



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Efecto de Cd disuelto en agua en la germinación de  
semillas y el crecimiento de plántulas de *Agave  
lechuguilla* provenientes de zonas con diferente  
nivel de contaminación por metales**

Tesis que presenta

**Carmen Alejandra Méndez Hurtado**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

**Ciencias Ambientales**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dr. Joel David Flores Rivas**

**Dr. José René Rangel Méndez**

**Asesora: Dra. Laura Yáñez Espinosa**

**San Luis Potosí, S.L.P., octubre del 2010**



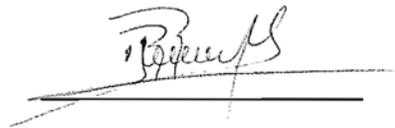
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Efecto de Cd disuelto en agua en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Agave lechuguilla* provenientes de zonas con diferente nivel de contaminación por metales” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Carmen Alejandra Méndez Hurtado** y aprobada el **30 de septiembre de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Joel David Flores Rivas

Codirector de la tesis



Dr. José René Rangel Méndez

Codirector de la tesis



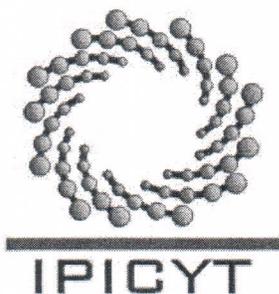
Dra. Laura Yáñez Espinosa



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Ecología y Cambio Ambiental Global de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Joel David Flores Rivas y el Dr. José René Rangel Méndez.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-221805).



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 039 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de octubre del año 2010, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Laura Yañez Espinosa</b>	<b>Presidente</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. José René Rangel Méndez</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Joel David Flores Rivas</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCION DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Carmen Alejandra Méndez Hurtado**

sobre la Tesis intitulada:

*Efecto de Cd disuelto en agua en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de Agave lechuguilla provenientes de zonas con diferente nivel de contaminación por metales*

que se desarrolló bajo la dirección de

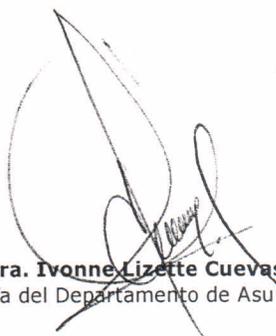
**Dr. Joel David Flores Rivas**  
**Dr. José René Rangel Méndez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de octubre de 2010.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



## **Dedicatoria**

A Dios por haberme puesto en este camino y haberme brindado el conocimiento para concluir este proyecto.

A mi familia la cual me brindó la oportunidad de hacer la maestría lejos del seno familiar, apoyándome en todo momento: A mis padres Carmen Hurtado y Fernando Méndez por haber dado la vida e inculcado la fe, la fuerza, la dedicación y los valores que me permitieron forjar este camino; ya que con su esfuerzo, amor y dedicación me permitieron concluir esta etapa. A mi hermano Fernando Alberto Méndez Hurtado por su amor, apoyo y comprensión incondicional que me permitió culminar esta etapa, ya que en él no solo cuento con un hermano sino con un gran amigo al cual quiero demasiado

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en especial a la División de Ciencias Ambientales por permitirme ser parte del posgrado.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP, por haberme brindado la oportunidad de realizar parte de este proyecto.

Al Dr. Joel Flores por sus enseñanzas, asesorías y apoyo, además porque en él encontré a un gran amigo con el que puedo contar.

Al Dr. René Rangel al cual le agradezco sus asesorías y apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Laura Yáñez a la cual estoy muy agradecida por todo el aprendizaje y su confianza depositada.

A mis amigos: la M. en C. Rebeca Pérez y M. en C. Pablo Delgado, a los cuales agradezco por su amistad y por todo su apoyo y aportación en la realización de este proyecto. También Al Dr. Vladimir Escobar, al Dr. José Luis Dávila, a la Dra. Claudia González y al M. en C. Guillermo Andrade por toda su ayuda.

A los técnicos: la M. en C. Dulce Partida y el M. en C. Juan Pablo Rodas, a quienes agradezco su valiosa ayuda.

A los investigadores del área de ecología, que con su conocimiento me ayudaron a labrar mi camino en esta etapa

A mis amigos Víctor Mendoza, Rodrigo García, Janeth García, Adriana Sandoval, Ingrid Arcega, Dulce Picazo, Mariana Figuera, Erika Robles Reyes, Amaranta Arellano y Paulina Rodríguez por la amistad, confianza, las risas y el apoyo.

A todos y a cada uno de mis compañeros, quienes de alguna forma me brindaron su apoyo y me hicieron agradable la estadía en el IPICYT, a los cuales no voy a nombrar por qué no acabaría.

A todos ellos mil gracias

## Contenido

	Pág.
CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	iii
ACTA DE EXAMEN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
INDICE.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRAC.....	xvii

## INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	9
3. OBJETIVO GENERAL.....	10
3.1 Objetivos específicos.....	10
4. HIPÓTESIS .....	11
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	12
5.1 Sitios de estudio.....	12
5.2 Especie de estudio.....	13
5.2.1 Descripción taxonómica de <i>Agave lechuguilla</i> .....	14
5.3 Colecta de semillas.....	15
5.4. Caracterización de las semillas.....	15
5.4.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR).....	15
5.4.2 Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM).....	16
5.4.3 Energía dispersiva de rayos X (EDX).....	16
5.4.4 Digestiones ácidas y análisis por espectrofotometría de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP).....	17
5.5 Pruebas de viabilidad de semillas con tetrazolio al 2%.....	17
5.6 Efecto del cadmio en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> .....	18
5.7 Variables de respuesta.....	19
5.7.1 Porcentaje de germinación.....	19
5.7.2 Longitud de la radícula.....	19
5.7.3 Biomasa total de plántulas.....	19
5.7.4 Eficiencia cuántica del fotosistema II.....	20
5.7.5 Estructura anatómica del meristemo apical.....	20

5.8 Metales pesados en el suelo .....	23
5.9 Sorción de cadmio por las plántulas.....	23
5.10 Expresión del gen metalotioneína.....	24
5.10.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).....	24
5.10.2 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante...	26
5.10.3 Síntesis de ADNc de cadena sencilla.....	26
5.10.4 Análisis de expresión diferencial mediante RT-PCR del gen metalotioneína de <i>Agave lechuguilla</i> .....	28
5.11 Análisis estadísticos.....	28
6. RESULTADOS.....	30
6.1. Caracterización de suelos y semillas.....	30
6.2 Pruebas de viabilidad de semillas con tetrazolio al 2%.....	35
6.3 Experimento de germinación: Efecto del cadmio en semillas y plántulas de <i>A. lechuguilla</i> .....	35
6.3.1 Porcentaje de germinación.....	35
6.3.2 Longitud de la radícula.....	36
6.3.3 Biomasa (peso seco).....	37
6.3.4 Eficiencia fotosintética.....	38
6.4 Caracterización de plántulas tratadas con cadmio.....	43
6.5 Análisis canónico discriminante.....	46
6.6 Análisis de expresión diferencial del gen metalotioneína de <i>Agave lechuguilla</i> .....	50
6.7 Daño estructural en meristemo.....	52
7. DISCUSIÓN.....	56
8. CONCLUSIONES.....	62
9. PERSPECTIVAS.....	63
10. BIBLIOGRAFÍA.....	64

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Contenido de metales pesados en suelos.....	30
<b>Tabla 2.</b> Contenido de metales pesados en semillas de <i>Agave lechuguilla</i> .....	31
<b>Tabla 3.</b> Análisis EDX de semillas de lechuguilla provenientes del sitio Villa de Zaragoza.....	34
<b>Tabla 4.</b> Análisis EDX de semillas de lechuguilla provenientes del sitio Villa de la Paz.....	34
<b>Tabla 5.</b> Viabilidad de semillas de <i>A. lechuguilla</i> de ambos sitios de estudio.....	35
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de germinación de semillas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.....	36
<b>Tabla 7.</b> Crecimiento de la radícula de plántulas de lechuguilla provenientes de semillas de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.....	37
<b>Tabla 8.</b> Biomasa de plántulas de lechuguilla provenientes de semillas de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.....	38
<b>Tabla 9.</b> Eficiencia fotosintética de plántulas de lechuguilla provenientes de semillas de Villa de Zaragoza y de Villa de la Paz, bajo distintas concentraciones de cadmio.....	39
<b>Tabla 10.</b> Síntomas de toxicidad por cadmio en plántulas de semillas de Villa de la Paz y Villa de Zaragoza tratadas con diferentes concentraciones de cadmio.....	40
<b>Tabla 11.</b> Contenido de cadmio en plántulas de semillas de Villa de la Paz y Villa de Zaragoza tratadas con diferentes concentraciones de este metal.....	43

<b>Tabla 12.</b> Análisis EDX en semillas de <i>A. lechuguilla</i> de Villa de Zaragoza, tratadas con 100 ppm de cadmio.....	46
<b>Tabla 13.</b> Análisis EDX en semillas de <i>A. lechuguilla</i> de Villa de la Paz, tratadas con 100 ppm de cadmio.....	46
<b>Tabla 14.</b> Estructuras canónicas entre grupos.....	49
<b>Tabla 15.</b> Porcentaje de clasificación de los datos en cada tratamiento..	49
<b>Tabla 16.</b> Longitud de los gránulos de almidón (promedio $\pm$ error estándar) en células de plántulas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza y de Villa de la Paz, bajo distintas concentraciones de cadmio.....	55

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Localización del área de estudio.....	12
<b>Figura 2.</b> Mapa de distribución de <i>Agave lechuguilla</i> en nuestro País.....	13
<b>Figura 3.</b> Análisis FTIR de semillas de <i>A. lechuguilla</i> de Villa de la Paz..	32
<b>Figura 4.</b> Análisis FTIR de semillas de <i>A. lechuguilla</i> de Villa de Zaragoza.....	32
<b>Figura 5.</b> Imágenes del ESEM de la semilla de <i>A. lechuguilla</i> del sitio Villa de la Paz.....	33
<b>Figura 6.</b> Imágenes del ESEM de la semilla de <i>A. lechuguilla</i> del sitio Villa de Zaragoza.....	34
<b>Figura 7.</b> Plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de Villa de Zaragoza, en las cuales se observan los distintos daños ocasionados por el cadmio.....	41
<b>Figura 8.</b> Plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de Villa de la Paz, en las cuales se observan los daños causados por el cadmio.....	42
<b>Figura 9.</b> Análisis FTIR de plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de Villa de la Paz, tratadas con cadmio en diferentes concentraciones.....	44
<b>Figura 10.</b> Análisis FTIR de plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de Villa de Zaragoza, tratadas con cadmio en diferentes concentraciones.....	44
<b>Figura 11.</b> Imágenes del SEM de la semilla de <i>Agave lechuguilla</i> del sitio Villa de la Paz tratada con 100 ppm de cadmio.....	45
<b>Figura 12.</b> Imágenes del SEM de la semilla de <i>Agave lechuguilla</i> del sitio Villa de Zaragoza tratada con 100 ppm de cadmio.....	45
<b>Figura 13.</b> Funciones canónica. Se muestra la distribución de los tratamientos y de los sitios, claramente separados.....	48
<b>Figura 14.</b> Expresión diferencial del gen de metalotioneína ( <i>MT</i> ) de plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de dos localidades, Villa de la Paz (sitio expuesto a Cd) y Villa de Zaragoza (sitio sin exposición a Cd). ....	51
<b>Figura 15.</b> Cortes anatómicos de plántulas de <i>Agave lechuguilla</i> de Villa de Zaragoza.....	53

**Figura 16.** Cortes anatómicos transversales de plántulas de *Agave lechuguilla* de Villa de la Paz..... 54

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
Ag	Plata
As	Arsénico
°C	Grados centígrados
C	Carbono
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
cm	Centímetros
Cu	Cobre
Cr	Cromo
eg	Ejemplo
g	Gramo
gcm <sup>-3</sup>	Gramo por centímetro cubico
K	Potasio
Mg	Magnesio
mm	Milímetros
mM	Milimolar
Mo	Molibdeno
MTs	Metalotioneinas
µg	Microgramo
µm	Micrómetros
N	Nitrógeno
Na	Sodio
O	Oxígeno
P	Fosforo
Pb	Plomo
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre
SH	Sulfhídrico
S.L.P.	San Luis Potosí
Tl	Talio
VP	Villa de la Paz
VZ	Villa de Zaragoza
Zn	Zinc

## RESUMEN

### **Efecto de Cd disuelto en agua en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Agave lechuguilla* provenientes de zonas con diferente nivel de contaminación por metales**

En el Altiplano Potosino hay regiones con alta acumulación de metales pesados en sus suelos debido a la actividad minera (e.g. Villa de la Paz, S.L.P.) la cual genera grandes desechos de escoria con alto contenido de Cu, Cd, Cr, Pb y Zn, y metaloides como As. Existen plantas con la capacidad de tolerar estos metales, llamadas “hiperacumuladoras”. En Villa de la Paz, S.L.P., se encuentran varias especies de este tipo, siendo una de las más comunes la lechuguilla (*Agave lechuguilla*). Sin embargo, se desconoce si son tolerantes a metales pesados en etapas iniciales de desarrollo, como son la germinación y el crecimiento de plántulas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintas concentraciones de cadmio, uno de los metales pesados más comunes en la zona minera de Villa de la Paz. Se colectaron semillas de *Agave lechuguilla* en dos municipios potosinos, Villa de la Paz (lugar muy contaminado por metales pesados) y Villa de Zaragoza (poco contaminado). Se caracterizaron física y químicamente las semillas antes de haber estado en contacto con cadmio, mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), y por espectrofotómetro de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP). Después se realizaron experimentos de germinación con diferentes concentraciones de cadmio disuelto en agua: 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. Las variables de respuesta evaluadas fueron el porcentaje de germinación, biomasa, la longitud de la radícula, la eficiencia cuántica del fotosistema II, la expresión del gen de la Metalotioneína (*MT*) y el daño estructural del meristemo. También se realizó la caracterización química de las plántulas de todos los tratamientos evaluados. Los estudios realizados nos informan que las semillas colectadas de Villa de la Paz presentaron mayor concentración de Al, Cd, Cu y Zn en sus tejidos, en comparación con las provenientes de Villa de Zaragoza, mientras que el análisis químico del suelo de Villa de Zaragoza muestra que la concentración por metales pesados fue casi nula. Además, las semillas de Villa de

la Paz presentan menor viabilidad que las de Villa de Zaragoza. Las variables de respuesta afectadas en ambos sitios son el cadmio acumulado en las plántulas, el porcentaje de germinación y el peso seco de las semillas, mientras que la eficiencia cuántica del fotosistema II y la longitud de las radículas no fueron significativamente afectados por los tratamientos. Se encontraron también células malformadas del córtex y del parénquima que rodea a los haces vasculares, por lo que se concluye que la epidermis fue el tejido más dañado por el Cd debido a que es el primer tejido donde el metal tiene contacto. El daño fue más severo en plántulas de Villa de la Paz que en las de Villa de Zaragoza. En cuanto a la expresión del gen de la metalotioneína (*MT*) se encontró que en Villa de Zaragoza la expresión fue gradual conforme a las concentraciones de cadmio, mientras que en Villa de la Paz la expresión de *MT* fue mayor en el tratamiento control debido a que las plántulas ya poseían metales en su estructura, Así la contaminación por metales pesados afecta la regeneración natural vía sexual de *Agave lechuguilla*.

**PALABRAS CLAVES:** *Agave lechuguilla*, germinación, cadmio, estrés metálico.

## ABSTRACT

### **Effect of Cd dissolved in water in seed germination and growth of seedlings of *Agave lechuguilla* from areas with different levels of metal contamination**

In the semiarid highlands there are or exist regions with high accumulation of heavy metals in soils due to mining activity (eg Villa de la Paz, SLP), which generates large waste slag with high content of Cu, Cd, Cr, Pb and Zn, and metalloids such as As. There are plants that have the ability to tolerate these metals, known as "hyperaccumulators". In Villa de la Paz, SLP, there are several species of this type, one of the most common is lechuguilla (*Agave lechuguilla*). However, it is unknown if this specie is tolerant to heavy metals in early stages of development such as germination and seedling growth. The purpose of this study was to evaluate the effect of different concentrations of cadmium, one of the most common heavy metals in the mining area of Villa de la Paz, on lechuguilla seeds and seedlings from areas with different pollution levels. *Agave lechuguilla* seeds were collected in two municipalities of San Luis, Villa de la Paz (place heavily contaminated by heavy metals) and Villa de Zaragoza (slightly polluted). Seeds were physically and chemically characterized before been in contact with cadmium, by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and inductively coupled plasma (ICP). Following the characterization of germination, experiments were conducted with different concentrations of cadmium in water: 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 ppm. The variables evaluated were the percentage of germination, seedling dry weight, length of radicle, the quantum efficiency of photosystem II, the gene expression of metallothionein (MT) and structural damage of the meristem. The chemical characterization of the seedlings of all treatments was also performed. Analyses showed that the seeds collected from Villa de la Paz have a higher concentration of Al, Cd, Cu and Zn in their tissues than those from Villa de Zaragoza, because the soil of Villa de la Paz is contaminated with high levels of heavy metals resulting from mining activities in the area, while the soil chemical analysis of Villa de Zaragoza showed that the heavy metals concentration was

almost zero. In addition, the seeds of Villa de la Paz have lower viability than those of Villa de Zaragoza, because the first ones were collected from plants exposed to high concentrations of heavy metals for many years. Malformed cells were also found in the parenchyma surrounding the vascular bundles, so it is concluded that the epidermis was the tissue damaged by Cd because this is the first that comes in contact with the metal. The damage was most severe on seedlings of Villa de la Paz than on those of Villa de Zaragoza. Regarding the gene expression of metallothionein (MT), it was found that in Villa de Zaragoza the expression was gradual as the concentrations of cadmium increased, while in Villa de la Paz the MT expression was higher in the control treatment because the seedlings already had metals in their structure. So pollution by heavy metals affects the natural sexual regeneration of *Agave lechuguilla*.

