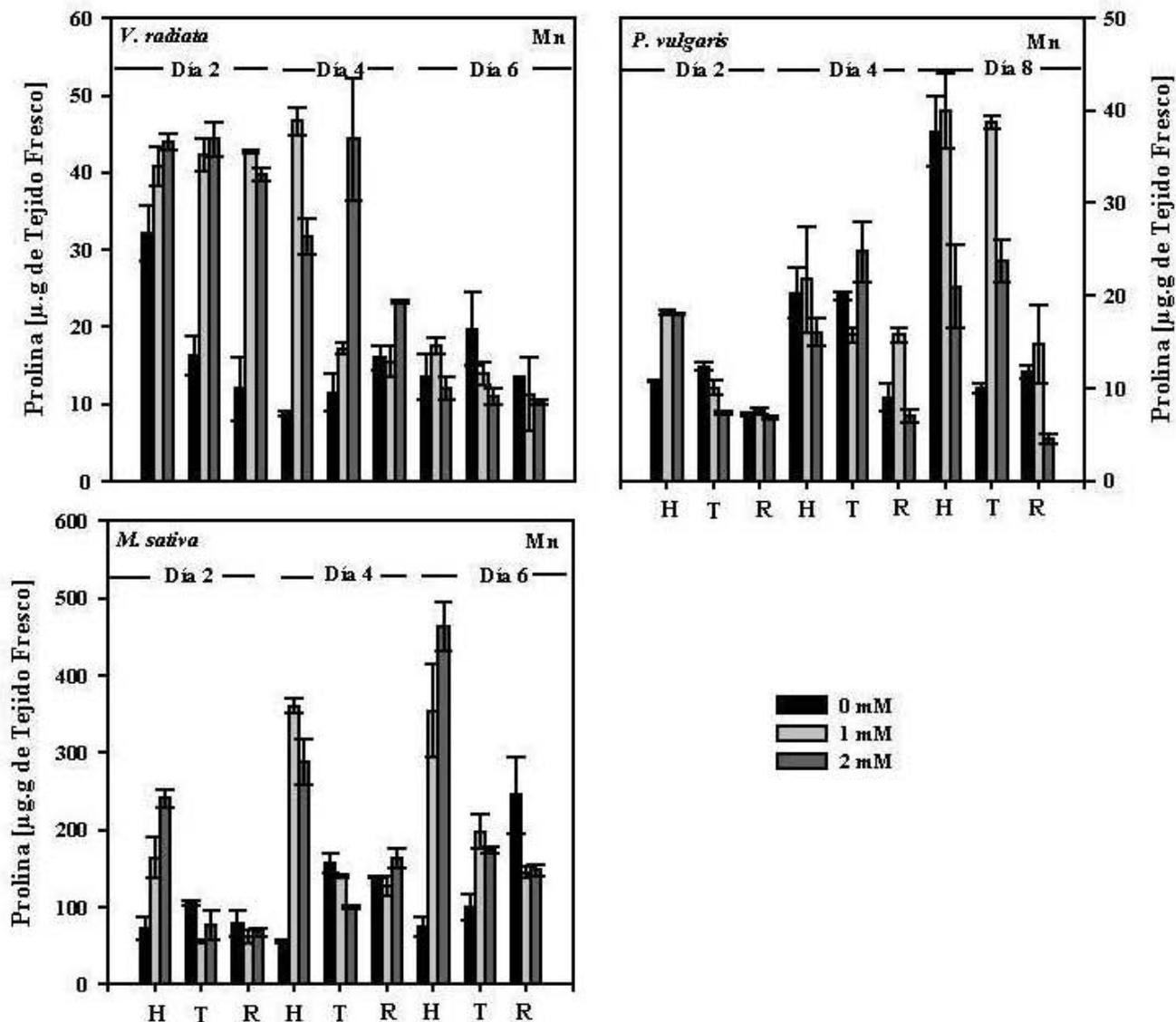


Figura 29.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de prolina en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

5.4.1.2. Aminoácidos libres totales (AALT).

El incremento en la concentración de azúcares solubles, solo fue observado en el día dos de tratamiento en las hojas de *M. sativa* y *P. vulgaris*, sin embargo, en los días consecutivos tendieron a disminuir, (Figura 30). En el tallo de *M. sativa* se registró un efecto inverso al anterior, ya que solo en el sexto día se incrementó la concentración de AALT, mientras que en *P. vulgaris* los niveles de estos solutos disminuyeron durante todo el tratamiento. En lo que respecta a la raíz, en *P. vulgaris* no se registraron cambios significativos, mientras que en *M. sativa*, solo

en el día dos con 2 mM, y en el cuarto con 1 mM se incrementó la concentración de aminoácidos.

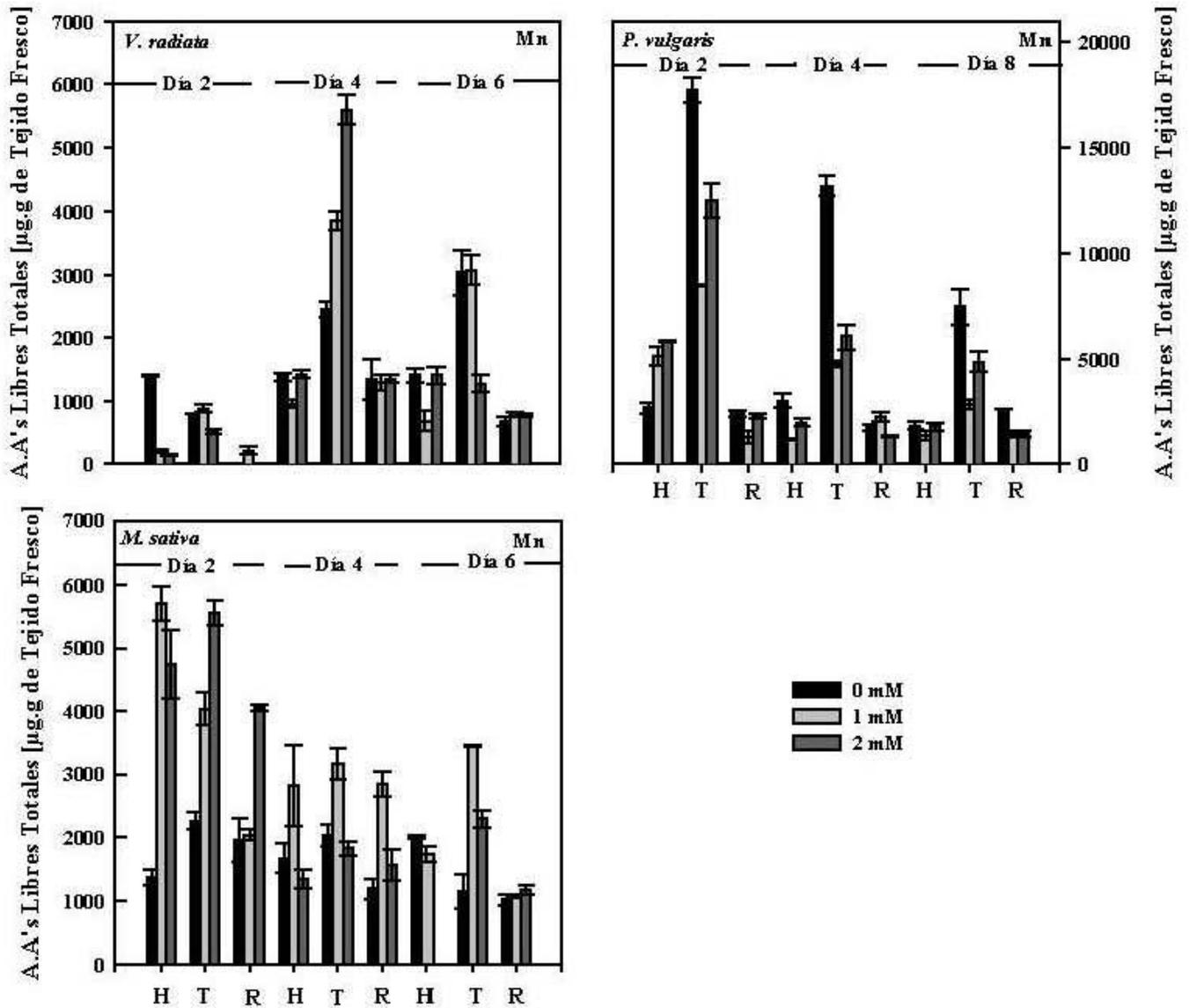


Figura 30.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de Aminoácidos Libres Totales en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

A diferencia de *P. vulgaris* y *M. sativa*, en *V. radiata* se observó que los niveles de AALT en hoja disminuyeron durante todo el tratamiento, mientras que en el tallo, solo en el día cuatro se registró un incremento en ambos tratamientos.

En conjunto, estos datos sugieren que en este caso los aminoácidos libres totales no son los principales solutos que pudieran hacer el ajuste osmótico, ya que se ha reportado que los metales pesados pueden provocar déficit hídrico, (Schat, 1997).