KEY WORDS: *Agave lechuguilla*, germination, cadmium, metal stress

## 1. Introducción

Los compuestos minerales son los proveedores de los elementos nutritivos que las plantas requieren para el desarrollo de su ciclo de vida. Tales compuestos proceden de las rocas de la litosfera, las cuales a través de muy diversos mecanismos se van degradando lentamente hasta convertirse en compuestos solubles. En el agua del suelo, estos compuestos se disocian en mayor o menor grado en cationes o aniones, pudiendo mantenerse libres en la disolución o fijarse según sus cargas eléctricas a las partículas coloidales. En el suelo existen, por lo tanto, dos fuentes generales de elementos fácilmente asimilables para las plantas: los nutrientes absorbidos por los coloides y los que forman parte de la disolución del suelo. De esta forma, se pueden encontrar elementos esenciales y no esenciales (Azcón y Talón, 2002).

Los elementos esenciales son aquellos que las plantas requieren para completar su ciclo biológico y que no pueden ser sustituidos por ningún otro elemento. Estos elementos son requeridos en diferentes concentraciones y se les llama macro y micronutrientes, entre los más importantes se encuentran el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el azufre (S), el calcio (Ca), el sodio (Na), entre otros (Azcón y Talón, 2002). Los elementos no esenciales son aquellos que tienen una concentración baja en las plantas, independientemente de que sean esenciales para su metabolismo o tengan efecto tóxico; también se les llama elementos traza. Entre los más importantes están el cobre (Cu), el níquel (Ni), el molibdeno (Mo), el Zinc (Zn), etc. Además, existen otros elementos como el arsénico (As), el cadmio (Cd) o el talio (Tl), los cuales en condiciones naturales son poco abundantes en el agua y el suelo. Estos elementos son conocidos como metales pesados y tienen la característica de tener una alta densidad y son tóxicos en altas e incluso en bajas concentraciones. Los metales pesados se encuentran como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros componentes (Kabir *et al.*, 2008).

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: I) quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo u ocupando sitios de intercambio; II) ser específicamente

adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo; III) estar asociados con la materia orgánica del suelo y IV) ser precipitados como sólidos puros o mixtos. Después de incorporarse al suelo, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas, también pueden pasar a la atmósfera por volatilización o pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas (García y Dorronsoro, 2005).

Para determinar el comportamiento de los metales pesados en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat *et al.*, 2005). La toxicidad de los metales depende no sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino *et al.*, 2002). La disponibilidad de los metales pesados en el suelo está en función del pH, del contenido de arcillas, del contenido de materia orgánica, de la capacidad de intercambio catiónico y/o aniónico, así como de otras propiedades que las hacen únicas en términos de manejo de la contaminación (Sauve *et al.*, 2000; Sauquillo *et al.*, 2003).

La presencia de metales pesados en el suelo es cada vez más común debido al aumento de actividades antropogénicas como la minería, la cual genera gran cantidad de metales pesados (Razo, 2006; Kabir *et al.*, 2008). La minería se considera una actividad antropogénica de alto impacto debido a que los residuos producidos en sus etapas de exploración, extracción y procesamiento producen efectos negativos sobre el agua, aire, suelo (Razo, 2006). El impacto ambiental más notorio producto de esta actividad, es la generación de residuos provenientes de las presas de jales y escoria. Los residuos generalmente son producto de metales pesados como Cu, Cd, Cr, Pb y Zn y metaloides como As (González, 2006). Estos daños ambientales se generan principalmente por el caso omiso a la normatividad ambiental en cuanto al manejo y disposición de estos materiales (UNEP, 2000).

En México la minería ha sido una importante actividad económica desde la época de la Colonia (Razo, 2006). En la actualidad, el Estado de San Luis Potosí es uno de los principales productores de metales en nuestro país, produciendo principalmente fluorita (CaF<sub>2</sub>), plata (Ag), plomo (Pb), zinc (Zn), cobre (Cu), entre

otros (SGM, 2008). La actividad minera se centra en la región del Altiplano Potosino, con la mayor acumulación de metales en los municipios de Villa de la Paz y Matehuala, en los cuales existe un yacimiento de plomo, zinc, plata, cobre y oro. Este yacimiento ha sido explotado por más de dos siglos, generando contaminación por metales pesados en el suelo, agua y sedimentos del lugar (Castro *et al.*, 1997; Monroy, 2002; Razo, 2004, 2006; González, 2006).

En el suelo, los metales pesados se encuentran como iones libres actuando de forma directa sobre los seres vivos, a través del bloqueo de las actividades biológicas; es decir, en la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos –SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Li *et al.*, 2005). Así, es probable que en la zona minera de Villa de la Paz – Matehuala, la alta cantidad de metales pesados incorporados al suelo afecte de manera negativa el desarrollo e incluso la supervivencia de las plantas nativas.

Tras el desarrollo industrial y la incorporación de metales pesados a los ecosistemas por dichas actividades, las plantas silvestres han tenido que lidiar con un nuevo tipo de estrés, causado por las altas concentraciones de metales pesados. Las plantas desérticas están constantemente sometidas a distintos tipos de estrés abiótico como sequía, alta radiación solar, altas y/o bajas temperaturas, luz ultravioleta, entre otros (Basurto *et al.*, 2008), y se ha sugerido que el estar adaptadas a estos tipos de estrés les confiere adaptación para otros tipos de estrés, como el ocasionado por los metales pesados (Catanese *et al.*, 2006).

Algunas especies vegetales han desarrollado mecanismos internos para tolerar la toxicidad de los metales, por lo que pueden acumular altas concentraciones de metales en sus tejidos a niveles muy por encima de los normales, sin presentar síntomas de toxicidad; a este tipo de plantas se les llama hiperacumuladoras (Baker, 1981; De la Rosa *et al.*, 2004; Llugany *et al.*, 2007).

Existen diversos mecanismos de entrada de los metales pesados a las plantas. Generalmente, el primer contacto se lleva a cabo en las células de la raíz, ya que es la parte subterránea en contacto directo con el suelo, en el cual los metales se encuentran disueltos y biodisponibles para las plantas (Azcón y Talón,

2002). Una de las características que comparten todas las células vivas es su capacidad de mantener en su interior iones y moléculas notablemente fuera del equilibrio (Azcón y Talón, 2006; Kabir *et al.*, 2008).

El ingreso de los metales pesados a la planta está mediado por la membrana plasmática de las células, debido a que está compuesta por distintos tipos de fosfolípidos y esteroides. Además contiene varios tipos de proteínas, algunas de ellas con una marcada actividad enzimática, a través de la cual existe un continuo tráfico de iones dentro de la célula. Asimismo, en la membrana plasmática ocurren varios mecanismos para la entrada de los iones metálicos que no son específicos para ellos. Un ejemplo de estos mecanismos son los canales, los cuales son proteínas que funcionan como poros selectivos en la membrana (Azcón y Talón, 2002).

En las plantas se han descrito distintos tipos de canales como los de  $K^{+}$ ,  $Cl^{-}$  o  $Ca^{2+}$ . Los canales de  $Ca^{2+}$  son específicos para la entrada de calcio a las células; sin embargo, ocurre un intercambio entre la superficie celular y la solución externa, en donde los iones de calcio pueden ser intercambiados por otro ion estequiométricamente equivalente, como ocurriría en el caso del cadmio  $Cd^{2+}$ , el cual puede sacar al calcio del canal para que éste entre; a este proceso se le conoce como intercambio iónico (Helffrich, 1995).

En la membrana plasmática existen proteínas con actividad deshidrogenasa capaz de oxidar NADPH, los electrones provenientes de esta oxidación son transportados por la parte externa de la membrana a través de una serie de proteínas. El funcionamiento de esta mini cadena de transporte de electrones da una salida de protones al exterior de la membrana. El aceptor final de electrones puede ser el oxígeno ( $O_2$ ) actuando como agente oxidante, aunque puede haber otros agentes oxidantes, ya que la transferencia de electrones en la parte externa de la membrana es muy inespecífica debido a que aún se desconoce su funcionamiento en gran medida. Este mecanismo se conoce como bomba redox, el cual acumula en la membrana poder reductor proveniente de la actividad metabólica. Esto da la actividad reductora para movilizar iones que son insolubles cuando están oxidados (Azcón y Talón, 2002).

En la membrana plasmática hay varias proteínas que transportan los iones del exterior hacia el interior, llevándolos a los diferentes organelos según su función (Polle y Schützendübel, 2003). Se han descrito varias proteínas específicas para ciertos metales, las cuales transportan el ion metálico anclándolo e introduciéndolo en las células. Estas proteínas fueron descritas por Hall y Williams (2003), describiéndose alrededor de ocho familias de proteínas transportadoras de metales. Se destaca la proteína LCT1, la cual es capaz de transportar  $\text{Cd}^{2+}$ , siendo esta proteína muy afín a este elemento. De igual forma se encuentran las proteínas IRT1, 2 y Nrarp, las cuales además de transportar otros iones metálicos también son capaces de transportar  $\text{Cd}^{2+}$  (Hall y Williams, 2003). Una vez entrando el ion metálico a la célula, éste es transportado a otras células por vía simplástica y/o apoplástica hasta llegar al xilema, y es así como se distribuye a todos los tejidos de la planta (Azcon y Talón, 2002).

Una vez adentro de la planta el cadmio puede producir toxicidad en éstas, puesto que es un metal no requerido para las plantas y se ha reportado su toxicidad ante las altas exposiciones de este elemento (Pernia *et al.*, 2008). El cadmio es un metal pesado del grupo IIB, con una densidad de  $8.6 \text{ g cm}^{-3}$  (Di Toppi y Gabrielli, 1999); este metal se encuentra de manera natural en el suelo, y su presencia se ha incrementado tras el desarrollo de las actividades humanas.

Algunas especies vegetales han creado mecanismos de desintoxicación contra el estrés causado por los metales pesados como el cadmio, produciendo pequeñas proteínas ricas en cisteínas responsables de la quelación del metal; tales proteínas son denominadas metalotioneínas ó *MTs* (Zhou y Goldsbrough, 1995; Rodríguez-Serrano *et al.*, 2008). Estas proteínas quelan al cadmio mediante ligandos de azufre (S), produciendo complejos de Cd-ligandos y transportándolos hacia las vacuolas y a otras células (Clemens, 2006). Los complejos de cadmio tienen composición de aminoácidos, por lo que es más fácil anclarse a la metalotioneína y ser transportados (Karin, 1985; Kagi y Shaffer, 1991).

Las metalotioneínas fueron descubiertas en 1957 y la presencia de estas proteínas se relacionaba con la acumulación de metales en los tejidos (Hamer, 1985). Actualmente se reconoce a la metalotioneína como uno de los compuestos

biológicos capaces de contener metales. Estas proteínas han recibido su nombre con base en su alto contenido de metales y sulfhidrilos provenientes de cadenas laterales de cisteínas (Karin, 1985). Además, se ha reportado la alta afinidad del cadmio por el grupo sulfhidrilo (Polle y Schützendübel, 2003), lo cual facilita la quelación a esta proteína. El cadmio se une a la metalotioneína en dos distintos agrupamientos polinucleares, A y B. El agrupamiento A tiene 11 cisteínas las cuales pueden ligar cuatro átomos de cadmio, este agrupamiento está constituido por  $\alpha$  carboxilo. El agrupamiento B posee nueve ~~óste~~  $\beta$  amino terminal (Karin, 1985; Kagi y Shaffer, 1991).

Se han desarrollado diferentes estudios con plantas desérticas hiperacumuladoras de metales pesados para evaluar su capacidad de remediar suelos contaminados. Para las especies *Prosopis laevigata*, *Larrea tridentata*, *Opuntia ficus-indica*, *Agave lechuguilla*, entre otras más, existen reportes de su alta tolerancia a metales pesados y su hiperacumulación de metales en los tejidos como raíz, tallo y hojas (Gardea-Torresdey *et al.*, 1998; 2000; 2003; 2004; Romero-Gonzalez *et al.*, 2005; González-Castro, 2007). Todos estos estudios coinciden con la hiperacumulación de los metales principalmente en la raíz, pues es la parte de las plantas que tiene el primer contacto con el metal, y posteriormente en tallos y hojas.

Para saber si una especie vegetal tiene la capacidad de acumular metales en sus tejidos, es necesario evaluar las respuestas que presentan en sus distintas fases de desarrollo (semillas, plántulas, juveniles, adultos), siendo las primeras dos fases de primordial importancia en el ciclo de vida (Kranner y Colville, *en prensa*). Sin embargo, la información acerca del efecto de los metales pesados en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas es contrastante, pues mientras que en algunas especies se reporta que no hay efecto (Li *et al.*, 2005; Jamal *et al.*, 2006a), en otras sucede lo contrario (Baskin y Baskin, 2001; Peralta *et al.*, 2000; 2001; Di Salvatore *et al.*, 2008; Kabir *et al.*, 2008). Además, en los estudios que se ha encontrado que la exposición a los metales no detiene la germinación, se reporta que sí afecta el crecimiento de las radículas y el

establecimiento de las plántulas (Peralta *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Buendía-González *et al.*, 2010).

Algunos de los síntomas más característicos que las plantas pueden presentar en altas concentraciones de cadmio son la reducción del crecimiento de la radícula en plántulas y de la longitud de las raíces en plantas adultas (Ferjani, 2005; Pomponi *et al.*, 2006), así como la inhibición de la apertura estomática (Barcelo *et al.*, 1986), de la fotosíntesis (Pietrini *et al.*, 2003; Drazkiewicz *et al.*, 2003) y de la síntesis de la clorofila (Drazic y Mihailovic, 2005). También se ha reportado inhibición de la germinación del polen y del crecimiento del tubo polínico (Xiong y Peng, 2001), disminución del contenido de carotenoides (Raí *et al.*, 2005) y de la tasa de transpiración (Xiong y Peng, 2001), aceleración de la senescencia celular (Di Toppi y Gabbrielli, 1999; Benavides *et al.*, 2005) y clorosis (Prasad, 2003). Se ha encontrado también la interferencia con la toma, transporte y uso de varios micronutrientes como el Fe, Mn y Zn (Di Toppi y Gabbrielli, 1999), polimorfismo en el ADN (Liu *et al.*, 2005), disminución de la producción de cloroplastos, inhibición de la producción de la clorofila a y b, inhibición del fotosistema 2 y decremento de la actividad del rubisco (Pessaraki, 2005) y daño estructural en células de hojas y tallo (Barcelo *et al.*, 1987)

Estudios desarrollados en el Altiplano Potosino en la zona de explotación minera de Villa de la Paz, indican que las altas concentraciones de metales pesados emitidas al ecosistema ponen en riesgo de pérdida a la comunidad en general y a la diversidad de especies de plantas nativas del lugar (González, 2006). Diversos estudios coinciden en que a mayor concentración de metales pesados más severo será el daño en las plantas, pero que el efecto negativo también depende de la toxicidad de los metales, el tiempo de exposición hacia las plantas y el pH del suelo (Li *et al.*, 2005; Gardea-Torresday *et al.*, 2002). Sin embargo; en el Altiplano Potosino aún no se han hecho investigaciones sobre este tema.

Por otra parte, recientemente se reportó que las semillas de sitios contaminados por metales pesados son más resistentes a tales metales en comparación con semillas de sitios no contaminados (Haque *et al.*, 2009). Así, es

probable que algunas plantas del Altiplano Potosino estén mejor adaptadas a la contaminación por metales pesados, en comparación con semillas de las mismas especies que no han sido expuestas a contaminación.

## 2. Justificación

Se han realizado varios estudios sobre la concentración de metales pesados y sus efectos en las plantas, sin embargo; la mayoría han sido con plantas adultas (Aldrich *et al.*, 2003; Gardea-Torresdey *et al.*, 2004; 2005; Romero-González, 2005). Son pocos los experimentos sobre los efectos de los metales pesados en la germinación de semillas y el establecimiento de plántulas (Weigel y Hans, 1980; Peralta *et al.* 2000; 2001; Street *et al.*, 2007; Casierra *et al.*, 2008). Aunado a esto, los trabajos existentes se enfocan en especies de cultivo (Peralta *et al.*, 2001; Jamal *et al.*, 2006a; 2006b; Kuriakose y Prasad, 2008), siendo escasos los estudios con especies silvestres (Jamal *et al.*, 2006c; Aldrich *et al.*, 2007; Buendía-González *et al.*, 2010).

En este proyecto se pretende determinar la capacidad de germinación de semillas y del crecimiento de plántulas de *Agave lechuguilla* (lechuguilla) ante la presencia de diferentes concentraciones de cadmio. Dicho metal se escogió debido a que en un estudio preliminar se encontró que en el suelo de Villa de la Paz se encuentra muy por arriba de las concentraciones límite sugeridas por la USEPA (USEPA, 2002; Razo 2006). Se comparará también mediante una caracterización física, química y fisiológica, el efecto del cadmio en semillas y plántulas de lechuguilla provenientes de regiones con distinto nivel de contaminación por metales pesados, una muy contaminada (Villa de la Paz, S.L.P.) y una sin contaminación aparente (Villa de Zaragoza, S.L.P.). Se espera que el efecto de las concentraciones altas de cadmio sea mayor en semillas y plántulas de lechuguilla provenientes de lugares no contaminados, como ha sido encontrado para la especie semiárida *Prosopis juliflora* (Jamal *et al.*, 2006a).

### 3. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la concentración de cadmio disuelto en agua en la germinación de semillas y en el crecimiento de plántulas de *Agave lechuguilla* (lechuguilla), provenientes de poblaciones con distinto nivel de contaminación por metales en el suelo.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar física y químicamente las semillas de lechuguilla antes y después de haber sido expuestas a los tratamientos de cadmio.
- Evaluar la tolerancia en la germinación de éstas y en el crecimiento de plántulas (biomasa, eficiencia del fotosistema II, estructura anatómica, longitud de la radícula y expresión del gen de la metalotioneína) de *A. lechuguilla*.
- Determinar si hay diferencias en la tolerancia al cadmio entre semillas de lechuguilla provenientes de lugares con distintos niveles de contaminación.
- Sugerir los posibles mecanismos de entrada del cadmio a las células y su camino por la plántula.

#### 4. Hipótesis

Las concentraciones altas de cadmio afectarán la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas *de Agave lechuguilla*, y el efecto será mayor en semillas y plántulas provenientes de lugares no contaminados.

## 5. Materiales y método

### 5.1. Sitio de estudio

Este trabajo se realizó con semillas de dos poblaciones de *Agave lechuguilla* en el estado de San Luis Potosí, una de ellas ubicada en el municipio de Villa de la Paz y la otra en Villa de Zaragoza. Villa de la Paz limita al norte con el municipio de Cedral, al suroeste con Villa de Guadalupe, al oeste con Catorce y al este con el estado de Nuevo León. Las coordenadas geográficas son de 100°38' longitud oeste y 23°41' de latitud norte (INEGI, 2008). Esta zona se encuentra contaminada con la presencia de metales pesados producto de la actividad minera (Razo, 2006).

Villa de Zaragoza se localiza en la zona centro del estado, sus coordenadas geográficas son 100°43'55" de longitud oeste y 22°2'15" de latitud norte. Colinda al norte con los municipios de Cerro de San Pedro y Armadillo de los Infante; al este con San Nicolás Tolentino; al sur con Santa María del Río; al oeste con los municipios de Villa de Reyes y San Luis Potosí (INEGI, 2008). Esta zona no presenta actividad minera, por lo que sus niveles de contaminación por metales pesados no son altos. En la Figura 1 se muestra el mapa de localización de los municipios.



**Figura 1.** Localización del área de estudio

## 5.2 Especie de estudio

*Agave lechuguilla* es una planta suculenta perteneciente a la familia Agavaceae. Esta especie se distribuye en el desierto chihuahuense, principalmente en los estados de Chihuahua, Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí e Hidalgo (SIRE, 2000; Gentry, 2003; Silva-Montellano, 2003a). De acuerdo con Gonzáles (2006), en Villa de la Paz esta especie presenta el riesgo de pérdida de su hábitat, así como una modificación en su estructura y un desequilibrio en sus propiedades ecosistémicas, de ahí la importancia de estudiar esta especie. Además, *Agave lechuguilla* posee importancia comercial, ya que sus hojas se utilizan para la fabricación de fibras textiles y su bagazo para la producción de jabones (Pando-Moreno *et al.*, 2008).

La lechuguilla generalmente se encuentra en suelos limosos (Nobel y Quero, 1986). En la Figura 2 se muestra la distribución de esta especie en México.



**Figura 2.** Mapa de distribución de *Agave lechuguilla* en México

### 5.2.1 Descripción taxonómica de *Agave lechuguilla*

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Liliopsida  
Subclase: Liliidae  
Orden: Asparagales  
Familia: Agavaceae  
Género: *Agave*  
Especie: *Agave lechuguilla*

*Agave lechuguilla* es una planta de penca/ hojas deltoides con espinas en los márgenes de las hojas, con una ligera banda tenue color verde en medio de las hojas. Tales hojas contienen fuertes fibras, las cuales se aprovecha para uso textil y ornamental (SIRE, 2000). La floración de esta especie ocurre entre mayo y septiembre. Las flores de la lechuguilla son dispuestas en inflorescencias espigadas que se forman al centro de la roseta de las hojas. Asimismo, estas flores tienen características protándricas, con los pétalos de color amarillo, cuatro estambres y un pistilo. El fruto es de forma capsular oblongo leñoso, dehiscente, con 3 alas y con numerosas semillas en cada una de las alas. El fruto mide de 2 a 3 centímetros de largo aproximadamente y uno de espesor (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). La semilla de esta especie presenta una forma ligeramente triangular, ovoide, comprimida, de unos 6 a 7 mm de largo. La testa es de color negro, lisa, lustrosa, aproximadamente de 0.1 a 0.2 mm de grosor. El embrión es ligeramente curvo, central, de tamaño mediano y de color blanco. El cotiledón es grande, plano, carnosos, lanceolado y mucho más largo que la radícula. La radícula es corta, superior y dirigida hacia el hilo pequeño, oblongo y blanco. Estas semillas presentan abundante endospermo, triploide, externo, ruminado, suave, carnosos, blanco y opaco o translúcido (Niembro, 1983).

La importancia económica de esta planta radica en sus hojas debido a que posee un alto contenido en fibras, las cuales son utilizadas en la extracción de ixtle para la fabricación de lazos, lomerías, gamarras, costales, cubiertas para pacas de

algodón, tapetes, etc. De la raíz y del tallo se obtienen productos que se emplean en la fabricación de jabones. El jugo de las hojas se puede utilizar como detergente. Se utiliza también para la extracción de esteroides (SIRE, 2000).

### **5.3 Colecta de semillas**

La colecta de semillas se realizó de manera manual, cortando las infrutescencias del escapo para después extraer los frutos de manera manual y sacar posteriormente las semillas de los frutos, quitándoles la cubierta carnosa que las protegen con ayuda de una navaja. Después de ser extraídas, se sometieron a diferentes caracterizaciones y tratamientos de germinación.

### **5.4. Caracterización de las semillas**

Antes de iniciar con los experimentos de germinación, a las semillas se les realizaron diferentes pruebas de caracterización, mediante: FTIR, ESEM, EDX y análisis químico, con el fin de determinar los diferentes compuestos y metales que estuvieran presentes en las semillas y que podrían influir en el proceso de germinación.

#### **5.4.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)**

La primera caracterización se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo de reacción de Fourier (FITR) de la marca Thermo Nicolet 6700, con el empleo de un cristal de selenuro de zinc. Se realizaron escaneos de 1/32 por segundo, para poder identificar los diferentes compuestos orgánicos que las semillas poseen, como carboxilos, aminos, amidas, aldehídos, grupos asufrados, etc., con los cuales el cadmio pudiese interactuar ligándose a su estructura y facilitando la entrada a la planta. Lo anterior debido a que se ha reportado que el cadmio tiene una alta afinidad por el grupo sulfhidrilo, así como por grupos aminos (Polle y Schützendübel, 2003).

Para realizar este método primero fue necesario secar las semillas a 70°C por un periodo de 17 horas. Las semillas secas se colocaron en un desecador

antes de su procesamiento, después se registró el peso seco de las semillas. Posteriormente, las semillas secas se molieron en un mortero de ágata hasta ser pulverizadas, para después ser analizadas en el espectrofotómetro con transformadas de Fourier.

#### **5.4.2 Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM)**

Para conocer la morfología de las semillas se realizó una caracterización de la estructura de la semilla, mediante el uso del microscopio electrónico de barrido XL-30. Este análisis es puntual. Para este paso, fue necesario realizar disecciones anatómicas a las semillas de manera transversal, para poder caracterizarla tanto por fuera como por dentro. Las partes de las semillas se colocaron en el microscopio electrónico de barrido. Se le realizó un escaneo en el microscopio electrónico ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés), el cual nos dio una imagen de la morfología de los diferentes cortes analizados en este estudio.

#### **5.4.3 Energía dispersiva de rayos X (EDX)**

Con las mismas muestras y el microscopio electrónico de barrido ambiental, se realizó un análisis por energía dispersiva de rayos X (EDX por sus siglas en inglés). Esta técnica nos permitió determinar el porcentaje de los diferentes elementos presentes en las semillas. El EDX se basa en las interacciones entre la radiación electromagnética, el material analizado y los rayos X. Su capacidad de caracterización se basa en el principio fundamental de que cada elemento tiene una única estructura atómica, permitiendo que los rayos X choquen con las partículas, emitiendo una energía característica de la estructura atómica de elementos que se identifican individualmente entre sí (Goldstein *et al.*, 2003).

#### **5.4.4 Digestiones ácidas y análisis por espectrofotometría de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP)**

Para la cuantificación de los elementos presentes en las semillas antes de ser tratadas con cadmio y en las plántulas después de los tratamientos con cadmio, se utilizó el ICP (Inductive Couple Plasma). Esta técnica nos permitió cuantificar de manera más exacta la concentración de metales en semillas y plántulas. Para llevar a cabo este análisis se realizó el siguiente procedimiento:

Las semillas fueron molidas en un mortero de ágata, después fueron colocadas en una cápsula de porcelana en el horno de secado Binder a 45°C durante 24 horas; inmediatamente después se tomó el peso seco de las muestras. Se colocaron 0.5 g de semilla en frascos de HDPT para poder realizar las digestiones, este procedimiento se realizó por triplicado. Para iniciar las digestiones ácidas, primero se agregó 0.1 mL de agua regia (1 volumen de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) más 3 volúmenes de ácido clorhídrico HCl) recién preparada, por cada miligramo de muestra. Estas muestras se sometieron a digestión durante un periodo de 4 a 5 horas, a una temperatura entre 60 y 70 °C. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar y se continuó con la digestión agregando 0.2 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado por cada miligramo de muestra, y se sometieron a reflujo durante 12 - 14 horas a 60 °C. Al final de la digestión con  $\text{HNO}_3$ , se agregó peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentrado a las digestiones para que se oxidara la materia orgánica restante. Una vez obtenidas las digestiones, se procedió a filtrar las muestras, con el fin de evitar que quedara algún remanente y causara alguna alteración en los resultados. Finalmente, las muestras digeridas se procesaron en el espectrofotómetro de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP), obteniendo la concentración de elementos inorgánicos presentes en las semillas.

#### **5.5 Pruebas de viabilidad de semillas con tetrazolio al 2%.**

Se utilizó la técnica de viabilidad de semillas sugerida por Baskin y Baskin (1998). Se utilizó tetrazolio al 2 %, donde se pesó 1 g de tetrazolio y se ajustó a 50 mL. La preparación se realizó en oscuridad debido a que el tetrazolio se degrada

con la luz. Una vez preparada la solución, 100 semillas de cada localidad se colocaron en un vaso de precipitado el cual fue previamente cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz una vez que se colocara la solución. Las semillas con la solución fueron colocadas a una temperatura de 40°C durante 12 horas. Después de ese tiempo, las semillas fueron enjuagadas y colocadas en agua destilada hasta su análisis.

Para el análisis de las semillas fue necesario hacer un corte longitudinal con el fin de observar la tinción del embrión con ayuda de un estereoscópio. El porcentaje de semillas teñidas equivale al porcentaje de semillas viables.

### **5.6 Efecto del cadmio en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Agave lechuguilla*.**

Los tratamientos constaron de cinco unidades experimentales con 20 semillas de *Agave lechuguilla* cada uno. Estas fueron colocadas en cajas Petri con 2 mL de diferentes concentraciones de cadmio como sustrato, con el fin de observar la asimilación del cadmio en la germinación y el crecimiento de las plántulas. Se realizaron siete diferentes concentraciones de cadmio (0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm). La concentración 0 fue el control, usando agua sin ningún tipo de contaminante. Las concentraciones fueron escogidas con base en los tratamientos utilizados en la literatura científica.

Las semillas fueron expuestas a germinar bajo fotoperiodos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad, con una temperatura de 25°C, en una incubadora para plantas Lumistell modelo ICP-19d-c/iv. Previo a colocar las semillas en la incubadora, se esterilizó todo el material utilizado así como las semillas para evitar contaminación por hongos u otros microorganismos que pudiesen alterar los resultados. Además, el sembrado de las semillas en las cajas Petri se realizó bajo campana de flujo laminar.

El material se esterilizó con ayuda de una autoclave, a 120 °C por 30 minutos. Además, fue necesario la esterilización de las semillas realizando varios lavados los cuales consistieron en:

1. Se agregó etanol al 70% y se colocó en agitación constante durante 5 minutos, después se decantó el etanol.
2. Se agregó cloro al 20 %, se colocó en agitación constante por 15 minutos y después se decantó.
3. Se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril, para quitar cualquier remanente de cloro y etanol.

### **5.7 Variables de respuesta**

Las variables utilizadas fueron el porcentaje de germinación, la longitud de la radícula, el peso seco de las plántulas, la eficiencia cuántica del fotosistema II, la estructura anatómica del meristemo apical, la expresión del gen de la metalotioneína y la sorción de cadmio por las plántulas. A continuación se define cada una de las variables evaluadas:

#### **5.7.1 Porcentaje de germinación**

La germinación de las semillas es definida como una serie de procesos metabólicos y morfológicos, los cuales resultan en la transformación del embrión en una plántula capaz de convertirse en una planta adulta (Coll *et al.*, 1995). El porcentaje de germinación en un lote de semillas es importante debido que indica la proporción de semillas capaces de germinar y desarrollarse.

#### **5.7.2 Longitud de radícula**

Después de la germinación, el desarrollo de la radícula es indispensable para el establecimiento de la plántula, por lo cual la longitud de la radícula indica la capacidad de crecer y desarrollarse, así como la capacidad para establecerse como plántula y prosperar ante el estrés sometido (Coll *et al.*, 1995).

#### **5.7.3 Biomasa total de plántulas**

Se evaluó el total de biomasa (peso seco) que la plántula acumuló o ganó en el proceso de crecimiento, como una medida de los recursos asignados al crecimiento en las distintas concentraciones de cadmio (Coll *et al.*, 1995).

#### **5.7.4 Eficiencia cuántica del fotosistema II**

La importancia de la evaluación de la fotosíntesis y los efectos inducidos por el estrés metálico son importantes en el análisis y desempeño de las plántulas bajo condiciones naturales. Cuando la molécula de clorofila es excitada por la luz, la energía absorbida puede ser disipada en tres procesos: 1) fotoquímicamente (fotosíntesis), 2) dispersión térmica o calor y 3) fluorescencia. Estos tres procesos compiten entre sí; de tal forma que el aumento de uno de ellos significa la disminución de los otros dos. La fluorescencia de la clorofila es la producción de la luz que acompaña la rápida disminución de la energía de los electrones que se encuentran en estado excitado de la clorofila. Esta energía puede ser utilizada para fotosíntesis o perderse en la disipación calorífica.

Una manera de evaluar la fluorescencia de la clorofila es mediante la fluorescencia modulada. Esta técnica se refiere a que la luz de excitación posee un desarrollo de la alta frecuencia, de modo que puede ser discriminada del resto de las emisiones de luz. Asimismo esta técnica evalúa la fluorescencia de la fotosíntesis usando pulsos de luz fuerte, permitiendo el análisis de la eficiencia fotosintética y evalúa las alteraciones del aparato fotosintético en función del transporte de electrones (ETR), esto quiere decir que cuando el ETR es bloqueado por algún factor de estrés, los niveles de fluorescencia disminuyen (González-Salvatierra, 2009).

#### **5.7.5 Estructura anatómica del meristemo apical**

Se cosecharon las plántulas de *A. lechuguilla* después de dos semanas de crecimiento con diferentes tratamientos de cadmio. Se fijó el tejido con gluteraldehído grado 1 al 4%. Posteriormente se realizaron tres lavados con solución buffer de fosfato (pH 7.4). Finalmente se procedió a realizar la deshidratación del tejido en etanol graduado antes de incluir en resina. A continuación se describe la técnica:

### **Fijación del tejido**

1. Se agrega gluteraldehído (4%) a la muestra hasta cubrirla por completo, durante dos días. Las muestras tienen que estar libres de luz y polvo.
2. Se realizarán lavados con buffer de fosfato con intervalos de 30 minutos, para eliminar el gluteraldehído.

### **Deshidratación del tejido**

1. Se deja reposando la muestra en solución de etanol al 30% por espacio de tres horas y se decanta la solución.
2. En etanol al 50% por tres horas
3. En etanol al 70% por 12 horas
4. En etanol al 90% por tres horas
5. En etanol al 96% por tres horas
6. Finalmente en alcohol absoluto. La muestra se puede dejar en esta solución por tiempo indefinido hasta el momento de su inclusión en resina.

### **Inclusión del tejido**

Las plántulas tratadas con el método anterior fueron incluidas en resina epóxica (Technovt H7100), la cual junto con un agente catalizador endurece la resina. Así, el tejido queda incluido en un medio sólido, lista para los cortes por micrótopo. La técnica se divide en tres pasos, pre infiltración, infiltración y polimerización de las muestras. Se describe la técnica a continuación:

### **Pre-infiltración**

Se realizó una serie graduada de etanol y resina de la siguiente manera:

1. Solución de etanol al 70% y 30% de 7100 Technovit resina epoxi. Se le agrega a las plántulas y se deja en vacío por espacio de dos horas y se decanta la solución.
2. En solución de etanol al 50% y 50% de 7100 Technovit por espacio de 2 horas en vacío.

3. En solución del etanol al 30% y 70% de 7100 Technovit por 2 horas en vacío.
4. En solución de 7100 Technovit al 100% por 12 horas en vacío

### **Infiltración**

Se prepara la resina con un endurecedor en el cual se agregan 100 mL de 7100 Technovit, que contenga el catalizador XCL y se agrega el endurecedor I, después se agrega el endurecedor II el cual acelera el endurecimiento debido a que contiene un derivado de ácido barbitúrico. Dichos compuestos son mezclados por un minuto. Después de la infiltración, las plántulas son colocadas en cápsulas de gsl 3 transparentes y se cubre la muestra con solución de infiltración.

### **Polimerización**

Las cápsulas con el tejido infiltrado se dejan reposar por 24 horas en vacío a temperatura ambiente, con el fin de asegurar la infiltración de la solución y el endurecimiento de las muestras. Transcurrido el tiempo las plántulas inmersas en la cápsula están listas para su orientación.