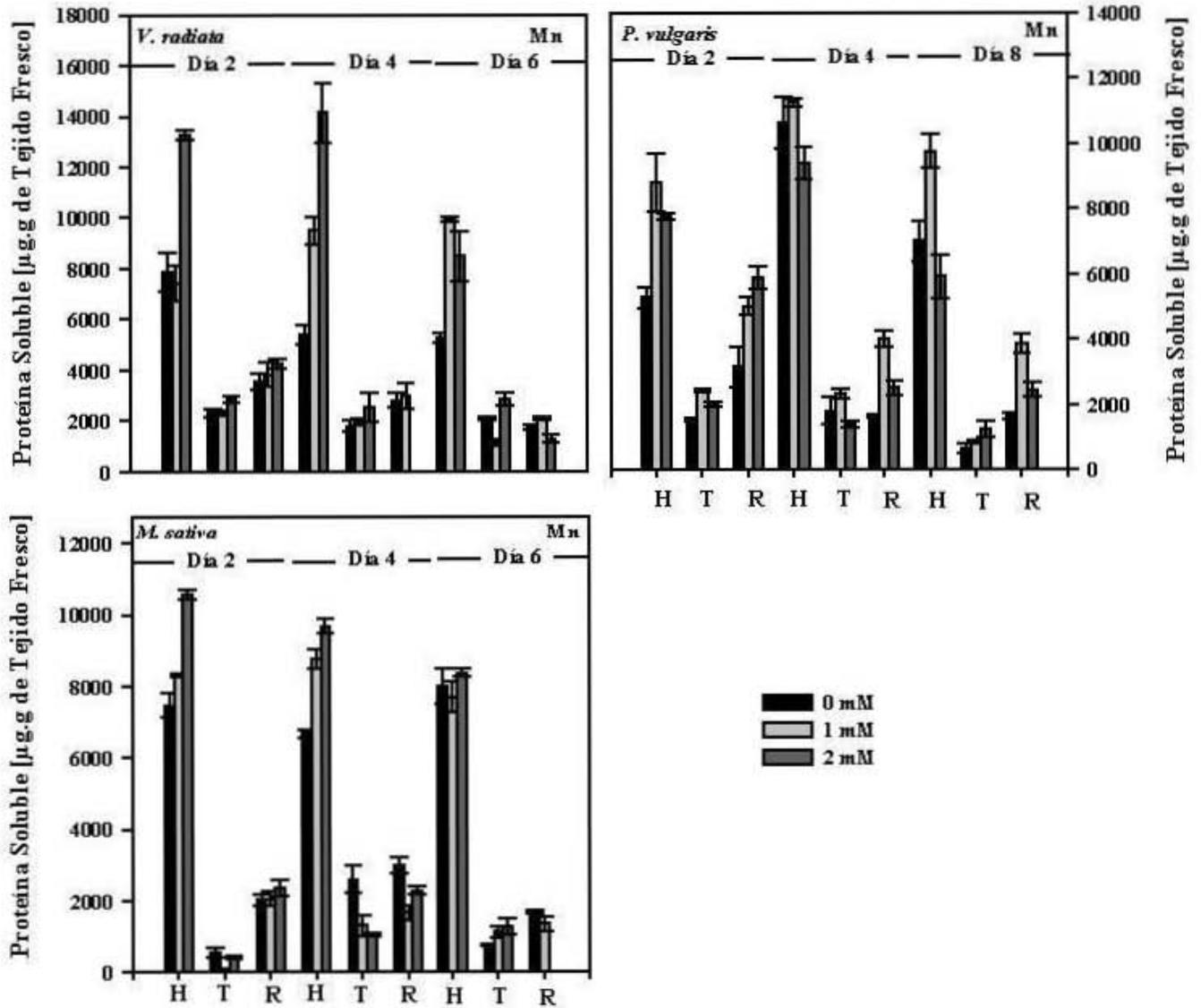


Figura 31.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de Proteína Soluble en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

5.4.1.3. Proteína Soluble.

La concentración de proteína soluble en hojas de *M. sativa* se incrementó durante los primeros cuatro días de tratamiento, lo cual en el cuarto día fue acompañado de la disminución de los niveles de proteína en tallo y raíz; mientras que en el sexto día no se encontraron diferencias significativas en ambos tejidos, (Figura 31).

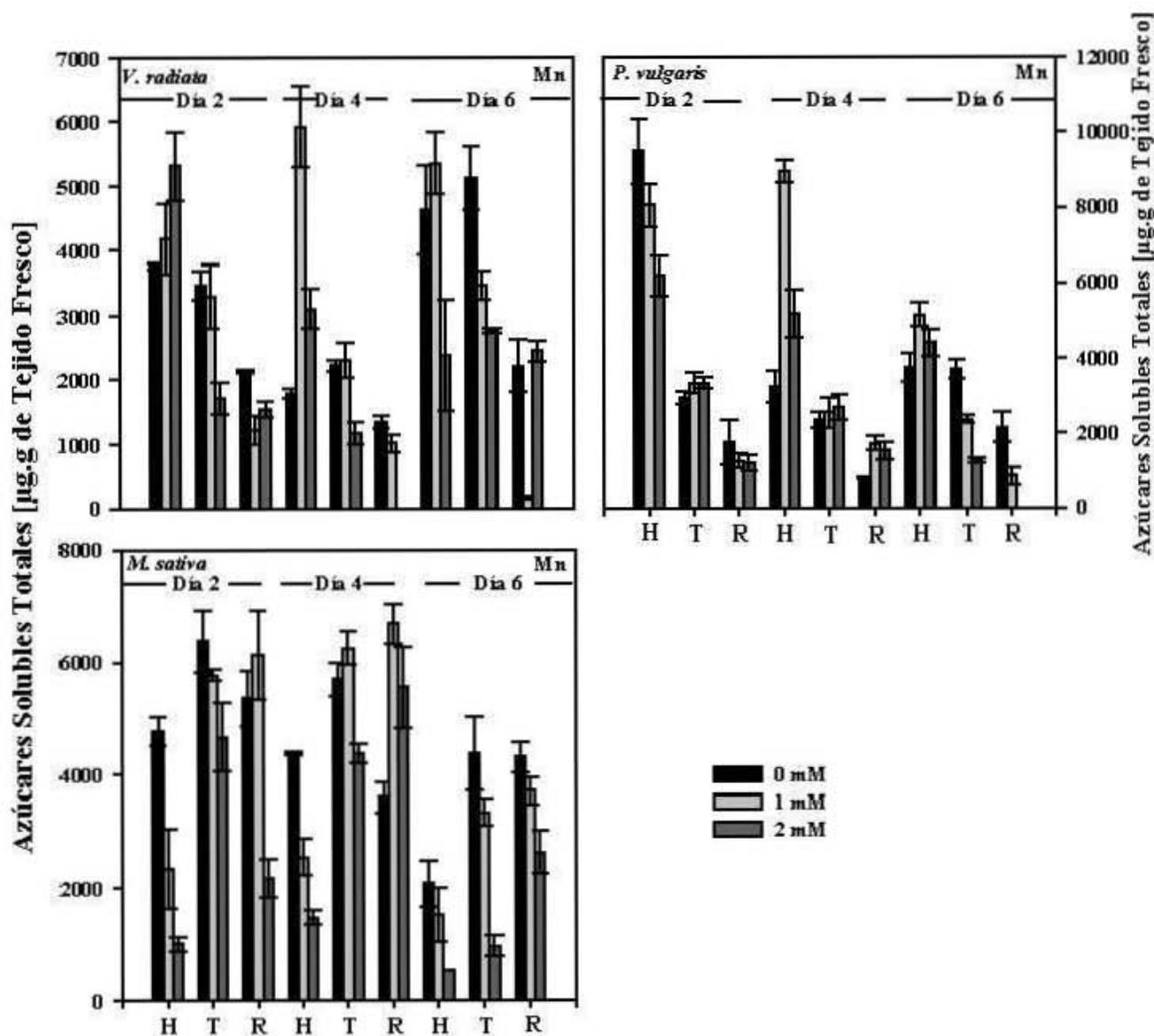


Figura 32.: Efectos del Mn 1 y 2 mM en los niveles de Azúcares Solubles Totales en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

Por su parte, en *V. radiata* desde el día dos con 2 mM y desde el cuarto con 1 mM, la concentración de proteína soluble en hoja se incrementó, y a diferencia de *M. sativa*, en la mayor parte del tiempo de exposición a este metal no hubo diferencias significativas en el tallo y la raíz, salvo en el día seis que hubo una disminución en los niveles de proteínas en los tallos de las plantas con 1 mM.

A diferencia de las dos especies anteriormente analizadas, en *P. vulgaris* durante todo el tratamiento la concentración de proteína en este tejido se incrementó, mientras que en el tallo y hoja, en el primero no se registraron cambios significativos, y en hoja solo en el día dos se incrementó.

5.4.1.4. Azúcares Solubles Totales.

En la figura 32 se puede observar que durante todo el tratamiento, los niveles de azúcares solubles en hojas y tallos de *M. sativa* disminuyeron, caso contrario en *P. vulgaris*, en el cual a partir del cuarto día de tratamiento empezó a incrementar la concentración de estos osmolitos en hoja, mientras que en el tallo solo en el sexto día disminuyeron. A diferencia de lo anterior, en *V. radiata*, solo en los primeros cuatro días los niveles de azúcares se incrementaron, ya que en el sexto día disminuyeron con 2 mM y con 1 mM no existieron diferencias significativas con respecto al control.

5.4.2. Efectos del Cr en los niveles de prolina.

Al igual que los efectos del Mn en los niveles de prolina en *M. sativa* y en *V. radiata*, en los tratamientos con Cr 0.15 y 0.30 mM también se registró el incremento de este osmolito en las hojas y en los tallos, pero con la diferencia de que el incremento en hojas de *M. sativa* fue de 7 a 10 veces más que el control; mientras que en *V. radiata* no se registró la disminución de este soluto como fue el caso con el tratamiento con Mn, (Figura 33). Con respecto a la raíz de *M. sativa*, solo con 0.15 mM se incrementó la concentración durante todo el tratamiento; dicho comportamiento también fue registrado en el día dos en *V. radiata*.

Un efecto similar al observado en *V. radiata* y *M. sativa* fue registrado únicamente en el día tres en *P. vulgaris*, ya que en el segundo día solo el tratamiento con 0.15 mM incrementó la concentración de prolina, mientras que con 0.30 mM no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en los tres tejidos.