### **Orientación y corte de la muestra**

Las cápsulas con el tejido incluido ya endurecidas son pegadas a pequeños cubos de madera de 3 cm de largo por 1 de ancho, de tal manera que la radícula de las plántulas queden orientada perpendicularmente hacia la navaja de tungsteno del micrótopo Leica RM 2125RT donde se realizaron los cortes seriados.

Los cortes se realizaron a 3  $\mu\text{m}$  de espesor, los cuales se colocaron en un portaobjetos. La técnica se describe a continuación:

### **Descripción anatómica del tejido del meristemo apical**

Los cortes se tiñeron con el colorante Cresyl Blue en solución acuosa al 16 %. El análisis de los cortes se realizó en un microscopio óptico Leica DM 2000, enfocando las muestras a una magnificación de 40x y 100x. Se utilizó el programa LAES EZ versión 1.4.0 para medir el diámetro de los gránulos de almidón

encontrados en las células del parénquima y así poder realizar las comparaciones entre células de cada uno de los tratamientos.

### **5.8 Metales pesados en el suelo**

Se analizó el contenido de metales pesados en suelo de Villa de Zaragoza y estos resultados se compararon con los reportados por Razo (2006) para suelo de Villa de la Paz.

El suelo analizado en Villa de Zaragoza se colectó a unos 5 cm de profundidad. Después, este suelo se secó a 60 °C por dos horas, para después ser homogeneizado con ayuda de un martillo. Posteriormente, se procedió a tamizar la muestra con un tamiz de 0.25 cm de apertura, con el fin de obtener partículas finas de suelo. A continuación se colocaron 5 g de suelo en cada uno de los cuatro tubos eppendorf de 15 mL, a los cuales se le agregó 10 mL de agua ácida. A dos tubos se les agregó agua ácida a un pH de 5. Tales tubos se sometieron a agitación por 30 minutos, para después centrifugarse a 6000 RPM. Después se retiró el sobrenadante para colocarlo en tubos eppendorf de 15 mL. Este proceso se repitió tres veces más. Al sobrenadante recolectado se le realizó el análisis de contenido de metales mediante el ICP, obteniendo las concentraciones de los diversos elementos presentes en el suelo.

### **5.9 Sorción de cadmio por las plántulas**

Después de los experimentos de germinación, se cosecharon las plántulas y se analizaron químicamente. Al momento de cosechar las plántulas, fueron lavadas con agua desionizada con el fin de quitar algún elemento superficial que pudiese causar interferencia. Después se procedió a secar las plántulas a 45°C durante 24 horas. Después del secado, las plántulas fueron molidas en un mortero de ágata y después se procedió a realizarse digestión ácida. Al término de las digestiones ácidas, los productos fueron analizados en el ICP, obteniendo las concentraciones de cadmio en plántulas.

## 5.10 Expresión del gen metalotioneína

### 5.10.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

El protocolo que se utilizó para la extracción de ARN es el propuesto en el manual RNeasy (Qiagen, 2001). Con esta metodología, pequeños ARNs tales como 5.8S ARN, 5S ARN, y ARNt, de aproximadamente 160, 120 y 70-90 nucleótidos en longitud respectivamente, no pueden ser aislados, dando así un margen mayor a la extracción de ARN mensajeros. La técnica se describe a continuación:

1. Se determinó la cantidad de material inicial, siendo no más de 100 mg.
2. Inmediatamente después se molió la muestra en nitrógeno líquido, con un mortero y pistilo. Se transfirió el material molido a un tubo libre de ARNasas, congelado con nitrógeno líquido. **Nota:** Se permitió que el nitrógeno se evaporara, pero no se dejó que la muestra se descongelara, continuando inmediatamente con el paso 3.
3. Se añadieron 450  $\mu$ L de regulador RLC a un máximo de 100 mg de tejido. Se sometió a agitación vigorosa mediante el uso de un vórtex
4. Se colocó el lisado directamente en una columna (lila) puesta en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad de 3600 rpm. Cuidadosamente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga sin tocar la pastilla formada en el tubo colector. Se empleó solamente este sobrenadante en los pasos siguientes.
5. Se añadió 0.5 volumen de etanol 96 % (usualmente 225  $\mu$ L) para limpiar el lisado y se mezcló inmediatamente por pipeteo.
6. Se aplicó la muestra (usualmente 650  $\mu$ L), incluyendo cualquier precipitado que pudiera haberse formado, a una mini columna RNeasy (rosa) colocada en un tubo colector de 2 mL. Se cerró suavemente el tubo y se centrifugó por 15 s a 10,000 rpm. Se descartó el sobrenadante.
7. Se añadieron 350  $\mu$ L de regulador RW1 en la columna rosa de RNeasy y se centrifugó por 15 s a 10,000 rpm para lavar. Se descartó el sobrenadante.

8. Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de ADNasa 1 solución stock a 70 $\mu\text{L}$  de regulador RDD en un tubo. Se mezcló muy suavemente por inversión. Nota: la ADNasa 1 es especialmente sensible a desnaturalización física, por lo que el mezclado debe hacerse por inversión del tubo solamente, no en aparato vórtex.
9. Se añadió la mezcla de ADNasa 1 (80 $\mu\text{L}$ ) directamente en la membrana de sílica-gel de RNeasy (rosa) y se incubó a temperatura de 20 a 30 °C por 15 minutos. Nota: Se aseguró que la mezcla cayera en la membrana y no en las paredes.
10. Se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de regulador RW1 en la mini columna y se centrifugó por 15 s a 8,000 rpm. Se descartó el sobrenadante.
11. Se transfirió la columna RNeasy en un tubo colector de 2 ml. Se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de regulador RPE en la columna RNeasy. Se cerró el tubo suavemente y se centrifugó por 15 s a 10,000 rpm para lavar la columna. Se descartó el sobrenadante.
12. Se añadieron otros 500  $\mu\text{L}$  de regulador RPE a la columna RNeasy. Se cerró el tubo suavemente y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm para secar la membrana de sílica gel de RNeasy.
13. Opcional: Transferir la columna RNeasy a un tubo nuevo de 2 mL y descartar el antiguo tubo colector. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
14. Para eluir, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 mL. Se colocaron de 30 a 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas directamente en la membrana de sílica gel de la columna. Se cerró el tubo suavemente y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 rpm.
15. Si el rendimiento esperado de ARN es mayor a 20  $\mu\text{g}$ , es necesario repetir el paso de elución (paso 14) como se describe con un segundo volumen de agua libre de ARNasa. Eluir en el mismo tubo colector.
16. Para obtener una mayor concentración de ARN total, ésta segunda elución puede ser llevada a cabo usando el primer eluido del paso 14. El

rendimiento será del 15 al 30 % menos que el rendimiento obtenido usando un segundo volumen de agua libre de ARNasa, pero la concentración final será mayor.

17. Para corroborar la extracción se corrió la muestra en gel de agarosa desnaturante al 1%.

### 5.10.2 Electroforesis en gel de agarosa desnaturante

Al emplear un gel de agarosa desnaturante se pueden separar los distintos tipos de ARN que fueron aislados. Para preparar 80 mL de agarosa desnaturante, se emplearon los siguientes componentes:

- 0.96 g agarosa
- 8 mL de MOPS 10X
- 2.4 mL Formaldehído 37 %
- 69.6 mL agua destilada estéril con DEPC

### 5.10.3 Síntesis de ADNc de cadena sencilla

1. Para cada muestra y control de ARN de placenta humana, se combinaron los siguientes reactivos en un tubo de reacción estéril de 0.5 ml:

1-3 $\mu$ L Muestra de ARN (0.025-1 $\mu$ g de poli A ó 0.05-1 $\mu$ g de RNA total)

+ 1 $\mu$ L 3' oligonucleótido II A SMART CDS (10 $\mu$ M)

1 $\mu$ L Oligonucleótido SMART II A (10 $\mu$ M)

x $\mu$ L Agua desionizada

5 $\mu$ L Volumen Total

2. Se mezclaron los contenidos en el tubo y se centrifugaron brevemente en una microcentrífuga.

3. Se incubaron en el tubo a 70 °C en un termociclador por dos minutos.

4. Se centrifugaron a 3200 rpm brevemente en una microcentrífuga para colectar los contenidos en el fondo. Se mantuvo el tubo a temperatura ambiente.

5. Se añadió lo siguiente a cada tubo de reacción:
  - 2 $\mu$ L Regulador de primera cadena 5X
  - 1 $\mu$ L DTT (20 mM)
  - 1 $\mu$ L 50X dNTP (10 mM)
  - 1 $\mu$ L Transcriptasa reversa SuperScript.
6. Se agitó suavemente en vórtex y se centrifugaron a 3200 rpm los tubos brevemente en una microcentrífuga.
7. Se incubaron los tubos a 42 °C por una hora en el termociclador.
8. Se diluyó la primera reacción de primera cadena, añadiendo el volumen de regulador TE apropiado:
  - Añadir 40 $\mu$ L de regulador TE si se usó RNA total como material inicial.
  - 450 $\mu$ L de regulador TE si se usó más de 0.2  $\mu$ g de RNA poli A como material inicial.
  - 90 $\mu$ L de regulador TE si se empleó menos de 0.2 $\mu$ g de RNA poli A como material inicial.
9. Se calentaron los tubos a 72 °C por siete minutos.

**Nota:** Las muestras pueden ser guardadas a –10 °C hasta por tres meses.

Cabe mencionar que aunque el paquete proporciona su propia transcriptasa reversa, se adquirió por separado la enzima SUPER SCRIPT II (GIBCO BRL), ya que esta enzima tiene la capacidad de aumentar la probabilidad de que los mensajes sean transcritos completamente, debido a su actividad terminal transferasa, la cual añade unos pocos oligonucleótidos de deoxicitidina al extremo 3' del ADNcl. Luego entonces, el oligonucleótido SMART se acopla creando un templado extendido y asegurando la transcripción del mensaje completo. Además, esta enzima está genéticamente diseñada mediante la introducción de mutaciones puntuales, en lugar de una delección en el centro activo de la ARNasa H. A diferencia de la transcriptasa reversa proporcionada por el paquete, la SUPER SCRIPT II reduce de  $10^6$  a  $10^7$  veces la actividad ARNasa H y

las mutaciones selectivas producidas en el centro activo mantienen completa la actividad polimerasa.

#### **5.10.4 Análisis de expresión diferencial mediante RT-PCR del gen metalotioneína de *Agave lechuguilla***

Para el estudio de la expresión del gen de metalotioneína de *Agave lechuguilla* en condiciones de estrés por Cd se utilizó el Kit SuperScript II™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se adicionó 1 µL de cDNA a cada reacción de PCR de 50 µL, empleando los primers específicos para amplificar el gen de actina 1 como control interno de carga. Previo a esto, se diseñaron primers específicos para el gen de metalotioneína de *A. lechuguilla* mediante el programa PrimerSelect de Lasergene (DNASTar). El nivel de expresión del gen en cada muestra de *A. lechuguilla* fue calculado con base a la intensidad de la banda mediante el software de análisis 1-D Quantity One 4.5 (BIO-RAD, Hercules, CA.), llevándose a cabo un proceso de normalización a través de la expresión de un gen de actina 1. El programa para las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido de 95°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1.5 min (extensión), 28 ciclos. Los productos amplificados fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1% con TAE 1X, teñidos con EtBr y fotodocumentados.

#### **5.11 Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis estadístico discriminante canónico (ADC) que permite identificar las diferencias entre dos o más tratamientos de cadmio a partir de una media de caracteres de los individuos pertenecientes a éstos. Mediante este análisis se estiman funciones lineales canónicas a partir de las variables cuantificadas (porcentaje de germinación, longitud de la radícula, peso seco, eficiencia cuántica del fotosistema II y absorción de cadmio por plántulas), realizando la separación de los tratamientos al maximizar la varianza entre los tratamientos y minimizando la varianza entre los mismos.

Se utilizaron los coeficientes canónicos estandarizados para evaluar la contribución de cada variable independiente en cada función canónica (Pires da Silva *et al.*, 2001; Yáñez *et al.*, 2009). Para llevar a cabo los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999), con un nivel de significancia de  $\alpha$  del 5%. Para todas las variables de respuesta fue necesario transformar los datos con el fin de normalizar su distribución. El porcentaje de germinación se transformó utilizando arcoseno de la raíz cuadrada de los datos, mientras que la longitud de la radícula, el peso seco, la eficiencia cuántica del fotosistema II, y la absorción de cadmio se transformaron con logaritmo natural.

## 6. Resultados

### 6.1 Caracterización de suelos y semillas

En el suelo de Villa de Zaragoza se encontró poca presencia de metales pesados, solamente cobre y zinc en concentración baja. En cambio, en el suelo de Villa de la Paz se encontraron altas concentraciones de metales pesados característicos de la contaminación minera, como As, Pb, Cd, Cu y Zn (Razo, 2006). En la Tabla 1 se muestran los resultados de los análisis químicos del suelo en los diferentes sitios.

**Tabla 1.** Contenido de metales pesados en suelos

Elemento	Villa de Zaragoza(mg/kg)	Villa de la Paz (mg/kg) (Razo, 2006)
As	ND	939
Pb	ND	518
Cd	ND	16
Cu	0.0149	440
Zn	20.293	763

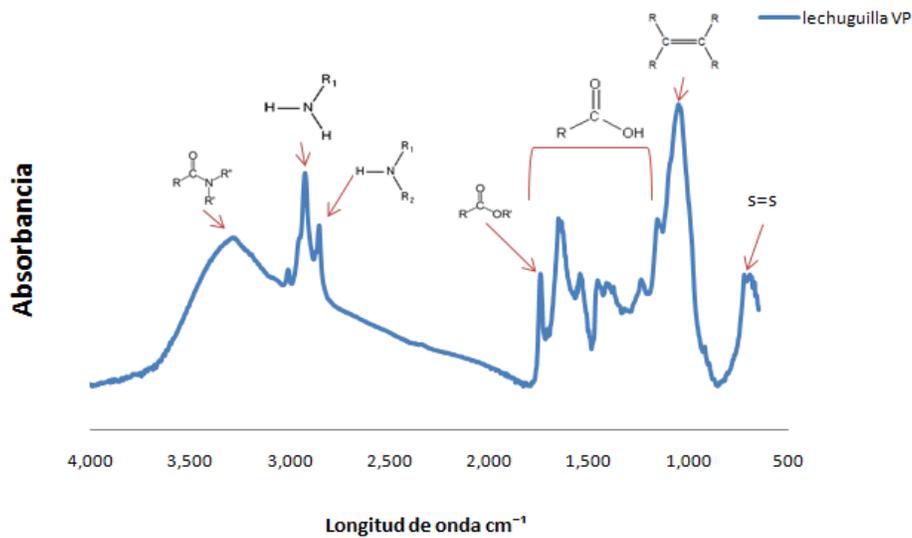
ND = No detectado

En cuanto a la caracterización de semillas, las de Villa de la Paz tienen altos contenido de metales pesados como Al, Cd, Cu, Si, Sr y Zn, mientras que en las semillas de Villa de Zaragoza se encontró solamente Al, Cu y Zn, pero en concentraciones menores en comparación con las encontradas en las semillas de Villa de la Paz (Tabla 2).

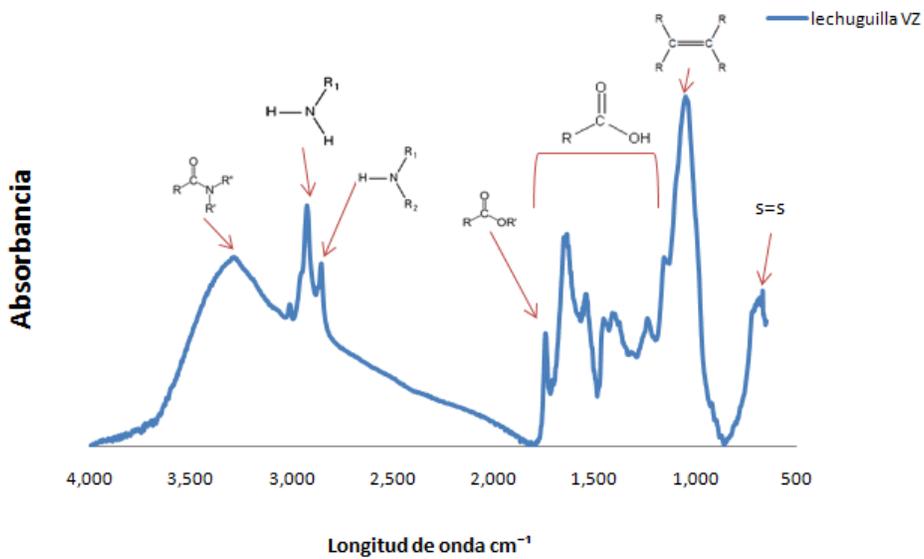
**Tabla 2.** Contenido de metales pesados en semillas de *Agave lechuguilla*

Elemento	Villa de Zaragoza mg/kg	Villa de la Paz mg/kg
Al	0.1696	6.833
As	ND	ND
Cd	ND	2.982
Cu	3.36	6.574
Pb	ND	ND
Si	ND	7.866
Sr	ND	1.356
Zn	5.633	10.533

Continuando con los resultados de la caracterización de semillas, en las Figuras 3 y 4 se muestran los resultados de los análisis de espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), de los sitios de Villa de la Paz, sitio más contaminado por metales, y Villa de Zaragoza sitio menos contaminado. En ambos sitios se encontraron las bandas características de grupos funcionales tales como: alcanos, aminas primarias y secundarias, amidas, carboxilos, aldehídos y algunos grupos de azufrados.

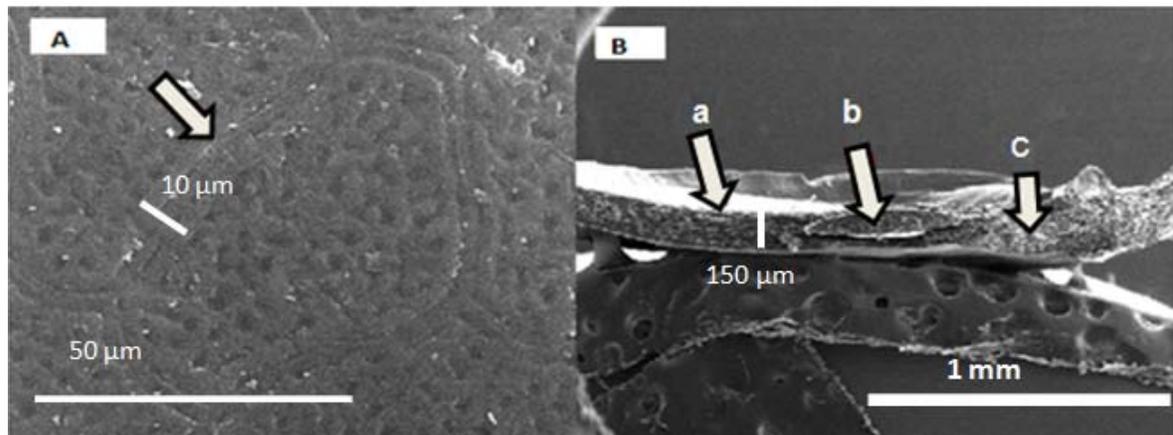


**Figura 3.** Análisis FTIR de semillas de *A. lechuguilla* de Villa de la Paz. Se indica con flechas el grupo funcional que corresponde a cada pico; el corchete indica que en ese espacio principalmente se encuentra el grupo carboxilo.

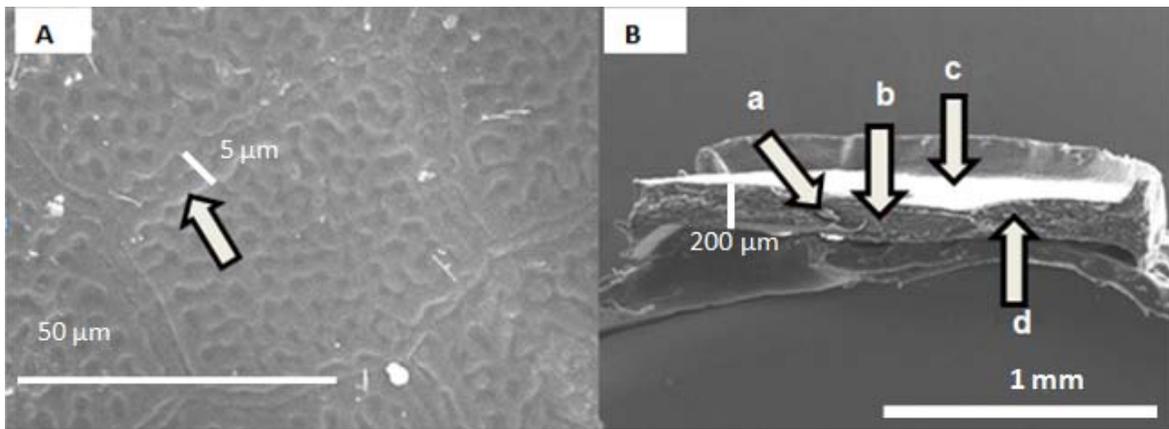


**Figura 4.** Análisis FTIR de semillas de *A. lechuguilla* de Villa de Zaragoza. Se indica con flechas el grupo funcional que corresponde a cada pico; el corchete indica que en ese espacio principalmente se encuentra el grupo carboxilo.

En la Figura 5 se observa el embrión de la semilla de lechuguilla del sitio Villa de la Paz y en la Figura 6 el de Villa de Zaragoza. Las semillas de Villa de Zaragoza muestran una estructura más uniforme y plana, así como un poco más gruesa en comparación con las semillas de Villa de la Paz, las cuales muestran una estructura irregular y curvada. Además, la pared de las células de la epidermis de las semillas de Villa de la Paz es ligeramente más gruesa que la pared de las células de Villa de Zaragoza.



**Figura 5.** Imágenes del ESEM de la semilla de *A. lechuguilla* del sitio Villa de la Paz. A) se muestran las células de la epidermis en la testa de la semilla; la flecha indica la pared celular. B) Se observa señalado con flechas las letras: a) la testa, b) el embrión y c) el tejido nutritivo.



**Figura 6.** Imágenes del ESEM de la semilla de *A. lechuguilla* del sitio Villa de Zaragoza. A) Se muestran las células de la epidermis de la semilla; la flecha indica la pared celular. B) Corte transversal de la semilla, en el cual se observan: a) el meristemo del embrión, b) el embrión, c) la testa, d) el tejido nutritivo.

En las Tablas 3 y 4 se muestran los resultados de análisis EDX de semillas de lechuguilla, en la cual se ve la energía irradiada en embrión, testa y tejido. Los elementos que se encontraron son carbono (C), oxígeno (O), magnesio (Mg), fósforo (P) y potasio (K), mostrando en ambas tablas los mismos elementos en porcentajes similares.

**Tabla 3.** Análisis EDX de semillas de lechuguilla provenientes del sitio Villa de Zaragoza.

	Embrión	Testa	Tejido
Elemento	%	%	%
<b>C</b>	81	87	85
<b>O</b>	12.79	10.27	11.86
<b>Mg</b>	0.75	0.4	0.53
<b>P</b>	3.01	1.26	1.49
<b>K</b>	1.75	0.58	1.12

**Tabla 4.** Análisis EDX de semillas de lechuguilla provenientes del sitio Villa de la Paz.

Elemento	Embrión %	Testa %	Tejido %
<b>C</b>	79.4	84.57	81
<b>O</b>	18.08	14.46	15.79
<b>Mg</b>	0.29	0.15	0.64
<b>P</b>	1.08	0.45	1.04
<b>K</b>	1.15	0.38	1.53

## 6.2 Pruebas de viabilidad de semillas con tetrazolio al 2%

Las semillas de Villa de Zaragoza tuvieron viabilidad más alta que las de Villa de la Paz (Tabla 5).

**Tabla 5.** Viabilidad de semillas de *A. lechuguilla* de ambos sitios de estudio

Villa de Zaragoza	Villa de la Paz
<b>80 %</b>	

## 6.3 Experimento de germinación: Efecto del cadmio en semillas y plántulas de *A. lechuguilla*.

### 6.3.1 Porcentaje de germinación

La germinación fue una de las variables menos afectada, debido a que fue similar en todas las concentraciones de cadmio. Sin embargo; se encontraron diferencias entre sitios. En la Tabla 6 se muestran los promedios y errores estándar del porcentaje de germinación de cada una de las concentraciones y de los sitios.

**Tabla 6.** Porcentaje de germinación de semillas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.

Sitio	Tratamiento (ppm de cadmio)	% de germinación	Error estándar
Villa de Zaragoza	0	87.0	2.5
	1	76.0	5.8
	10	73.0	4.1
	20	77.0	3.4
	40	79.0	6.6
	60	72.0	7.3
	80	71.0	1.9
	100	73.0	2.5
Villa de la Paz	0	31.0	2.9
	1	27.0	4.6
	10	25.0	5.7
	20	26.0	2.4
	40	29.0	5.1
	60	29.0	3.3
	80	22.0	5.1
	100	24.0	4.0

### 6.3.2 Longitud de radícula

Para esta variable se encontraron diferencias entre sitios y entre concentraciones de los tratamientos de cadmio. En la Tabla 7 se observan los promedios y errores estándar del crecimiento de la radícula de cada uno de los tratamientos.

**Tabla 7.** Crecimiento de la radícula de plántulas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.

Sitio	Tratamiento (ppm de cadmio)	Longitud de la radícula	Error estándar
Villa de Zaragoza	0	2.0	0.9
	1	1.9	0.8
	10	1.6	0.7
	20	1.4	0.6
	40	1.3	0.6
	60	1.6	0.7
	80	1.1	0.5
	100	0.9	0.4
Villa de la Paz	0	1.7	0.7
	1	1.0	0.4
	10	0.8	0.4
	20	1.1	0.5
	40	1.1	0.5
	60	1.1	0.5
	80	1.1	0.5
	100	1.0	0.4

### 6.3.3 Biomasa (peso seco)

El peso seco fue diferente entre tratamientos y localidades. En la Tabla 8 se muestran los promedios y errores estándar de biomasa acumulada o peso seco, en todas las concentraciones y los sitios.

**Tabla 8.** Biomasa de plántulas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza (VZ) y de Villa de la Paz (VP), bajo distintas concentraciones de cadmio.

<b>Sitio</b>	<b>Tratamiento (ppm de cadmio)</b>	<b>Peso seco</b>	<b>Error estándar</b>
<b>Villa de Zaragoza</b>	0	0.0034	0.000225
	1	0.0021	0.000327
	10	0.0022	0.000252
	20	0.0032	0.000045
	40	0.0026	0.000193
	60	0.0027	0.000279
	80	0.0022	0.000202
	100	0.0021	0.000126
<b>Villa de la Paz</b>	0	0.0031	0.000254
	1	0.0019	0.000417
	10	0.0023	0.000266
	20	0.0022	0.000135
	40	0.0019	0.000200
	60	0.0022	0.000232
	80	0.0016	0.000095
	100	0.0015	0.000197

#### 6.3.4 Eficiencia fotosintética

Esta variable no presentó diferencia entre sitios y tratamientos. En la Tabla 9 se muestran los promedios y errores estándar de cada una de las concentraciones de cadmio de cada uno de los sitios.

**Tabla 9.** Eficiencia fotosintética de plántulas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza y de Villa de la Paz, bajo distintas concentraciones de cadmio.

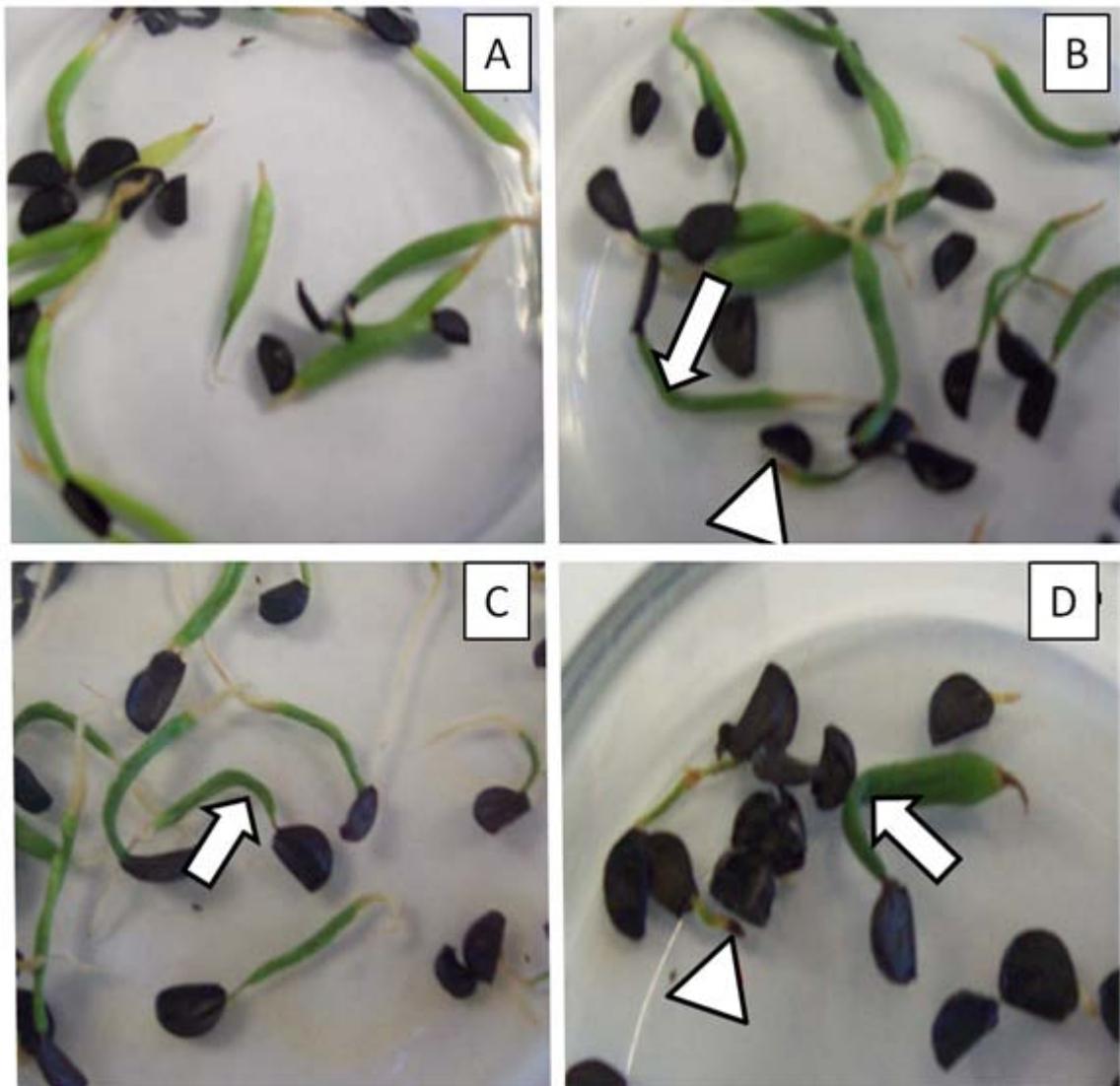
<b>Sitio</b>	<b>Tratamiento (ppm de cadmio)</b>	<b>Eficiencia fotosintética</b>	<b>Error estándar</b>
<b>Villa de Zaragoza</b>	0	0.786	0.009
	1	0.774	0.012
	10	0.753	0.035
	20	0.724	0.049
	40	0.727	0.042
	60	0.690	0.092
	80	0.743	0.023
	100	0.680	0.069
<b>Villa de la Paz</b>	0	0.748	0.040
	1	0.655	0.048
	10	0.761	0.015
	20	0.615	0.054
	40	0.673	0.064
	60	0.716	0.040
	80	0.754	0.030
	100	0.668	0.061

A pesar de que no hubo diferencias en la eficiencia fotosintética, se encontró que las plántulas tratadas con cadmio presentaron diversos síntomas de toxicidad, los cuales se acentuaron con el aumento de la concentración de dicho metal, siendo la concentración más dañina la de 100 ppm. Además, los síntomas se notaron más en las plántulas de Villa de la Paz. En la Tabla 10 se muestra los síntomas de toxicidad por cadmio en las plántulas.

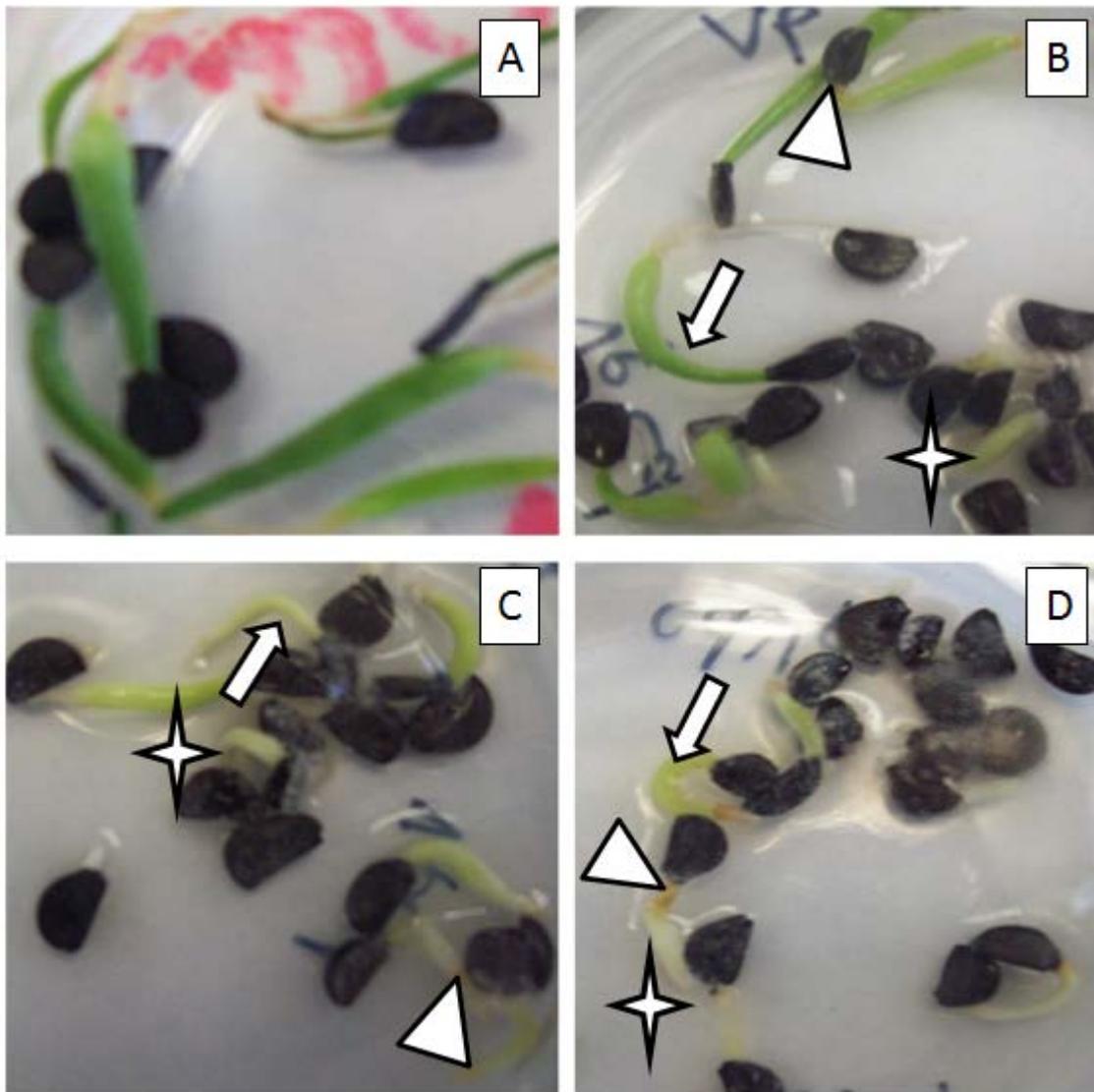
**Tabla 10.** Síntomas de toxicidad por cadmio en plántulas Villa de la Paz y Villa de Zaragoza tratadas con diferentes concentraciones de cadmio.