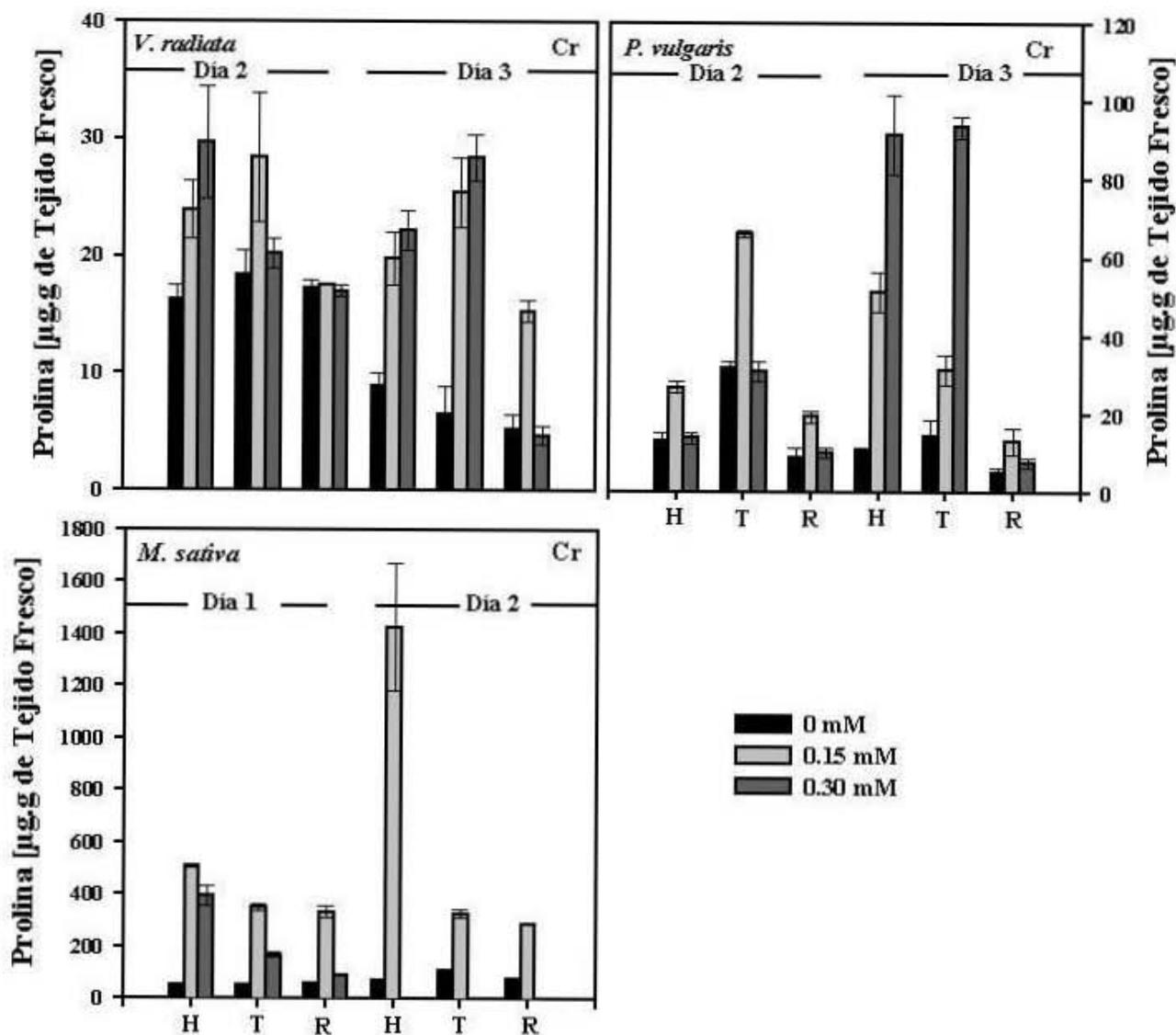


Figura 33.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en los niveles de prolina en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

5.4.2.1. Aminoácidos Libres totales.

En la figura 34 se puede observar que en *V. radiata* en los dos días en los que se determinó los niveles de AALT, solo en los tallos hay una tendencia a incrementar la concentración de estos solutos, ya que a nivel hoja no hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 0.30 mM, mientras que con 0.15 mM la concentración disminuyó. En el caso de la raíz de los dos tratamientos,

en el día dos disminuyó, lo cual solo se mantuvo con 0.15 mM, ya que en el otro tratamiento hubo un incremento con respecto al control y a 0.15 mM.

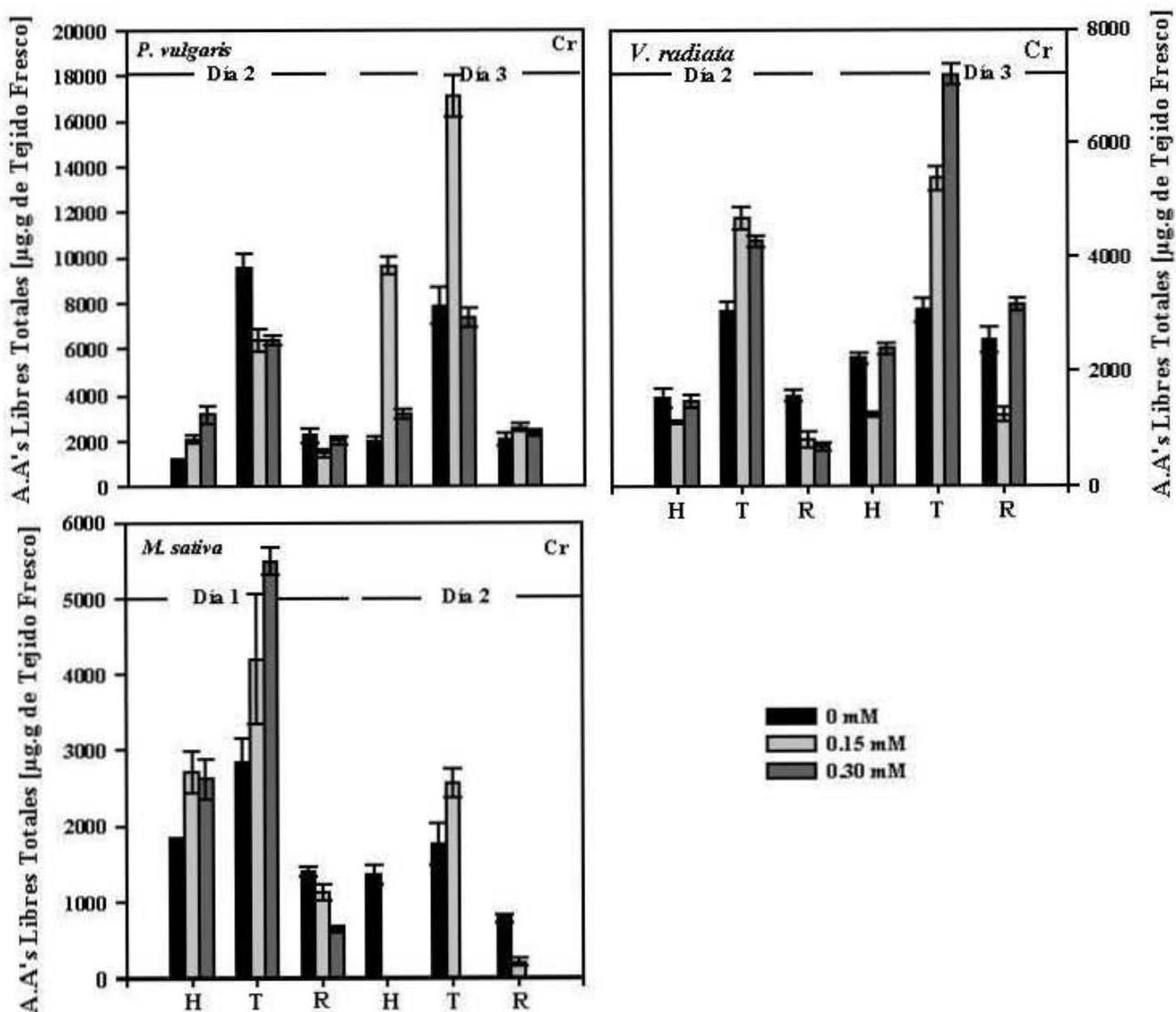


Figura 34.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en los niveles de aminoácidos libres totales en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

A diferencia de *V. radiata*, en *P. vulgaris* los niveles de AALT en hoja de los dos tratamientos se incrementaron, aunque cabe mencionar que con 0.30 mM no hubo diferencia entre la concentración del día dos con respecto a la registrada en el día

tres, ya que con 0.15 mM si hay una clara tendencia a incrementarlos. Así mismo, solo en el tercer día en los tallos con 0.15 mM se incrementó la concentración de estos osmolitos, mientras que en las raíces de los dos tratamientos no hubo diferencias significativas con respecto al control.

Al igual que *P. vulgaris*, en *M. sativa* también en el día 1 se registró el incremento de los AALT en hoja, pero con la diferencia de que este comportamiento también fue registrado en tallo. Aunque en el día 2 no se determinó la concentración en hojas, ya que su aspecto físico dificultó su manipulación, se pudo observar que a pesar de que la concentración en tallo fue mayor que la del control, muestra una clara tendencia a disminuir, ya que del día 1 al 2, la concentración de aminoácidos disminuyó dos veces. Este mismo efecto fue registrado desde el primer día en las raíces.

5.4.2.2. Proteína soluble.

En las tres especies estudiadas, se observó que existe una clara tendencia a incrementar la concentración de proteína soluble en hoja y tallo, (Figura 35). Este efecto, en los tres casos fue acompañado de la disminución de los niveles de proteína en las raíces. Lo anterior hace suponer que hay una translocación de proteína de las raíces hacia las partes aéreas o más proteólisis en este órgano.

5.4.2.3. Azúcares solubles totales.

En la figura 36 se observa que en *V. radiata* hay una tendencia a disminuir la concentración de azúcares solubles en los tres órganos, caso contrario a *P. vulgaris*, quien acumuló azúcares en las hojas, lo cual fue acompañado de la disminución en tallos y raíces. Esto último sugiere que los fotosintatos no son translocados a los tallos y a las raíces, probablemente para proteger a la parte aérea de los efectos del Cr.

A diferencia de las dos especies de frijol, en *M. sativa* se observó que los niveles de azúcares solubles en tallos y raíces del tratamiento con 0.15 mM se incrementaron, lo cual fue acompañado de la disminución de la concentración en hoja. En el caso de las plantas con 0.30 mM en los tres tejidos disminuyó, lo cual puede atribuirse a efectos a nivel fijación de CO₂, mientras que lo observado en las plantas con 0.15 mM, pudo ser una respuesta para absorber más agua, ya

que en este estudio se observó que las hojas pierden turgencia, lo cual hace sugerir que la respuesta a esta concentración de Cr es enviar los fotosintatos a las raíces para que estas tengan energía suficiente para modificar su arquitectura y para incrementar la absorción de agua, (Hare, *et. al.* 1998).

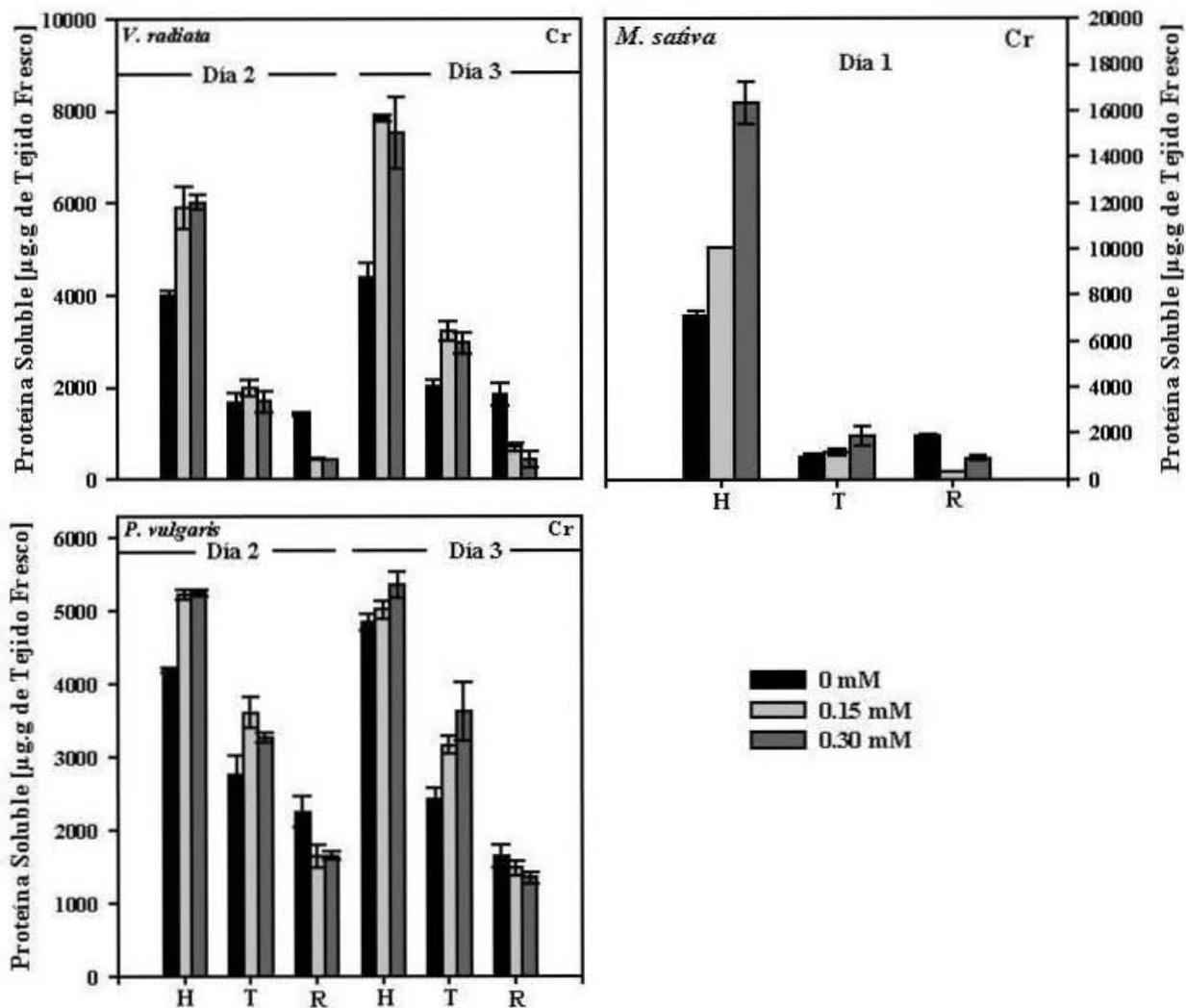


Figura 35.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en los niveles de proteína soluble en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones con muestras independientes. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

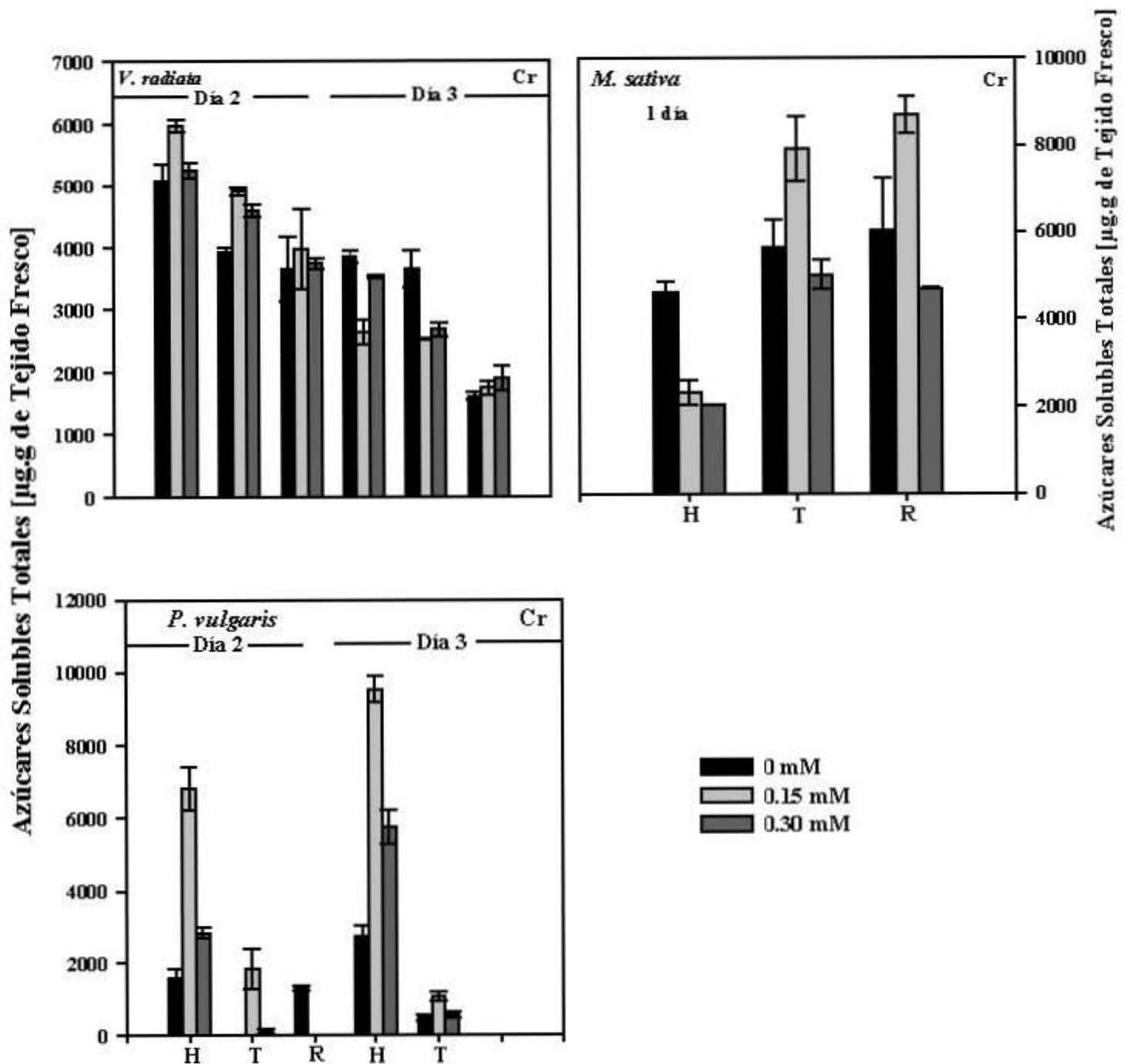


Figura 36.: Efectos del Cr 0.15 y 0.30 mM en los niveles de azúcares solubles totales en *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa*. Los datos graficados representan la media y el error estándar de 3 repeticiones. H) Hoja. T) Tallo. R) Raíz.

5.5.- Distribución del Cr y Mn en los tejidos de las plantas.

En la figura 37 se muestra la acumulación de Mn en las hojas, tallos y raíces de las tres especies estudiadas. En ella se aprecia que en *P. vulgaris* la concentración de este metal en los tres tejidos fue incrementándose conforme aumentaba el tiempo de exposición; así mismo se observó que desde el cuarto día de tratamiento las raíces fueron las que acumularon mayor cantidad de Mn.

A diferencia de lo anterior, en *V. radiata* durante los cuatro primeros días de tratamiento con 1 mM, la concentración de Mn en hojas fue incrementándose, sin

embargo, en el sexto día la cantidad de este metal disminuyó, caso contrario de los tallos y raíces que mostraron una clara tendencia a acumular más Mn conforme aumentó el tiempo de tratamiento. En el caso del tratamiento con 2mM se observó que el tallo tuvo un comportamiento similar al observado en las hojas de las plantas con 1 mM, mientras que la raíz fue la que acumuló más Mn conforme avanzó el tiempo de exposición a este metal.