<b>Síntomas de toxicidad</b>
Encorvamiento de la plúmula
Senescencia celular
Clorosis
Retardo en la germinación
Retardo en el crecimiento de la radícula

En las Figuras 7 y 8 se observan las plántulas bajo diferentes concentraciones de cadmio (0, 20, 60 y 100 ppm), en los sitios Villa de Zaragoza y Villa de la Paz, respectivamente. Se muestran los diferentes síntomas de toxicidad mencionados en la Tabla 10.



**Figura 7.** Plántulas de *Agave lechuguilla* de Villa de Zaragoza, en las cuales se observan los distintos daños ocasionados por el cadmio. A: plántulas del tratamiento control. B: 20 ppm de Cd, ligero encorvamiento de la plúmula (flecha), senescencia celular (triángulo); C: 60 ppm de Cd, encorvamiento de la plúmula (flecha) D: plántulas con 100 ppm de Cd, encorvamiento severo de la plúmula (flecha) y senescencia celular (triángulo).



**Figura 8.** Plántulas de *Agave lechuguilla* de Villa de la Paz, en las cuales se observan los daños causados por el cadmio. A: plántulas del tratamiento control; B) 20 ppm de Cd, ligero encorvamiento de la plúmula (flecha), clorosis (estrella) y senescencia celular (triángulo); C: 60 ppm de Cd, encorvamiento de la plúmula (flecha), clorosis (estrella); D) plántulas con 100 ppm de Cd, encorvamiento de la plúmula (flecha), clorosis (estrella) y senescencia celular (triángulo).

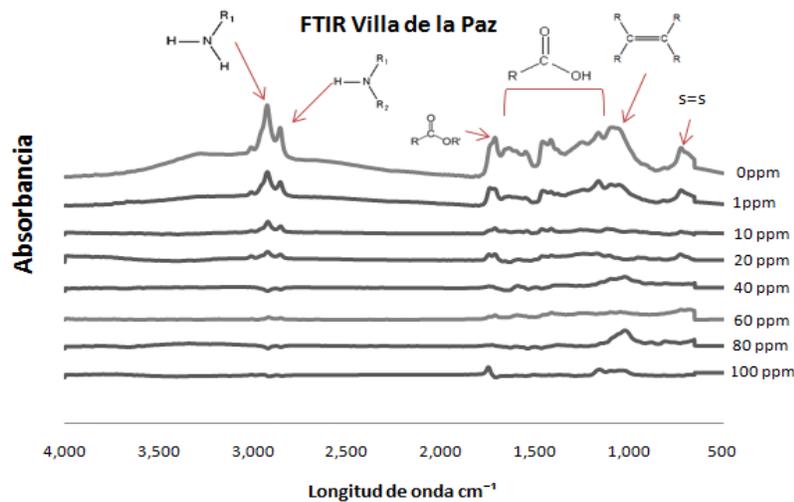
#### 6.4 Caracterización de cadmio de las plántulas tratadas

Se encontró que a mayor concentración de cadmio mayor fue la cantidad de cadmio acumulado en las plántulas. Las de Villa de la Paz tuvieron más cadmio que las de Villa de Zaragoza. En la Tabla 11 se muestra el contenido de cadmio en las plántulas, después de haber sido tratadas con diferentes concentraciones de dicho metal.

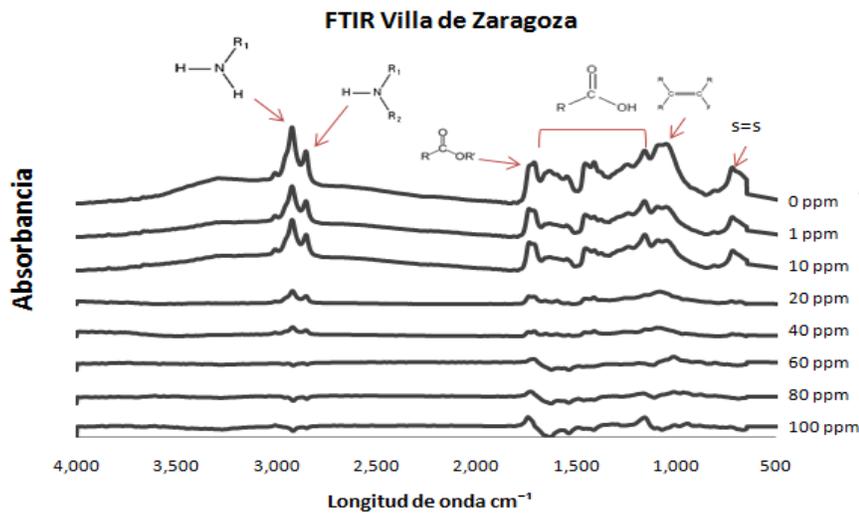
**Tabla 11.** Contenido de cadmio en plántulas tratadas con diferentes concentraciones de este metal.

Tratamientos (ppm de cadmio)	Villa de Zaragoza ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Villa de la Paz ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
0	ND	1.55
1	62.50	53.75
10	137.50	169.38
20	172.50	398.13
40	272.50	492.50
60	524.50	754.38
80	593.78	1051.88
100	661.25	1488.75

En las Figuras 9 y 10 se observan los picos de los grupos funcionales (aminas primarias y secundarias, amidas, carboxilos, aldehídos, alquenos y grupos azufrados, los cuales forman parte de la estructura química de proteínas, encimas y otras moléculas biológicas). A medida que aumenta la concentración de cadmio van desapareciendo los picos.



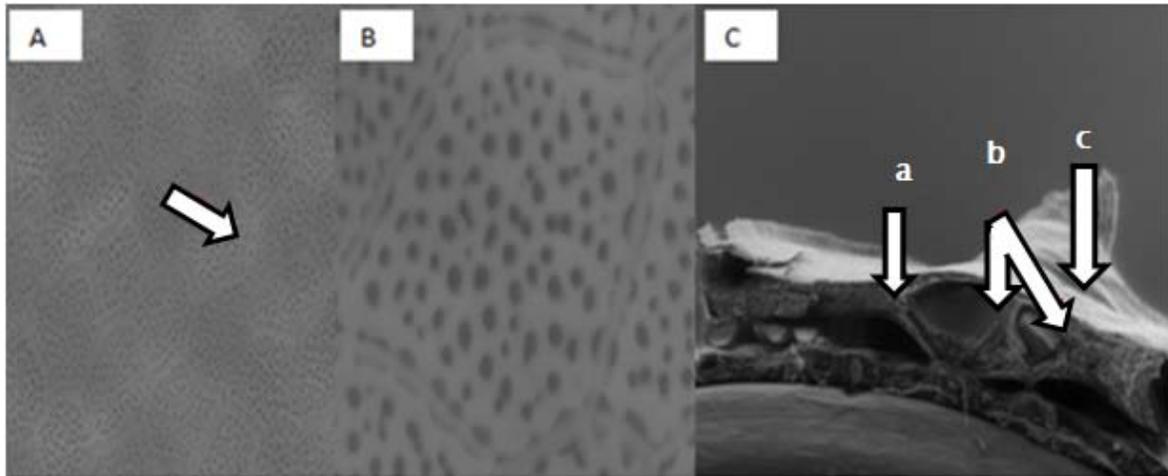
**Figura 9.** Análisis FTIR de plántulas de *Agave lechuguilla* de Villa de Paz, tratadas con cadmio en diferentes concentraciones. Las fechas indican los grupos correspondientes a cada uno de los picos presentes



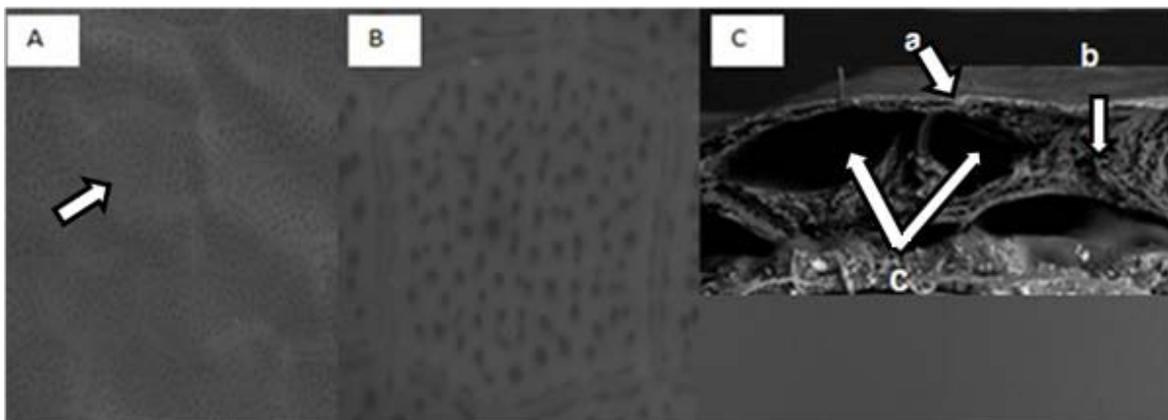
**Figura 10.** Análisis FTIR de plántulas de *Agave lechuguilla* de Villa de Zaragoza, tratadas con cadmio en diferentes concentraciones. Las fechas indican los grupos correspondientes a cada uno de los picos presentes.

Las semillas tratadas con la concentración más alta de cadmio (100 ppm) fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido (ESEM),

encontrándose porosidad en la testa y en el tejido nutritivo, en las semillas de ambos sitios (Figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Imágenes del SEM de la semilla de *Agave lechuguilla* del sitio Villa de la Paz tratada con 100 ppm de Cd. A) Imagen panorámica de la testa; la flecha indica las aéreas donde pudiese haber concentraciones de Cd. B) célula de la epidermis. C) corte transversal de la semilla; a) tejido nutritivo, b) cavidad embrionaria, c) testa.



**Figura 12.** Imágenes del SEM de la semilla de *Agave lechuguilla* del sitio Villa de Zaragoza tratada con 100 ppm de Cd. A) Imagen panorámica de la testa; la flecha indica el aérea donde hay concentraciones de Cd. B) célula de la epidermis de la testa. C) corte transversal de la semilla; a) testa, b) tejido nutritivo y c) cavidad embrionaria.

En cuanto al EDX, en las Tablas 12 y 13 se muestra el porcentaje en voltios de los elementos encontrados en la testa y en el tejido nutritivo, en donde no hay una diferencia aparente entre sitios. En esta ocasión no se evaluó el embrión debido a que eran semillas que ya habían germinado.

**Tabla 12.** Análisis EDX en semillas de *A. lechuguilla* de Villa de Zaragoza, tratadas con 100 ppm de cadmio.

	Testa	Tejido nutritivo
Elemento	%	%
<b>C</b>	57.63	22.97
<b>O</b>	32.85	10.5
<b>Cd</b>	6.88	0.88
<b>K</b>	0.24	0.48
<b>Ca</b>	1.68	3.06

**Tabla 13.** Análisis EDX en semillas de *A. lechuguilla* de Villa de la Paz, tratadas con 100 ppm de cadmio.

	Testa	Tejido nutritivo
Elemento	%	%
<b>C</b>	58.64	17.23
<b>O</b>	29.37	22.02
<b>Cd</b>	5.31	1.14
<b>K</b>	0.09	1.26

### 6.5 Análisis canónico discriminante

Las variables de respuesta que mostraron una diferencia significativa entre tratamientos de cadmio y entre sitios fueron la acumulación de cadmio en la Función discriminante 1 (autovalor = 2141.9734, proporción de variación = 0.9790,  $F = 48.73$ ,  $P = 0.001$ ), el porcentaje de germinación en la Función 2 (autovalor = 44.6558, proporción de la varianza = 0.0204,  $F = 10.44$ ,  $P = 0.001$ ) y el peso seco en la Función 3 (autovalor = 0.7095, proporción de la varianza = 0.003,  $F = 1.84$ ,  $P = 0.0032$ ). La longitud de la radícula en la Función 4 no fue significativa ( $F = 1.3$ ,  $P$

> 0.05), ni tampoco la eficiencia fotosintética en la Función 5 ( $F = 0.4501$ ,  $P > 0.05$ ).

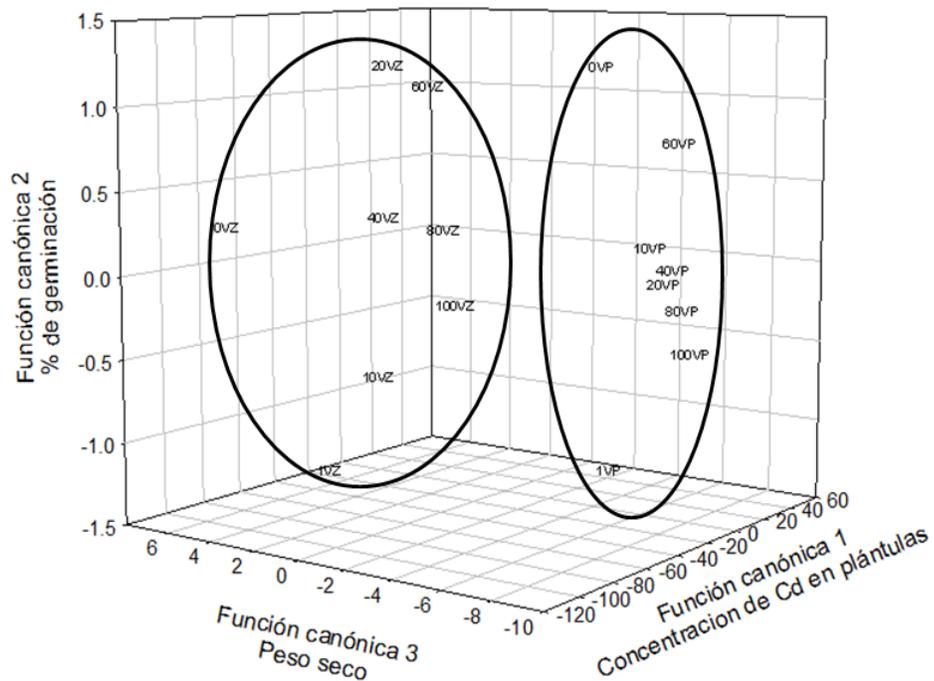
En la Tabla 14 se muestran las estructuras canónicas y en la Figura 13 se presenta el análisis canónico, en el cual se observa la distribución de cada uno de los tratamientos de ambos sitios, encontrándose claramente que hay diferencia entre sitios para la acumulación de cadmio, el porcentaje de germinación y el peso seco.

Para la acumulación de cadmio en plántulas (Función Canónica 1) se observó que las plántulas de Villa de Zaragoza tuvieron menor acumulación de cadmio en comparación con las de Villa de la Paz. En general, en ambos sitios se encontró que a mayor concentración de cadmio en las semillas fue mayor la acumulación de cadmio en las plántulas.

Para la Función Canónica 2 que describe el porcentaje de germinación se encontró mayor germinación en semillas de Villa de Zaragoza. Las semillas de este sitio tuvieron mayor germinación en los tratamientos de 20 y 60 ppm, el control tuvo un porcentaje de germinación intermedio, y en los tratamientos 1, 10, 40, 80 y 100 ppm hubo menor germinación. En las semillas de Villa de la Paz el control presentó el mayor porcentaje de germinación, seguida de 60 ppm, después 10, 20, 40, 80 y 100 ppm, y finalmente a 1 ppm se encontró la menor germinación.

Para la Función Canónica 3 que describe el peso seco ó biomasa de las plántulas, se encontraron diferencias entre sitios y entre tratamientos. En ambos sitios, en general, a mayor concentración de cadmio en las semillas fue menor la biomasa de las plántulas.

## Funciones canónicas



**Figura 13.** Funciones canónicas. Se muestra la distribución de los tratamientos y de los sitios, claramente separados. En la primera elipse se muestra el sitio menos contaminado (Villa de Zaragoza) representado con las letras VZ y el tratamiento correspondiente de igual manera la segunda elipse muestra el sitio contaminado (Villa de la Paz) con las letras VP.

El análisis discriminante clasificatorio mostró que los centroides de cada localidad y entre tratamientos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ) y el 100% de las observaciones se clasificaron correctamente.

**Tabla 14.** Estructuras canónicas entre grupos

<b>Variable</b>	<b>Can1</b>	<b>Can2</b>	<b>Can3</b>	<b>Can4</b>
<b>Germinación</b>	-0.16998	0.984694	0.012891	-0.01913
<b>Longitud</b>	-0.41888	0.454833	-0.02360	0.705117
<b>Peso seco</b>	-0.41888	0.298918	0.825367	-0.23129
<b>Acumulación de Cd</b>	0.999233	-0.03737	0.009194	0.001212
<b>Eficiencia fotosintética</b>	-0.14751	-0.18645	-0.00842	0.116145

En la Tabla 15 se muestra el porcentaje de clasificación estadística de los datos para cada tratamiento en el modelo estadístico utilizado, en donde la mayor diferencia se observa en los tratamientos control (0 ppm) y 100 ppm de cadmio, para ambos sitios.