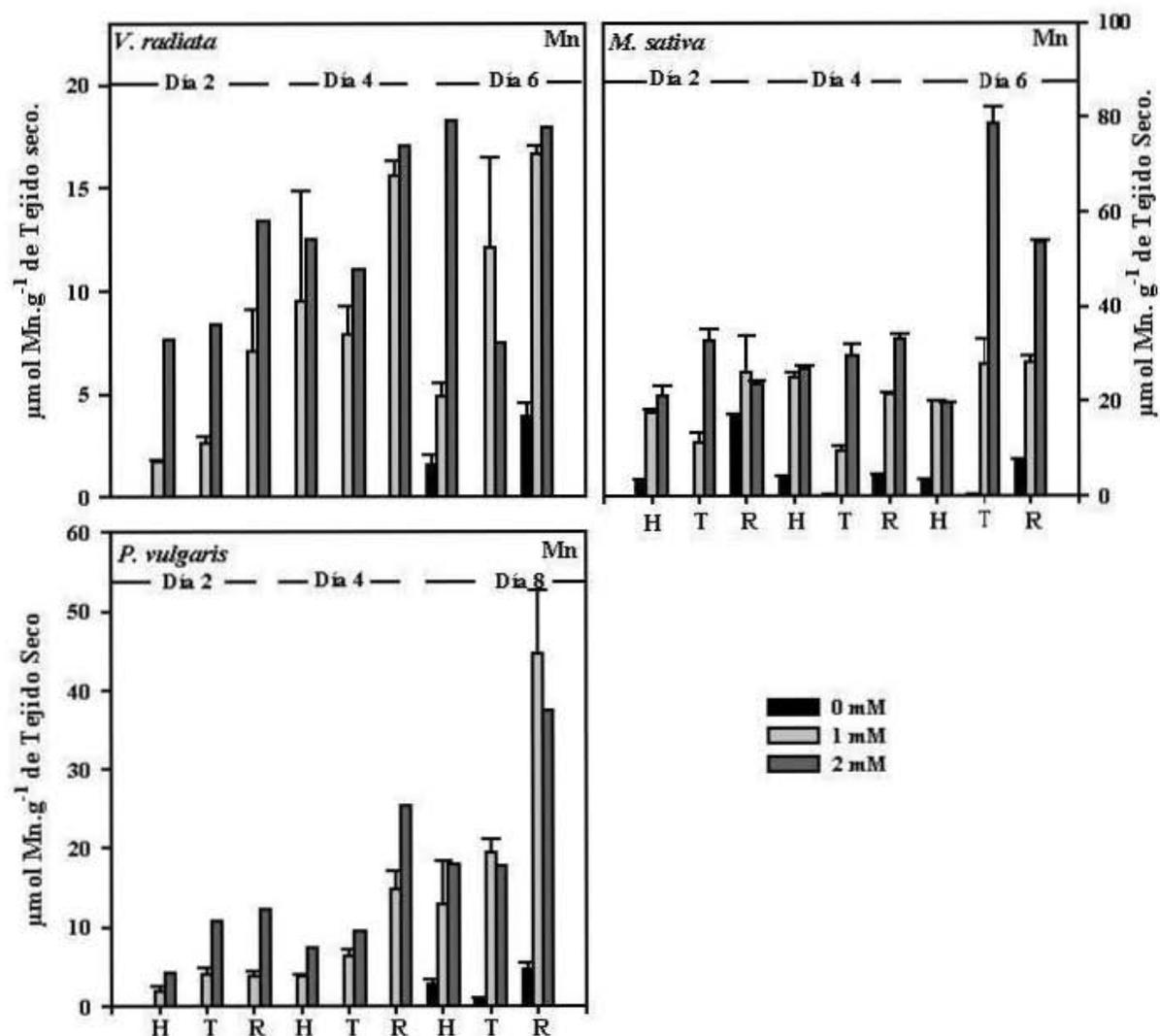


Figura 37: Acumulación de Mn en las hojas, tallos y raíces de *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa* tratadas con Mn 1 y 2 mM. Los datos graficados representan la media y el error estándar de dos repeticiones con muestras independientes.

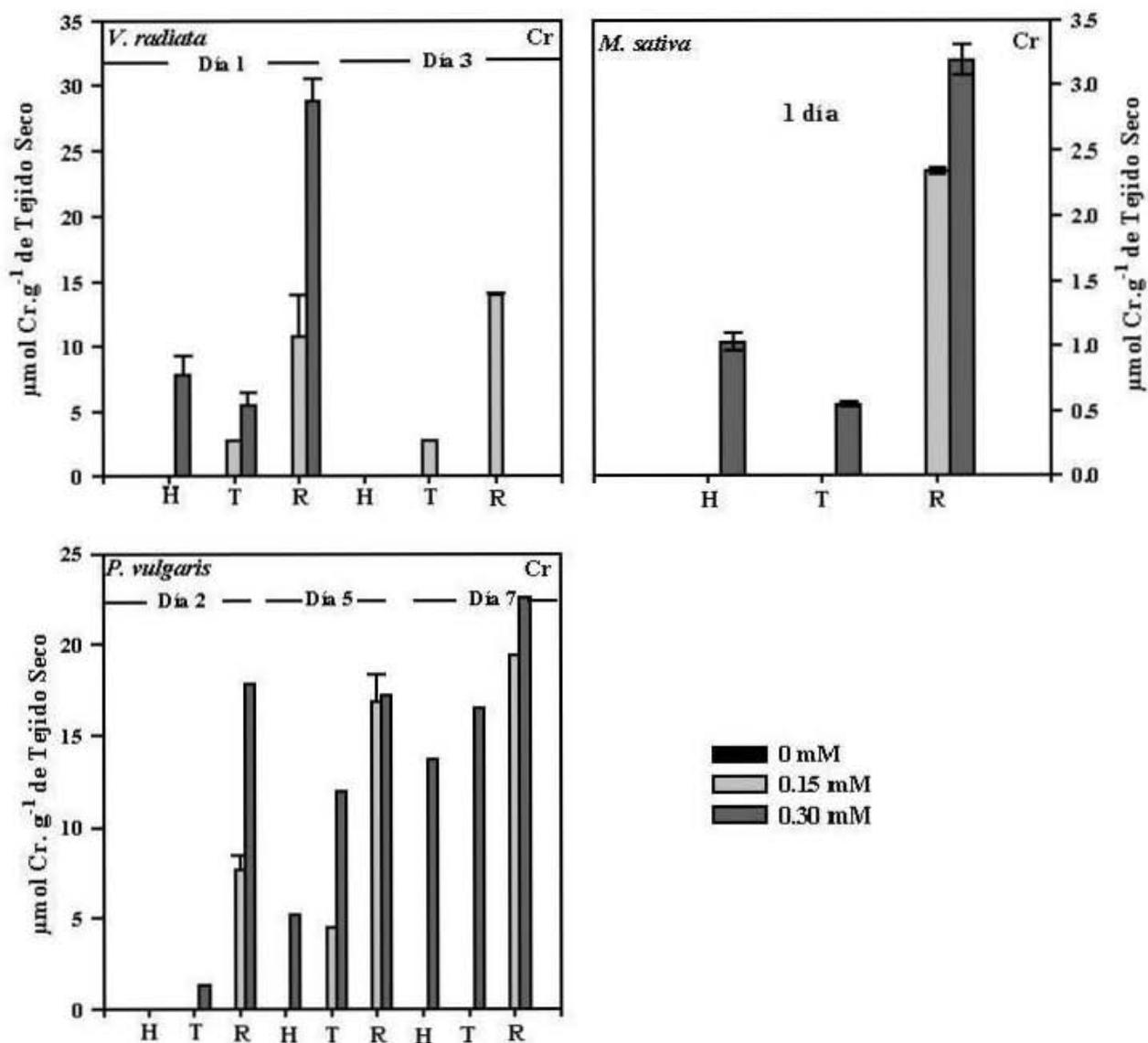


Figura 38: Acumulación de Cr en las hojas, tallos y raíces de *V. radiata*, *P. vulgaris* y *M. sativa* tratadas con Cr 0.15 y 0.30 mM. Los datos graficados representan la media y el error estándar de dos repeticiones con muestras diferentes.

Un efecto similar al observado en las hojas de *V. radiata* fue registrado en *M. sativa*, además, los tallos y raíces tendieron a acumular más Mn conforme aumentó el tiempo de exposición a este metal.

A diferencia de lo observado en los tratamientos con Mn, en las tres especies tratadas con Cr, se observó que las raíces son las que retienen la mayor cantidad de este metal, y solamente en los tratamientos con 0.30 mM se pudo detectar la

acumulación de Cr en las hojas y tallos, mientras con 0.15 mM no se detectó la translocación de este metal a las hojas, (Figura 38).

6.- Discusión.

En este estudio se observó que el Mn generó puntos cafés en las hojas de las dos especies de frijol, mientras que en *M. sativa* provocó clorosis y necrosis. Estos efectos dependieron del tiempo de exposición y de la concentración de este metal. Resultados similares han sido reportados por Wissemeyr y Horst (1987), y Kitao, *et. al.* (1997.), quienes han determinado que los puntos cafés en las hojas son el producto de la acumulación de Mn oxidado en las paredes celulares, y que la intensidad de los mismos depende de la cantidad de Mn acumulado en las hojas. Relacionado con lo anterior, la aparición de los efectos en las tres especies estudiadas coincidió con el día en el que las hojas acumularon más Mn; por lo cual, la severidad y el tipo de efecto visible que provoca el Mn depende de la concentración, del tiempo de exposición a este metal, y de la especie vegetal.

En lo que respecta a la acumulación de Mn en tallos y raíces, se encontró que conforme avanzó el tiempo de exposición, la concentración de Mn se fue incrementando en estos tejidos, (Figura 37). Estos resultados coinciden con lo encontrado en tallos de arroz por Lidon y colaboradores (2004), quienes además mencionan que al incrementar la concentración de Mn en el medio de crecimiento de las plantas, éste tiende a acumularse en los tilacoides e interfiere en su apilamiento y en la eficiencia de la fotoquímica del FSII. Aunque solamente se cuantificó la concentración de Mn en hojas, en las tres especies analizadas pudo darse un comportamiento similar al observado por estos investigadores, ya que la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* mostró que la actividad del FSII es modificada por este metal.

Con respecto a los efectos del Cr, en las tres especies se observó que este metal provocó la disminución del tamaño de las hojas, necrosis, en el caso de *M. sativa*, pérdida de turgencia, y finalmente la muerte de las plantas. Estos efectos ya han sido registrados en otros estudios (Chatterjee y Chatterjee, 2000. Vajpayee, *et. al.* 2000. Samantary, 2002) y pueden ser atribuidos a daños en la actividad fotosintética, (Appenroth, *et. al.* 2001) y en otras rutas metabólicas, (Dixit, *et. al.* 2002), así como a la generación de especies reactivas de oxígeno cuando el Cr VI se oxida a Cr III, ya que Cervantes y colaboradores (2001) mencionan que estas

moléculas pueden interactuar con los fosfatos del ADN, lo cual afecta su replicación, transcripción y traducción. Con base a lo anterior, es posible que se inhiba la síntesis de proteínas importantes para el metabolismo y de aquellas enzimas que participan en la síntesis de hormonas de crecimiento, lo cual puede explicar la disminución en el tamaño de la planta. En el caso de los puntos necróticos, éstos pudieron ser producto del estrés oxidativo, ya que el blanco principal de las especies reactivas de oxígeno son los fosfolípidos de membrana y aunado a esto, se ha reportado que este metal afecta la actividad de algunas enzimas de la maquinaria antioxidativa (Samantary, 2002). Por otro lado, la pérdida de turgencia de las hojas de *M. sativa* pudo deberse a que gran parte del Cr tiende a acumularse en las raíces, tal y como se muestra en la figura 38 y según lo reportado por Rai, *et. al.* 2004. Lo anterior pudo afectar y/o alterar la arquitectura y fisiología de las raíces, disminuyendo de esta forma el transporte de agua y nutrientes, por lo que este comportamiento se puede asemejar a los efectos que genera el déficit hídrico (Hare, *et. al.* 1998), y en relación a esto, se ha reportado que el Cr disminuye la transpiración y el Ψ_w de plantas de calabaza, (Pandey, *et. al.* 2003)

Como ya se mencionó anteriormente, el Cr tiende a acumularse en las raíces, lo cual ha sido atribuido al complejo que forma el Cr III con grupos $-\text{COOH}$, que impide que este metal se transloque más allá de este tejido. (Rai, *et. al.* 2004), por lo que se supone que esto fue la principal causa por la cual las raíces acumulan más Cr que los tallos y las hojas.