**Tabla 15.** Porcentaje de clasificación de los datos en cada tratamiento.

<b>Localidad</b>	<b>%</b>
<b>0 VP</b>	80
<b>1 VP</b>	20
<b>10 VP</b>	20
<b>20 VP</b>	40
<b>40 VP</b>	20
<b>60 VP</b>	40
<b>80 VP</b>	20
<b>100 VP</b>	80
<b>0 VZ</b>	100
<b>1 VZ</b>	60
<b>10 VZ</b>	40
<b>20 VZ</b>	100
<b>40 VZ</b>	100
<b>60 VZ</b>	100
<b>80 VZ</b>	40
<b>100 VZ</b>	100

Entre ambas localidades se encontraron diferencias, así como entre tratamientos. Para el sitio de Villa de la Paz todos los tratamientos fueron diferentes, los tratamientos de 1 a 80 ppm de Cd no presentaron tanta diferencia

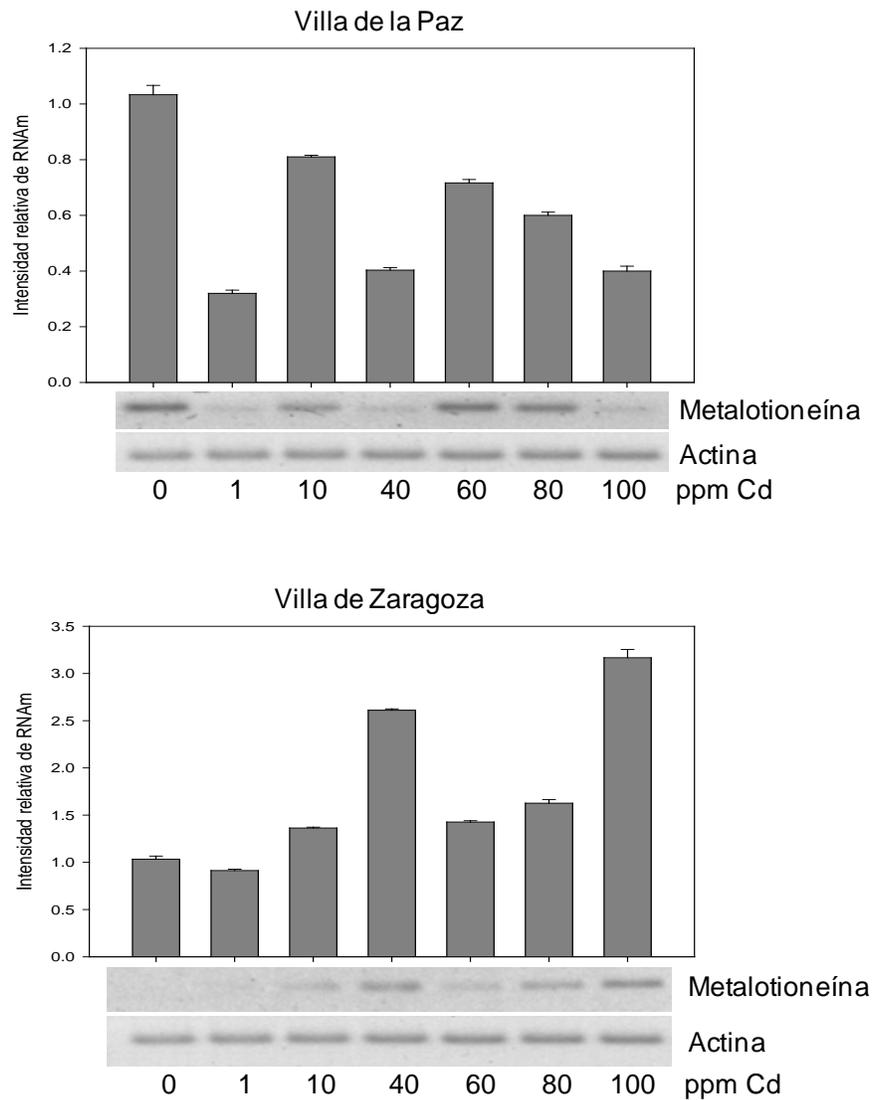
estadística entre tratamientos. El control y el tratamiento de 100 ppm presentaron mayor diferencia con los demás tratamientos.

En cuanto a las plántulas de Villa de Zaragoza, los tratamientos de 0, 20, 40, 60 y 100 ppm de Cd presentaron mayor diferencia con los demás, seguidos por el de 1 ppm y, finalmente, los tratamientos de 10 y 80 ppm de Cd.

### **6.6 Análisis de expresión diferencial del gen metalotioneína de *Agave lechuguilla***

Para confirmar la expresión diferencial del transcrito del gen de metalotioneína (*MT*) de *A. lechuguilla* de las dos localidades, se seleccionaron plántulas para evaluar la acumulación de este transcrito mediante experimentos de RT-PCR. Para realizar los estudios de expresión génica se utilizaron dos experimentos independientes, procediéndose a realizar tres repeticiones técnicas de cada determinación. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron optimizadas para no producir una saturación en la acumulación de los productos de PCR, manteniendo una relación lineal con los niveles originales del transcrito en todas las muestras. Las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores obtenidos fueron normalizados con el gen constitutivo que codifica para una actina (Figura 14), utilizando 30 ciclos de PCR.

Para la localidad contaminada de Villa de la Paz, se observa una fuerte expresión en la muestra control. Sin embargo, en las plántulas expuestas a distintas concentraciones de Cd se observa que la expresión de *MT* disminuye con respecto al control. De manera contraria, para las plántulas de Villa de Zaragoza no contaminadas con Cd se presenta un incremento gradual conforme se aumenta la concentración de Cd. El aumento del transcrito tuvo valores relativos de intensidad de RNA mensajero de hasta tres veces más altos que el control en la concentración mayor (Figura 14).



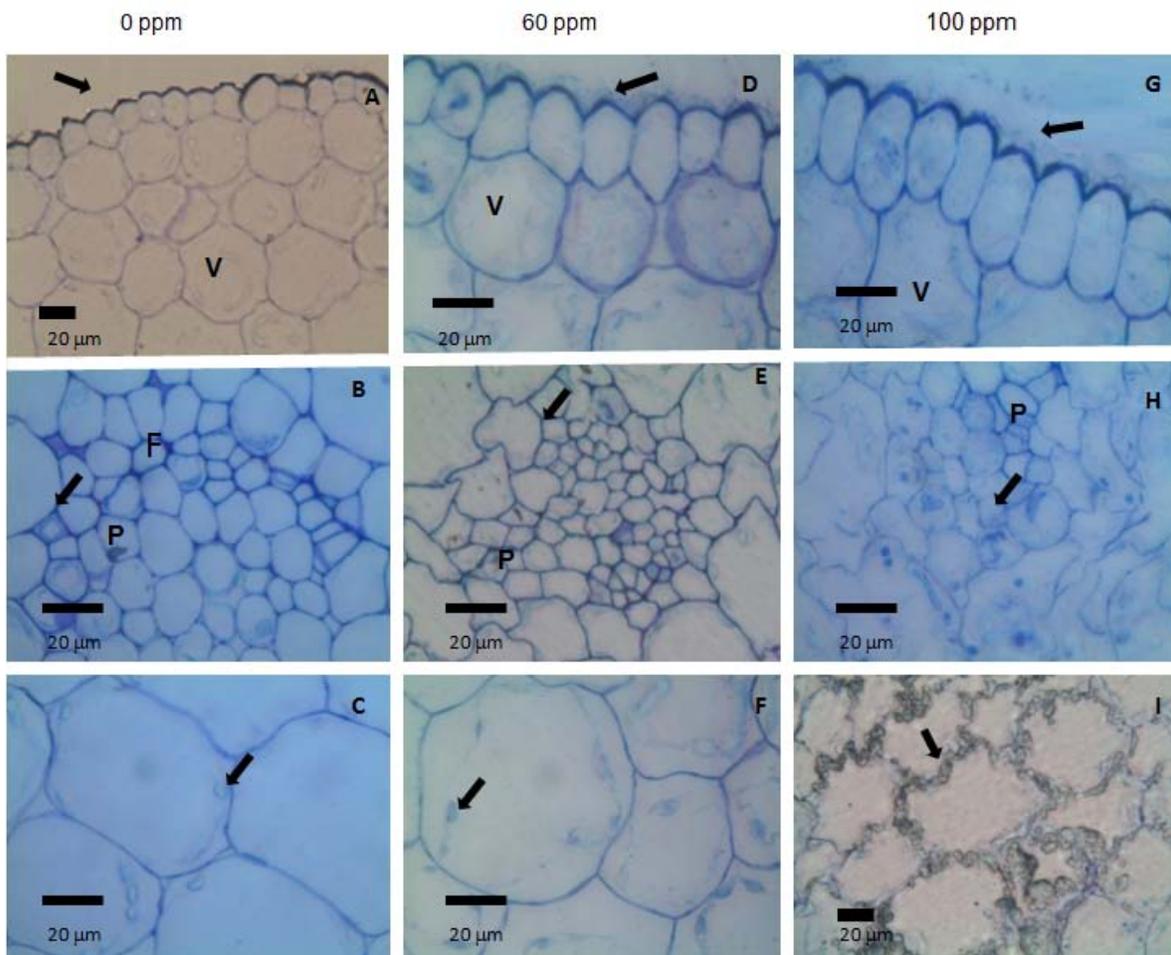
**Figura 14.** Expresión diferencial del gen de metalotioneína (*MT*) de plántulas de *Agave lechuguilla* de dos localidades, Villa de la Paz (sitio expuesto a Cd) y Villa de Zaragoza (sitio sin exposición a Cd). Como control de carga se empleó el gen de actina

## 6.7 Daño estructural en meristemo

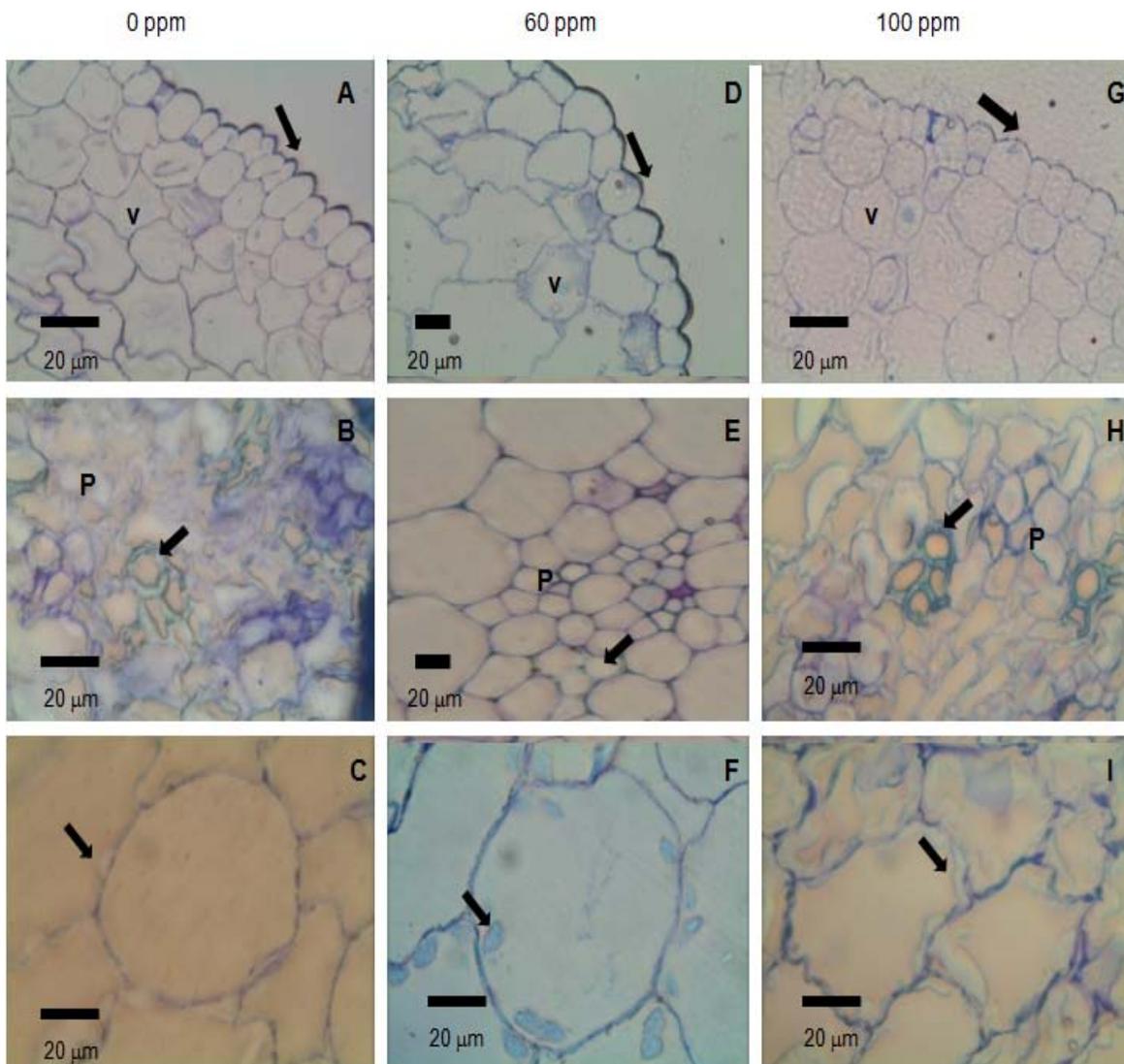
En las Figuras 16 y 17 se muestran los cortes anatómicos de las plántulas de los sitios Villa de Zaragoza y Villa de la Paz respectivamente, tratadas con distintas concentraciones de cadmio, en los cuales se analizaron las células de la epidermis, haces vasculares y gránulos de almidón. Se encontraron daños en la epidermis como adelgazamiento de la pared celular y malformaciones de las células. En general, a mayor concentración de cadmio mayor es el daño causado en las células. Asimismo, se encontró una prematura lignificación de los vasos del xilema y se notó la presencia de numerosos gránulos de almidón.

La epidermis está formada por una hilera de células rectangulares con las paredes engrosadas y más engrosadas en la pared periclinal externa, agregadas en un patrón uniforme y cubiertas por la cutícula. En la epidermis de las plántulas de Villa de Zaragoza se mantiene esta tendencia, mientras que en las de Villa de la Paz la pared va adelgazando conforme se aumenta la concentración del cadmio. Además, el tejido de parénquima fundamental está ocupando la región que rodea a los haces vasculares y está formado por las células de parénquima de mayor tamaño, con paredes delgadas y que presentan gránulos de almidón en el interior. Las células de parénquima son redondeadas con forma regular y paredes delgadas, observándose espacios intercelulares, pero al aumentar la concentración de cadmio, se observan de forma menos regular y con ángulos en las paredes, disminuyendo los espacios intercelulares, hasta que en las de mayor concentración de cadmio, se observan de forma irregular, con paredes plegadas, menor tamaño y sin espacios intercelulares. En todos se observó la presencia de gránulos de almidón.

En células de plántulas del sitio Villa de Zaragoza y Villa de la Paz se encontró que a mayor concentración de cadmio, mayor es la longitud de los gránulos de almidón. Sin embargo, en células del sitio Villa de la Paz los gránulos de almidón poseen una mayor dimensión en el tratamiento control en comparación con el sitio Villa de Zaragoza.



**Figura 15.** Cortes anatómicos de plántulas de *Agave lechuguilla* del sitio de Villa de Zaragoza. 0 ppm A: pared anticlinal de células de la epidermis, muestra engrosamiento normal (flecha), vacuola (V); B: haz vascular, vasos del xilema (V), procambium (P); C: célula de parénquima en la que se muestran gránulos de almidón (flecha). Tratamiento de 60 ppm D: Pared anticlinal, células irregulares de la epidermis, con engrosamiento normal (flecha), vacuola (V); E: haz vascular, vaso del xilema prematuramente lignificado (flecha), procambium (P); F: célula de parénquima en la que se muestran gránulos de almidón (flecha). Tratamiento de 100 ppm G: pared anticlinal de células de la epidermis (Flecha); H: haz vascular, vaso del xilema prematuramente lignificado (Flecha), procambium (P). I: célula irregular de parénquima con abundantes gránulos de almidón (flecha).



**Figura 16.** Cortes anatómicos transversales de plántulas de *Agave lechuguilla* del sitio de Villa de la Paz. Tratamiento control 0 ppm A: células regulares de la epidermis (flecha), vacuola (V); B: haz vascular, vasos del xilema (flecha), procambium (P); C: célula de parénquima en la que se muestra gránulo de almidón (flecha). Tratamiento de 60 ppm de cadmio D: células de epidermis irregulares (flecha), vacuola (V); E: haz vascular, vaso del xilema prematuramente lignificado (flecha), procambium (P); F: célula de parénquima en la que se muestra gránulo de almidón (flecha). Tratamiento de 100 ppm de cadmio G: células de la epidermis con malformaciones (flecha); H: haz vascular, vaso del xilema prematuramente lignificado (flecha); I: célula del parénquima con gránulos de almidón (flecha).

En la Tabla 16 se muestran los promedios de las dimensiones (longitud y ancho) de los gránulos de almidón, así como sus errores estándar.

**Tabla 16.** Longitud de los gránulos de almidón (promedio  $\pm$  error estándar) en células de plántulas de lechuguilla provenientes de Villa de Zaragoza y de Villa de la Paz, bajo distintas concentraciones de cadmio.

Tratamiento	Localidad	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	EE	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	EE
<b>0 ppm</b>	Villa de Zaragoza	1.513	0.1820	1.184	0.132
<b>60 ppm</b>		1.628	0.286	1.122	0.083
<b>100 ppm</b>		1.916	0.239	1.136	0.138
<b>0 ppm</b>	Villa de la Paz	2.441	0.552	1.513	0.547
<b>60 ppm</b>		2.809	0.178	1.432	0.419
<b>100 ppm</b>		2.854	0.195	0.953	0.070

En los haces vasculares se observan las células de procambium, floema y xilema. Las células de procambium se observan regulares y sin evidencia de alteraciones, sin embargo los vasos del metaxilema son de menor tamaño que los del protoxilema, ya que sus paredes se lignifican prematuramente. En comparación, en las células del floema no se observan alteraciones evidentes, presentando elementos de tubo criboso y células acompañantes sin evidencia de alteraciones.