Por otro lado, está ampliamente documentado que la síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA) es el primer paso para la biosíntesis de grupos tetrapirrol que conducen a la formación de grupos hemo, clorofilas, vitamina b, y otros productos especializados (Matile, *et. al.* 1999). Sin embargo, se ha sugerido que la biosíntesis de clorofilas también puede ser regulada por la actividad de la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD), (Vajpayee, *et. al.* 2000). Así mismo, se ha observado que los metales pesados afectan la actividad de las enzimas ALA sintetasa y ALAD, lo que provoca que la síntesis de clorofilas disminuya (Öncel, *et. al.* 2000. Pandey, *et. al.* 2003. Vajpayee, *et. al.* 2004). Considerando lo anterior,

la disminución en la concentración de clorofilas observada en este estudio, pudo deberse a que el Cr y el Mn afectan la actividad de las enzimas que participan en la síntesis de clorofilas.

Se ha reportado que el Mn no afecta la liberación de oxígeno (Nable, *et. al.* 1988. Kitao, *et. al.* 1997), y que el Cr daña al CEO (Appenroth, *et. al.* 2001. Mallick, *et. al.* 2003). En este estudio se corroboraron estas observaciones, aunque sería la primera vez que se reporta un ciclo de activación e inactivación del CEO en especies que pueden adaptar su FSII, como *V. radiata*, al estrés por Mn, así como un incremento en la liberación de oxígeno y en la cantidad de CEO activos por Mn en *P. vulgaris* y por Cr en las dos especies de frijol. En el caso del efecto de este último en *V. radiata* y *P. vulgaris*, fue para mantener el incremento del transporte de electrones que fue registrado en este estudio, aunado a que el aumento de la actividad del FSI en *V. radiata* pudo haber contribuido a dicho comportamiento. Además, se puede asegurar que el daño que provoca el Cr al CEO depende de la especie y del tiempo de exposición a este metal, ya que, a diferencia de otros estudios, se dio un seguimiento periódico a los efectos del Cr.

Referente a los efectos del Mn en la fotosíntesis, está reportado que afecta la fotosíntesis neta debido a la disminución de la actividad carboxilasa de la Rubisco y a la concomitante inhibición en la regeneración de RuBP (Nable, *et. al.* 1988. Houtz, *et. al.* 1988. Kepova, *et. al.* 2004). Sin embargo, hay quien propone que este no es el efecto principal del Mn, sino que afecta la estructura del cloroplasto y la anatomía de la planta (González, *et. al.* 1997. Lidon, 2002).

Pese a lo anterior, Lidon y colaboradores (2004) mencionan que la estructura del cloroplasto no es dañada, esto de acuerdo a la concentración de ácidos grasos y fosfolípidos de membrana de cloroplasto que ellos determinaron; además, Kitao, *et. al.* 1997, menciona que este metal disminuye la captación de energía de excitación, al parámetro Q_P y la eficiencia cuántica del FSII ($\Delta F/F'm$), y que sin embargo, F_v/F_m no disminuye. Estos cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* fueron atribuidos al desequilibrio que existe entre la actividad de la fijación del CO_2 y la cantidad de energía lumínica que es captada y utilizada en la fotoquímica, lo cual causa el incremento de QA^- y el aumento de los centros de reacción inactivos,

que es reflejado en la disminución de Q_p , así mismo, ellos no descartan la posibilidad de que el Mn provoque fotoinhibición, ya que también encontraron que se incrementa la disipación de energía en forma de calor.

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan lo encontrado por Kitao, *et. al.* 1997, ya que la emisión de fluorescencia de las especies estudiadas es modificada por el Mn. Sin embargo, los efectos de este metal dependieron de la especie, y a diferencia de estos investigadores, en este estudio si se registró la disminución de F_v/F_m en *P. vulgaris* y *M. sativa* tratadas con 2 mM, lo cual fue atribuido a la disminución del transporte de electrones por el decremento de $\log \Psi_o$, $\log \phi_{EO}$ y de Q_p , (este último solo se registró en el día 9 en alfalfa), así como en la interacción de las clorofilas del complejo antena ($\log ABS/CS$) con los centros de reacción ($\log RC/CS$), lo cual no había sido reportado hasta el momento.

Además, se observó que la oxidación de QA^- debido al transporte de electrones hacia $NADP^+$ (Q_P) de *V. radiata* es más eficiente a la registrada en *M. sativa* y *P. vulgaris*. Este resultado coincide con lo reportado por Lidon y colaboradores (2004), quienes también encontraron que el parámetro Q_{NP} de plantas de arroz tratadas con 0.5, 2, 5 y 32 $mg. L^{-1}$ de Mn disminuye, y según ellos, fue porque no es necesario que disipen energía en forma de calor, ya que la energía lumínica captada por el complejo antena es utilizada en su mayoría en las reacciones fotoquímicas. Este resultado confirma lo sugerido en este estudio para *V. radiata*. De igual forma, se ha reportado que para que Q_{NP} se forme y/o incremente es necesario que exista un ΔpH a través de la membrana tilacoidal para que se pueda llevar a cabo el ciclo de las violaxantinas, (D'Haese, *et. al.* 2004). Relacionado a esto, Lidon, *et. al.* 2004, menciona que la concentración de anteraxantinas y zeaxantinas, así como el parámetro q_E (relacionado con la formación del ΔpH) disminuye con una concentración de 8 $mg. L^{-1}$ de Mn. Considerando estos datos y el hecho de que se aplicaron concentraciones mayores de Mn (1 y 2 mM), se confirma que la disminución de Q_{NP} en *M. sativa*, fue debido a que en ellas había un ΔpH pequeño que impidió que se llevara a cabo el ciclo de las violaxantinas, esto implica que estas plantas pudieron ser

propensas al estrés oxidativo, ya que también se encontró que la actividad del FSI se incrementó, lo que pudo haber favorecido la formación de especies reactivas de oxígeno, (Asada, 1999).

Appenroth, *et. al.* 2001, y Malick, *et. al.* 2003, reportaron que el Cr hace que Fo y Q_{NP} se incrementen, mientras que Fm, Q_P y Fv/Fm disminuyan, indicando que la transferencia de electrones es disminuida debido al incremento en los centros de reacción inactivos y en la disipación de energía en forma de calor. Lo observado en este estudio en Fo, Fm y Fv/Fm coincide a lo reportado por estos autores, por lo que queda demostrado que el Cr disminuye el transporte de electrones en *M. sativa* y *P. vulgaris*, siendo más severo en el primer caso; mientras que en *V. radiata* se observó todo lo contrario, ya que el transporte de electrones se incrementó, lo cual no puede considerarse como un efecto benéfico en esta especie, ya que está ampliamente documentado que tanto el acarreo electrónico del FSII y del FSI, en condiciones normales, favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (Bowler, *et. al.* 1992), entonces al aumentar su actividad, es probable que se incremente este fenómeno. Además, se ha reportado que este metal, al desacoplar el transporte de electrones mitocondrial, hace que se incremente la concentración de especies reactivas de oxígeno (Dixit, *et. al.* 2002), por lo que pudo haberse dado un efecto similar a nivel del cloroplasto.

Con la cinéticas de emisión polifásica de fluorescencia, con los parámetros Log Ψ_o , Log ϕ_{EO} , DF y sus componentes, se demostró que en *M. sativa* y *P. vulgaris*, el Mn si afecta las reacciones fotoquímicas y fototermales, ya que impide que QA^- se oxide y se transporten los electrones hacia QB y PQH. Lo anterior solo fue observado en los primeros cuatro días de tratamiento en *V. radiata*, ya que a partir del sexto día, esta especie empieza a adaptar su aparato fotosintético, tal y como se observó en los parámetros Log Ψ_o , Log ϕ_{EO} y DF junto con los componentes de éste, así como en el ciclo de activación e inactivación de los centros de reacción y del CEO. Relacionado a esto último, Bueno, *et. al.* 2004, y van Heerden, *et. al.* 2003, reportaron comportamientos similares en plantas de soya estresadas por congelamiento nocturno, y en la cianobacteria *Anabaena* tratada con diferentes concentraciones del pesticida Lindano. Además, De Ronde,

et. al. 2004, menciona que el apagado de centros de reacción no necesariamente es un proceso dañino, sino que es un mecanismo fotoprotector. Considerando lo anterior, la recuperación en las proporciones de flujo de energía, la activación e inactivación de centros de reacción y del CEO, puede ser característico en organismos que pueden adaptar su aparato fotosintético a los efectos de los diferentes tipos de estrés abiótico.

van Heerden y colaboradores (2003) mencionan que los genotipos de soya sensibles al congelamiento nocturno tiende a incrementar el tamaño del complejo antena, y a la vez aumentar la cantidad de centros de reacción inactivos. En el presente trabajo se encontró un comportamiento similar en *M. sativa* y en *P. vulgaris*, ya que al incrementarse el parámetro Log ABS/CS, el parámetro Log RC/CS disminuye, por lo que esto confirma lo propuesto acerca de la disminución en la interacción de las clorofilas del complejo antena con los centros de reacción.

A pesar de que se ha reportado que el Cr disminuye el transporte de electrones por la disminución de Log ϕ_{E_0} , en las reacciones fotoquímicas (Log $\phi_{P_0}/(1-\phi_{P_0})$), en las reacciones fototermales (Log $\Psi_0/(1-\Psi_0)$), y por la inhibición del CEO ($[1-(V_K/V_J)]_{Cr}/[1-(V_K/V_J)]_{Control}$), (Appenroth, *et. al.* 2001. Malick, *et. al.* 2003). Salvo en *M. sativa*, que fue la más sensible a este metal, en las dos especies de frijol no se encontraron efectos considerables en estos parámetros, e inclusive se observó que el comportamiento del FSII, monitoreado con el parámetro DF, se mantiene por encima del control, sin embargo, se insiste que este comportamiento es dañino a estas plantas, lo cual queda constatado en los efectos visibles observados.

Por otro lado, la mayoría de las plantas para aminorar los efectos del estrés abiótico, pueden sintetizar fitoquelatinas; empaquetar en la vacuola, aparato de golgi y en retículo endoplásmico distintos iones, y acumular solutos compatibles, entre otros mecanismos de detoxificación (Hirschi, *et. al.* 2000. Wu, *et. al.* 2002. Hall, 2002). En el caso de los osmolitos, está ampliamente documentado que la acumulación de prolina es una respuesta característica, sin embargo, aún existen disputas acerca del papel fisiológico que desempeña, comparado con otros solutos que se sabe que pueden servir como osmorreguladores y/o

osmoprotectores (Alia y Pardha, 1993. Hare, *et. al.* 1999. Hoekstra, *et. al.* 2001. Allakhverdiev, *et. al.* 2003)

Recientemente, se ha sugerido que una planta en estrés que acumula más prolina que en condiciones normales, no necesariamente puede considerarse como tolerante a un determinado tipo de estrés, ya que lo ideal es que exista un ciclo de oxidación y síntesis de este aminoácido, lo cual puede evitar el desequilibrio redox en las membranas al disminuir el consumo de NADPH y de esta forma disminuir la probabilidad de estrés oxidativo, (Hare, *et. al.* 1998). En relación a lo anterior, de Ronde y colaboradores (2004) reportaron que plantas que sobreexpresan la actividad de la $\Delta 1$ - pirrolin-5- carboxilato sintetasa, después de someterlas a estrés térmico y por sequía disminuyen la concentración de prolina acumulada durante el estrés, lo que indica que la prolina es oxidada, y a la vez puede servir como donador alternativo de electrones en el FSII, ya que estos tipos de estrés dañan al CEO.

En el presente estudio, se observó que durante todo el tratamiento con Cr se estimula la acumulación de prolina en las tres especies, mientras que con Mn, este comportamiento solo se observó en *M. sativa* y *V. radiata*, ya que en *P. vulgaris* no hay una clara tendencia a incrementarla. Los resultados obtenidos de los tratamientos con Cr y de *M. sativa* con Mn, coinciden con lo reportado en previos estudios, (Sharma, *et. al.* 1998. Mohan y Hoseti, 1997. Chen, *et. al.* 2004). Sin embargo, en *V. radiata* tratada con Mn, se observó que conforme avanzaba el tiempo de exposición, la concentración de prolina en hoja fue disminuyendo, al grado de que en el sexto día no hubo diferencias significativas con respecto al control (Figura 29). Lo registrado en *M. sativa* y *V. radiata* con Mn, hace sugerir que en el primer caso la actividad de la prolina deshidrogenasa (PDH) y la permeabilidad de la membrana son afectadas por este metal, (Chakravarty y Srivastava, 1997), mientras que en *V. radiata*, cabría la posibilidad de que la disminución de prolina sea un mecanismo adaptativo al estrés por Mn, ya que este efecto coincide con el día en el que el aparato fotosintético empieza a adaptarse a este tipo de estrés. En lo que respecta al efecto del Cr en los niveles de este

osmolito puede ser una respuesta al desequilibrio osmótico, ya que anteriormente se discutió que este metal puede provocar déficit hídrico.

Por otro lado, se ha reportado que algunos metales pesados, como el Cd y Pb, e inclusive el Cr, disminuyen la concentración de proteína soluble, (Mohan y Hoseti, 1997. Sinha, *et. al.* 2004). Sin embargo, en este estudio se encontró que tanto en el tratamiento con Cr y Mn, los niveles de proteína se incrementan en las tres especies, lo cual ya ha sido reportado por Chakravarty y Srivastava (1997). Relacionado a este efecto, se ha observado que las plantas que están sometidas a distintos tipos de estrés abiótico, tienden a acumular proteínas, y se ha sugerido que son una fuente de nitrógeno cuando entran en una fase de recuperación, pero también pueden desempeñar algún papel en el ajuste osmótico, (Ashraf y Harris 2004). Considerando lo anterior, la probable función que tendría la acumulación de proteína soluble, es la de ajustar el desequilibrio osmótico, y servir como fuente de nitrógeno.

A pesar de que el estrés por salinidad, sequía, altas temperaturas, entre otros, provoca la acumulación de azúcares solubles y aminoácidos libres totales, (Irigoyen, *et. al.* 1997. Djilianov, *et. al.* 1997), en el caso de los metales pesados, se ha observado que disminuye la concentración de azúcares solubles, ya que los metales pueden afectar la oxidación de los mismos, o alterar la fijación del CO₂, (Mohan y Hosetti, 1997). Este efecto también fue registrado en el presente estudio en las tres especies tratadas con Mn, por lo que es probable que la disminución en la concentración de azúcares se deba al decremento en la fijación de CO₂, puesto que recientemente se reportó que el Mn afecta la actividad carboxilasa de la Rubisco y de la Rubisco activasa, (Kepova, *et. al.* 2004).

A diferencia de lo observado en los tratamientos con Mn, en las tres especies tratadas con Cr hay una tendencia a acumular aminoácidos libres en cualquiera de los tejidos vegetales (hoja, tallo y raíz), lo cual concuerda a lo observado en plantas sometidas a sequía y salinidad, (Hare, *et. al.* 1998. Ashraf y Harris, 2004). Sin embargo, solo en *P. vulgaris* y *M. sativa* tratadas con Cr, se registró el aumento de aminoácidos libres totales. Acorde a lo anterior, la acumulación de estos solutos pudo ser una respuesta para el ajuste osmótico. Así mismo, solo en

P. vulgaris se registró el incremento de azúcares en hoja, mientras que en *M. sativa* solo se observó en la raíz y en la hoja. Resultados similares a los de *P. vulgaris* fueron reportados por Alaoui, *et. al.* 2004, y ellos atribuyen este efecto a la disminución en la fotosíntesis y en el transporte de azúcares vía floema hacía los tallos y raíces, por lo que no se descarta que este efecto haya pasado en las tres especies estudiadas.

7.- Conclusiones.

Los resultados obtenidos y el análisis de los mismos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- Los efectos del Mn y del Cr dependen de la concentración, del tiempo de exposición y de la especie vegetal.
- El grado de tolerancia y/o adaptación al estrés por Mn fue: *V. radiata* > *P. vulgaris* > *M. sativa*.
- El Mn en especies sensibles provoca un incremento en el contenido de QA⁻, disminución en la interacción de las clorofilas del complejo antena y los centros de reacción; en una exposición prolongada inhibe el CEO, y todos estos efectos conllevan a la disminución del transporte de electrones.

Debido a que *M. sativa* no incrementó considerablemente la disipación de energía en forma de calor, esta especie puede ser propensa a daños por estrés oxidativo, por lo que en futuros estudios cabría la posibilidad de analizar la actividad de las enzimas de la maquinaria antioxidativa.

- *V. radiata* para hacer frente al estrés por Mn disminuyó el tamaño del complejo antena; activó e inactivó durante todo el tiempo de tratamiento sus CR y el CEO, lo cual permitió aprovechar al máximo la energía lumínica y de esta forma evitar un incremento en la disipación de energía en forma de calor que se hubiese traducido en una disminución en el transporte de electrones.
- El Cr estimuló el transporte de electrones en las dos especies de frijol, lo cual pudo favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno y desencadenar el estrés oxidativo.
- La sensibilidad de las especies estudiadas al Cr fue: *V. radiata* > *P. vulgaris* > *M. sativa*.
- Solo en *V. radiata* tratada con Mn, se observó la oxidación y re-síntesis de prolina que pudo evitar el desequilibrio redox en el cloroplasto y ayudar de esta forma a adaptar el FSII al estrés por Mn.
- En las tres especies tratadas con Cr se registró el incremento de prolina, sugiriendo un papel osmoregulador de este soluto compatible.

8.- Perspectivas.

- Cuantificar los niveles de depoxidación de las violaxantinas, así como, determinar el ΔpH , para poder determinar cual fue la causa principal por la que Q_{NP} disminuye en especies sensibles a Mn.
- Hacer estudios de porimetría (transpiración, Ψ_w , conductancia estomática) para determinar si los efectos que provocó el Cr fue debido a un déficit hídrico que propicio un ambiente desfavorable para todos los complejos proteicos, incluido el FSII.
- Analizar la actividad de las enzimas de la maquinaria antioxidativa para comprobar que las plantas de *M. sativa* tratadas con Mn y las dos especies de frijol tratadas con Cr estuvieron bajo estrés oxidativo.
- Exponer las plantas de *V. radiata* a un tiempo prolongado a altas concentraciones de Mn, y extrapolar el experimento a nivel invernadero, para comprobar que esta especie es tolerante al estrés por Mn, y si este fuera el caso, hacer estudios moleculares para identificar los posibles genes que estén involucrados en la tolerancia y/o resistencia a la toxicidad por Mn, para modificar genéticamente plantas de interés comercial.

9.- Referencias Bibliográficas.

- Alaoui, S. B. Genet, P. Vinit, D. F. Toussaint, M. L. Epron, D. Badot, P. M. 2004. Effects of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in iron contents. **166**. 1213-1218.
- Alia. Saradhi, P.P. Mohanty, P. 1991. Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. Biochemical and Biophysical Research Communication. **181 (3)**. 1238-1244.
- Alia and Saradhi, P. P. 1993. Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress induced proline accumulation. Biochemical and Biophysical Research Communications. **193 (1)** 54-58.
- Allakhverdiev, S. I. Hayashi, H. Nishiyama, Y. Ivanov, A. G. Aliev, J. A. Klimov. V. Murata, N. Carpentier, R. 2003. Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb 559 complex of photosystem II against photo – induced and heat – induced inactivation. J. Plant physiology. **160**. 41 – 49.
- Appenroth, K. J. Stöckel, J. Srivastava, A. Strasser, R. J. 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence. Environmental Pollution. **115**. 49-64.
- Asada, K. 1999. The water- water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. An. Rev. of Plant Physiol. And Plant. Mol. **50**. 601-639.
- Ashraf, M. Harris, P. J. C. 2004. Potential biochemical indicator of salinity tolerance in plants. Plant Science. **166**. 3-16.
- Bassi,R. Sharma, S. S. 1993. Changes in proline content accompanying the uptake of zinc or copper by *Lemna minor*. Annal of Botany. **72**. 151-154.
- Bates, L. S. Waldren. R. P. Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and soil. **39**. 205-207.

- Bölhar-Nordenkampff, H.R. Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research- In photosynthesis and Production in a Changing Environment: A field and laboratory Manual (D.O.Hall, J.M.D. Scurlock, H.R. Bolhar – Nordenkampff, R.C. Leegood and S.P. Long, eds), pp 193 –206. Chapman and Hall, London. ISBN 0-412-42900-4.
- Bowler, C. Van Montagu, M. Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant. Mol. Biol.* **43**. 83-116.
- Bueno, M. Fillat, M. F. Strasser, R. J. Rodríguez, R. M. Nerea, M. Smienk, H. Gómez, M. C. Barja, F. 2004. Effects of lindane on the photosynthesis apparatus of the cyanobacteria *Anabaena*. Fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin- NAD⁺ reductase. *Environ Sci & Pollut Res.* **11(2)**. 98-106.
- Cervantes, C. Campos, G. J. Devars, S. Gutiérrez, C. F. Loza, T.H. Torres, G. J. C. Moreno, S. R. 2001. Interaction of chromium with microorganisms and plants. *FEM Microbiology Reviews.* **25**. 335-347.
- Chakravarty, B. Srivastava, S. 1997. Effects of genotype and explant during *in vitro* response to cadmium stress and variation in protein and proline contents in linseed. *Annals of Botany.* **79**. 487-491.
- Chatterjee, J. Chatterjee, C. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution.* **109**. 69-74.
- Chen, Ch. T. Chen, L. M. Lin, Ch. Ch. Kao, Ch. H. 2001. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science.* **160**. 283-290.
- Chen, Ch. T. Chen, T. H. Lo, K. F. Chiu, Ch. Y. 2004. Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant Science.* **166**. 103-111.
- D'Haese, D. Vandermeiren, K. Cuabergs, R. J. Guisez, Y. De Temmerman, L. Horemans, N. 2004. Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin. *Journal of Theoretical Biology.* **227**. 175-186.

- De Ronde, J. A. Cress, W. A. Küger, G. H. J. Strasser, R. J. Van Staden, J. 2004. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing and *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **161**. 1211-1224.
- Dixit, V. Pandey, V. Shyam, R. 2002. Chromium ions inactive electron transport and enhance superoxide generation *in vivo* in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. Plant, Cell and Environment. **25**. 687-693.
- Genty, B. Briantais, J. M. Baker, M. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophysic. Acta. **990**. 87-92.
- Ghoulam, Ch. Foursy, A. Fares, K. 2002. Effects of salts on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivar. Environmental and Experimental Botany. **47**. 39-50.
- González, A. Lynch, J. P. 1997. Effects of manganese toxicity on leaf CO₂ assimilation of contrasting common bean genotypes. Physiologia Plantarum. **101**. 872-880.
- Good, A. G. Zaplachinski, S. T. 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum. **90**. 9-14.
- Haldiman, P. Tsimilli, M. M. 2002. Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplast. Photosynthesis Research. **74**. 37-50.
- Hall, D. O. Scurlock, J. M. O. Bolhar, N. H. R. Leegood, R. C. Long, S. P. 1993. Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual. Chapman and Hall. England.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metals detoxification and tolerance. J. of Exp. Bot. **53 (366)**. 1-11.
- Hare, P. D. Cress, W. A. van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolites accumulation during stress. Plant, Cell and Environment. **21**. 535-553.

- Hare, P. D. Cress, W. A. van Staden, J. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. of Exp. Bot.* **50 (33)**. 413-434.
- Hipkins, M. F. Baker, N. R. 1992. Photosynthesis energy transduction a practical approach. Oxford. England.
- Hirschi, K. D. Korenkov, V. D. Wilganowski, N. L. Wagner, G. J. 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant. Physiol.* **124**. 125-133.
- Hoekstra, F. A. Golvina, E. A. Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science.* **6 (9)**. 431-438.
- Houtz, R. L. Nable, R. O. Cheiae, G. M. 1988. Evidence for effects on the *in vivo* activity of Ribulose- Bisphosphate carboxylase/ oxigenase during development of Mn toxicity in tabacco. *Plant. Physiol.* **86**. 1143-1149.
- Irigoyen, J. J. Emerich, D. W. Sánchez, D. M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum.* **84**. 55-60.
- Kepova, D. K. Stoilova, L. S. Stoyonova , Z. Hölzer, R. Feller, U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany.* **52**. 253-266.
- Kishor, K. P. B. Hong, Z. Miao, G. H. Hu, Ch. A. A. Verma, D. P. S. 1995. Overexpression of Δ^1 - pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**. 1387-1394.
- Kitao, M. Lei, T. T. Koike, T. 1997. Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous broad-leaved trees in northern Japan. *Environmental pollution.* **97 (1-2)**. 113-118.
- Kitao, M. Lei, T. T. Koike, T. 1997. Effects of manganese toxicity on photosynthesis of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) seedlings. *Physiologia Plantarum.* **101**. 249-256.

- Krüger, G. H. Tsimilli, M. M. Strasser, R. J. 1997. Light stress provokes plastic and elastic modification in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiologia Plantarum*. **101**. 265-277.
- Lidon, C. 2002. Rice plant structural changes by addition of excess manganese. *Journal of Plant Nutrition*. **25 (2)**. 287-296.
- Lidon, F. C. Graça, B. M. Ramalho, J. C. 2004. Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. *J. of Plant Physiology*. **161**. 1235-1244.
- Maldonado- Rodríguez. Biololyzer program. 2000. <http://www.unige.ch/sciences/biology/bionen>.
- Mallick, N. Mohn, F. H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **55**. 64-69.
- Mohan, B. S. Hosetti, B. B. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental pollution*. **98 (2)**. 233-238.
- Matile, P. Hörtensteiner, S. 1999. Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.* **50**. 67-95.
- Nable, R. O. Houtz, R. L. Cheniae, G. M. 1988. Early inhibition of photosynthesis during development of Mn toxicity in tobacco. *Plant Physiol.* **86**. 1136-1142.
- Naidu, B. P. Paleg, L. G. Aspinall, D. Jennings, A. C. Jones, G. P. 1991. Amino acid and glycine betaine accumulation cold- stressed wheat seedling. *Phytochemistry*. **30 (2)**. 407-409.
- Öncel, I. Keleş, Y. Üstün, A. S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental pollution*. **107**. 315-320.
- Pandey, N. Sharma, Ch. P. 2003. Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany*. **00**. 1-6.

- Prasad, M, N,V. 1995. Inhibition of maize leaf chlorophylls, carotenoids and gas exchange functions by cadmium. *Photosynthetica*. **31 (4)**. 635 – 640.
- Pankovic, D. Plesnicar, M. Maksimovic, A. Petrovic, N. Sakac, Z. Kastori, R. 2000. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd- stressed sunflower plants. *Annals of Botany*. **86 (4)**. 841-847.
- Perales, H. V. 2001. Efecto del estrés salino sobre los eventos primarios de la fotosíntesis en *Triticum aestivum* L. Tesis Maestria. UNAM-FESI.
- Rai, V. Vajpayee, P. Singh. Mehrotra, S. 2004. Effects of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*. **167**. 1159-1169.
- Ralph, P. J. Burchet, M. D. 1998. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metals stress. *Environmental pollution*. **108**. 91-101.
- Samantary, S. 2002. Biochemical responses of Cr- tolerant and Cr- sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium. *Chemosphere*. **47**. 1065-1072.
- Schat, H. Sharma, S. S. Vooijs, R. 1997. Heavy metals- induced accumulation of free proline in a metal- tolerant and nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. **101**. 477-482.
- Shanker, A. K. Djanguiraman, M. Sudhagar, R. 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram. *Plan Science*. **166 (4)**. 1035-1043.
- Sharma, S. S. Schat, H. Voous, R. 1998. In vitro alleviation of heavy metal- induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* **49 (6)** 1531-1535.
- Shaw, B. P. Rout, N. P. 2002. Hg and Cd induced changes in proline content and activities of proline biosynthesizing enzymes in *Phaseolus aureus* and *Triticum aestivum*. *Biologia Plantarum*. **45 (2)**. 267-271.
- Sinha, P. Dube, B. K. Chatterjee, C. 2004. Amelioration of chromium phytotoxicity in spinach by withdrawal of chromium or iron application through different modes. *Plant Science*. **In press**.

- Strasser, 1981. The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity photosynthetic units in thylakoids. In: Akoyunoglou G (ed) Photosynthesis III. Structure and Molecular organization of the photosynthetic apparatus. Pp. 727-737. Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa.
- Strasser, R, J. Srivastava, a. Tsmill – Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In Yunus. M. Pathrc. U. Mohanty, P. (eds) Probing photosynthesis. Mechanism, regulation and adaptation. Taylor and Francis. New York. London. Pp. 445 – 483.
- Taiz, L. Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3a ed. Ed. Sinauer Associates Inc. Publisher.
- Vajpayee, P. Tripathi, R. D. Rai, U. N. Ali, M. B. Singh, S. N. 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate activity and protein content in *Nymphaea alba* L. Chemosphere. **41**. 1075-1082.
- Van Heerden, P. D. R. Tsimilli, M. M. Krüger, G. H. J. Strasser, R. J. 2003. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. Physiologia Plantarum. **117**. 476-491.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers. J. Plant. Physiol. **144**. 307 – 313.
- Wissemeier, H. H. Horst, W. J. 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) walp) Plant and soil. **143** 299 – 309.

Abreviaturas.

CEO: Complejo Emisor de Oxígeno.

Cl *a*: Clorofila *a*.

Cl *b*: Clorofila *b*.

Car. Carotenoides.

CT. Clorofila Total

a/b: Clorofila *a*/ Clorofila *b*.

Δ pH: Gradiente de pH.

ATP: Adenosin Trifosfato.

NADP⁺: Nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidado.

NADPH: Nicotin adenin dinucleótido reducido.

QA: Quinona A oxidada.

QA⁻: Quinona A reducida.

QB: Quinona B.

PQH⁺: Plastoquinona oxidada.

PQH₂: Plastoquinona reducida.

Rubisco: Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa-oxidasa.

RuBP: Ribulosa 1,5 bisfosfato.

FSI: Fotosistema I.

FSII: Fotosistema II.

DCPIP: 2,6-Diclorofenol indofenol.

MV: Metil viologeno.

DCMU: (3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea.

Q_P: Actividad fotoquímica.

Q_{NP}: Actividad no fotoquímica..

F_o: Fluorescencia mínima.

F_m: Fluorescencia máxima.

F_v: Fluorescencia variable.

F_v/F_m: Eficiencia de la fotoquímica primaria.

RC: Centro de Reacción.

ABS/CS: Tamaño del complejo antena.

TRo/CS: Captura de excitones.

ETo/CS: Transporte de electrones.

Dlo/CS: Disipación de energía en forma de calor.

Ψ_o : Eficiencia con la que un excitón puede mover un electrón más haya de QA-.

ϕ_{EO} : Eficiencia del transporte de electrones.

Ψ_w : Potencial hídrico.

ϕ_{PO} : Eficiencia de las reacciones lumínicas.

DF: Fuerzas totales de conducción.