## 7. Discusión

En este estudio se obtuvieron resultados contrastantes entre un sitio contaminado por metales pesados, Villa de la Paz, y uno no contaminado, Villa de Zaragoza. El análisis químico del suelo demuestra que en Villa de Zaragoza no hay contaminación elevada de metales, y esto puede deberse a que en la zona no hay actividad minera o industrial cerca que contamine el lugar. Por otra parte, para la región de Villa de la Paz, sitio de explotación minera por más de 200 años, se reportó la presencia de altas concentraciones de arsénico, plomo, cadmio, cobre y zinc (Razo, 2006), lo cual confirma la contaminación del suelo de este sitio.

En cuanto al análisis químico de las semillas, se encontró que las provenientes de Villa de la Paz tienen altos contenido de metales pesados como aluminio, cadmio, cobre, silicio, estroncio y zinc. En cambio, las semillas de Villa de Zaragoza solamente contenían aluminio, cobre y zinc, pero en concentraciones menores en comparación con las encontradas en las de Villa de la Paz. La mayoría de los metales encontrados en las semillas de este último sitio, son característicos de la contaminación por la actividad minera (Razo, 2006).

Es probable que la contaminación en Villa de la Paz esté afectando a las plantas de *Agave lechuguilla* de la región, debido a que la viabilidad de las semillas colectadas fue de 45%, mientras que en las semillas del sitio Villa de Zaragoza la viabilidad fue de 80 %. Estos resultados corroboran lo sugerido por Kranner y Colville (*en prensa*) en su revisión sobre implicaciones e importancia de la germinación de semillas bajo estrés por metales pesados, que las plantas madre al estar expuestas a altas concentraciones de metales pesados, presentan disminución en la eficiencia de la viabilidad de las semillas.

Continuando con la caracterización de semillas, el análisis FTIR reportó la presencia de varios grupos funcionales que se encuentran en la estructura química de las células de las semillas de *A. lechuguilla*, probablemente proteínas, enzimas, azúcares, como fue encontrado por Wei *et al.* (2009) para hojas del trébol *Trifolium alpinum* tratadas con 15 ppm de cloruro de cadmio. Es probable que estos grupos funcionales pudiesen interactuar con el cadmio por medio de

enlaces electrostáticos o covalentes, por lo que el cadmio pudiese estar formando complejos con otras moléculas presentes en las células como las metalotioneinas que se produjeron por el estrés. Así, en el desarrollo de la plántula, el cadmio en complejo con la metalotioneína u otras moléculas pudiese distribuirse por toda la plántula quedándose en su estructura, como lo ha reportado Clemens (2006), en sus investigaciones sobre la toxicidad de los metales y mecanismos de tolerancia en las plantas.

Las variables de respuesta que mostraron una diferencia significativa entre tratamientos de cadmio y entre sitios con diferente nivel de contaminación fueron la acumulación de cadmio en las plántulas, el porcentaje de germinación y el peso seco ó biomasa de las plántulas.

Las plántulas de Villa de Zaragoza tuvieron menor acumulación de cadmio en comparación con las de Villa de la Paz, y esta respuesta está relacionada con la concentración de cadmio encontrado en el suelo y en la estructura de las semillas. Sin embargo, para Villa de Zaragoza la respuesta fue muy diferente, pues los tratamientos de 1, 10, 40, 80 y 100 ppm presentaron menor acumulación de cadmio y los tratamientos de 20 y 60 ppm acumularon más cadmio. Es probable que esta respuesta se deba a que las plántulas de estos tratamientos presentaron mayor biomasa, lo que permitió que acumularan más cadmio.

En general, la germinación fue más alta en semillas del sitio menos contaminado, Villa de Zaragoza, lo contrario a la hipótesis planteada; es decir, que se esperaba que las semillas del sitio contaminado estuvieran adaptadas a la contaminación y que, por lo tanto, germinaran en mayor porcentaje. En las semillas de Villa de la Paz el control presentó el mayor porcentaje de germinación, seguida de 60 ppm, después 10, 20, 40, 80 y 100 ppm, y finalmente a 1 ppm se encontró la menor germinación. Los resultados para los tratamientos de 60 ppm y 1 ppm están relacionados con el peso de sus plántulas, ya que las plántulas del primer tratamiento fueron las de mayor peso y las de 1 ppm las de menor peso. Por otra parte, las semillas de Villa de Zaragoza tuvieron mayor germinación en los tratamientos de 20 y 60 ppm, y las plántulas de estos tratamientos presentaron mayor peso, lo que permitió que tuvieran mayor capacidad para tomar nutrientes.

Al parecer, las plántulas más grandes presentan mayor tolerancia a metales pesados que las más pequeñas.

La longitud de la radícula no se afectó por las concentraciones de cadmio en ninguno de los sitios. Sin embargo, es necesario realizar estudios más a fondo en los que se evalúen mayores tiempos de exposición al cadmio, con el fin de determinar si se afecta la longitud de la radícula.

La eficiencia fotosintética de las plántulas tampoco fue afectada por las concentraciones de cadmio, pero en general fue baja. Este resultado nos sugiere que las plántulas siguen fotosintetizando, aunque a niveles más bajos del óptimo (Pessarakli, 2005). Es probable que el tiempo de exposición de las plántulas al cadmio no haya sido el suficiente para causar un efecto inhibitorio sobre el aparato fotosintético en las plántulas, puesto que se ha reportado que el cadmio reduce los cloroplastos e inhibe la clorofila (Barylá *et al.*, 2001; Pessarakli, 2005).

Las plántulas tratadas con mayor concentración de cadmio presentaron crecimiento anormal (“encorvamiento”) en la parte de la plúmula. Este resultado se debe a que el xilema no se desarrolló adecuadamente, ya que el cadmio induce la lignificación prematura del xilema (Durceková y Huttová, 2007). El xilema es una estructura de soporte para la plántula (Paniagua, 2002) y al no desarrollarse adecuadamente origina el crecimiento anormal en las plántulas.

Otras respuestas encontradas en plántulas tratadas con mayor concentración de cadmio son senescencia celular, clorosis y reducción del crecimiento de la plántula (Di Toppi, 1999; Prasad, 2003; Draic y Mihailovic, 2005; Ferjani, 2005; Pomponi, 2006; Pernia *et al.*, 2008). Así, se confirma que el cadmio está afectando directamente a las plántulas.

En el caso de la clorosis, estudios con plántulas de *Brassica napus* indican que tal respuesta se puede atribuir a la reducción del número de cloroplastos causado por la falta de división celular que ocurre por las altas concentraciones de cadmio (Barylá, 2001). Otros estudios sugieren que en concentraciones elevadas de cadmio, este metal también puede interferir con la síntesis de la clorofila mediante la disminución de micronutrientes, como el hierro (Fe), además de disminuir la toma del agua, lo cual está originando la clorosis en las plántulas

(Sharma *et al.*, 1985; Balsberg y Pålsson, 1989; Van Assche y Clijsters, 1990; Ebbs y Uchil, 2008).

La senescencia celular se atribuye a que el sistema vascular no se está desarrollando adecuadamente, por lo cual no moviliza la cantidad de agua necesaria para la fotosíntesis y desarrollo de la planta (Durgeková y Huttová, 2007). Además, el cadmio afecta directamente a la homeostasis celular, debido a que inhibe el grupo sulfidrilo SH de las enzimas redox que regulan las plantas con el medio externo (Schützendübel y Polle, 2002).

En el FTIR, se observó claramente como los picos de los grupos funcionales aminas, amidas, carboxilos y alquenos van desapareciendo conforme se aumenta la concentración de cadmio. Este resultado indica que el cadmio está interactuando con los grupos funcionales por medio de enlaces covalentes y electrostáticos, lo cual ocasiona la disminución de la expresión de éstos. Se ha reportado que el cadmio se une a grupos oxigenados y nitrogenados en su estructura, como son los grupos amino y carboxilo (Nieboer y Richardson, 1980). Incluso, la interacción del cadmio con ligandos puede ser distinta en la raíz y en el tallo; por ejemplo, Salt *et al.* (1995) encontraron interacción de ligandos con oxígeno y nitrógeno en el xilema y con ligandos de azufre en las raíces.

Algunas proteínas poseen alto contenido de cisteínas en su estructura; por ejemplo, la metalotioneína, la cual en su estructura química contiene grupos funcionales como aminas, amidas, carboxilos, entre otros, por lo que puede quelar al cadmio mediante enlaces covalentes y electrostáticos (Wei *et al.*, 2009; Kranner y Colville, *en prensa*). Tales grupos funcionales quedan enlazados al cadmio, razón por lo cual se presenta la inhibición de los mismos. Así, a mayor concentración de cadmio, mayores son los enlaces que se producen con los grupos funcionales, inhibiendo la expresión de éstos.

Existen estudios que confirman la expresión del gen de la metalotioneína cuando se estresan las plántulas con metales como el cadmio (Kranner y Colville, *en prensa*). En esta investigación, para la localidad contaminada de Villa de la Paz se observa una fuerte expresión de *MT* en la muestra control. Sin embargo, en las plántulas expuestas a distintas concentraciones de cadmio se observa que la

expresión de *MT* disminuye con respecto al control. Tal respuesta puede deberse a que las semillas de esta localidad ya contenían metales pesados en su estructura, por lo cual las plántulas acumularon más cadmio que las de Villa de Zaragoza. Así, es probable que haya sido demasiado el estrés causado por el cadmio y poco el tiempo dado a las plántulas para que produjeran más *MTs*. De manera contraria, para las plántulas de Villa de Zaragoza se presenta un incremento gradual conforme se aumenta la concentración de cadmio. Este resultado es similar al obtenido por Cobbet y Goldsbrough (2002) en semillas de *Arabidopsis* bajo diferentes concentraciones de cadmio y zinc.

Por otra parte, se detectó porosidad en la testa de las semillas tratadas con cadmio a 100 ppm, así como en su tejido nutritivo, debido a que el embrión utilizó el contenido del tejido nutritivo para establecerse como plántula y hubo degradación de los compuestos presentes en la epidermis, como pueden ser ceras, proteínas, entre otros compuestos orgánicos.

También se obtuvieron diferencias en la estructura anatómica de las células por efecto del cadmio. Se encontraron células malformadas (*i.e.* células de la epidermis), debido que las células de la epidermis son el primer tejido en donde el metal tiene contacto. Asimismo, se encontró que a mayor concentración de cadmio, las células presentan una vacuola más grande donde almacenan el cadmio, similar a lo reportado por Clemens (2006). También se encontraron diferencias entre sitios, puesto que el mayor daño anatómico se encontró en plántulas de Villa de la Paz, donde en concentraciones de 100 ppm de cadmio, las células de la epidermis se desorganizaron, además de que presentaron malformaciones. En contraste, en las plántulas de Villa de Zaragoza tratadas con 100 ppm de cadmio, la epidermis estaba bien organizada y alineada, aunque con malformaciones de algunas células

Se puede decir que el cadmio está interfiriendo en la vascularización de las plántulas en la más alta concentración de cadmio, debido a que los vasos xilemáticos presentan menor diámetro en comparación con los de las plántulas del tratamiento control. Lo anterior es debido a que cuando la plántula es sometida a estrés, los vasos del xilema se lignifican prematuramente, impidiendo su desarrollo

normal y expansión completa (Böhm *et al.*, 2006; Durceková y Huttová, 2007). Se encontró también que el xilema presenta mayor daño por metales pesados que el floema, debido a que el cadmio ingresa directo al xilema en forma de ion  $Cd^{2+}$  o como complejo con algunas proteínas (metalotioneinas, fitoquelatina o GSH) (Clemens, 2006), mientras que al floema llega unido con azúcares, sin que afecte evidentemente esta estructura. Así, es probable que el cadmio esté ingresando a la plántula por vía simplástica, hasta alcanzar el xilema; después se incorpora al xilema, se une a fotosintatos, azúcares y demás compuestos y, finalmente, por esta vía llega al floema (Laszlo, 1994; Stacey *et al.*, 2008).

## 8. Conclusiones

Las semillas de *Agave lechuguilla* de Villa de la Paz (sitio contaminado por metales pesados) presentaron menor viabilidad, debido probablemente a la mayor concentración de metales presente en sus tejidos en comparación con las semillas de Villa de Zaragoza. Además, las plántulas de Villa de la Paz presentaron menor germinación y menor biomasa de plántulas, además de mayor acumulación de cadmio. La longitud de la radícula y la fluorescencia de la clorofila no fueron afectadas por los tratamientos.

De manera similar, la expresión del gen de la metalotioneína fue mayor en plántulas de Villa de la Paz. En las plántulas de Villa de Zaragoza, la expresión de *MTs* no se encontró en el control solo en los demás tratamiento con cadmio. Así, se puede decir que la contaminación del sitio de Villa de la Paz estresa a las plántulas y origina la expresión de *MTs*.

Las altas concentraciones de cadmio hicieron que se produjeran mayores enlaces con grupos funcionales perteneciente a estructuras de diferentes moléculas como *MTs*, por lo que el cadmio está interfiriendo en la expresión de los grupos funcionales debido que a mayor concentración mayor serán los enlaces que se den, inhibiendo la expresión de estos grupos.

Por otro lado, se encontró mayor daño anatómico en las plántulas de Villa de la Paz con mayor concentración de cadmio, con malformaciones en las células de la epidermis y con pared celular de la epidermis más delgada en orientación periclinal. Estas malformaciones fueron incrementando conforme aumentó la concentración de cadmio. Por lo tanto, las plántulas provenientes de Villa de la Paz fueron las más vulnerables. Así, la contaminación por cadmio afecta de manera negativa la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas de *A. lechuguilla*.

## 9. Perspectivas

Los resultados de este estudio nos dicen que la contaminación por cadmio afecta a semillas y plántulas de *Agave lechuguilla*, una especie cuyas plantas adultas son consideradas como tolerantes a metales pesados. Por lo tanto, estos resultados se deberían tomar en cuenta en planes de manejo de la especie en sitios contaminados por cadmio.

Las plantas de *Agave lechuguilla* se reproducen de manera asexual, principalmente; es decir, de manera vegetativa. Podría pensarse que al no ser tan común la reproducción sexual (por semillas) no se verían afectadas las poblaciones de esta especie en zonas mineras; sin embargo, la reproducción sexual es muy importante porque promueve el intercambio genético. Así, el cadmio en semillas y plántulas podría afectar las poblaciones de esta especie.

Los resultados obtenidos son por demás interesantes y dan pie a futuras investigaciones sobre el efecto del cadmio en plántulas de *A. lechuguilla*. Por ejemplo, evaluar el daño causado en el meristemo, con el fin de determinar exactamente qué está pasando con el cadmio dentro de las células. También se podría determinar cuáles son las rutas de entrada del cadmio a la planta, cuáles son las vías que utiliza este metal para movilizarse a toda la planta, ya que se ha propuesto que se moviliza por vía floema (Uraguchi *et al.*, 2009), determinar los complejos químicos que se forman con el cadmio y su ruta de movilización, así como determinar la cantidad de proteínas que actúan como quelantes del cadmio, como una medida de desintoxicación de la planta.

## 10. Bibliografía

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. & Barberis, R. 2002. Distribution and mobility of metals in contaminated sites. chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution*, **119**,177-187
- Aldrich M., Gardea-Torresdey J., Peralta-Videa J. & Parsons J. 2003. Uptake and reduction of Cr(VI) to Cr(III) by mesquite (*Prosopis spp.*): Chromate-Plant interaction in hydroponics and solid media studied using XAS. *Environmental Science of Technology*, **37**, 1859–1864.
- Aldrich M.V., Peralta-Videa J.R., Parsonsa J.G. & Gardea-Torresdey J.L. 2007. Examination of arsenic(III) and (V) uptake by the desert plant species mesquite (*Prosopis spp.*) using X-ray absorption spectroscopy. *Science of the Total Environment* **379**, 249-255.
- Azcón-Bieto J. & Talón M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal .Ed. McGrawHill/Interamericana. Barcelona. 245-260.
- Baker A. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3: 643-654.
- Balsberg Pålsson, A. 1989.Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air & Soil Pollution* **47**, 287- 319.
- Banat K., Howari F. & Al-Hamad A. 2005. Heavy metals in urban soils of central Jordan: Should we worry about their environmental risks. *Environmental Research* **97**, 258-273.
- Barceló J., Poschenrieder C., Andreu I. & Gunse B.1986. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Contender). I. Effects on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *Journal Plant Physiology* **125**, 17-25.
- Baryla A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C. & Havaux M. 2001. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**, 696-709.
- Baskin C. & Baskin JM. 1998. Seeds. Ecology Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego Academic Press.

- Benavides M., Gallego S. & Tomaro M. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**, 21-34.
- Böhm P., Zanardo L., Ferrarese L. & Ferrarese-Filho O. 2006. Peroxidase activity and lignification in soybean growth-inhibition by juglone. *Biologia Plantarum* **50**, 315–317.
- Buendía-González L., Orozco-Villafuerte J., Cruz-Sosa F., Barrera-Díaz C.E., & Vernon-Carter E.J. 2010. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology* **101**, 5862-5867.
- Castro L.J., Kramar U. & Puchelt H. 1997. 200 year of mining activities at La Paz/San Luis Potosi/ Mexico: consequences for environment and geochemical exploration. *Journal of Geochemical Exploration* **58**, 81-94.
- Casierra-Posada F., Cardenas-Hernandez J., Julian F. & Roa H. 2008. Effect of aluminium on weath (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) seed germination. *Orinoquia* **12**, 45-56.
- Catanese V., Siracusa V., Campiotti C.A., Saiano F. & Alonzo G. 2006. Germination responses of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. on a heavy metal polluted substrate. *Journal of Geophysical Research* **8**, 35-49.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochemie* **88**, 1707-1719
- Cobbett C. & Goldsbrough P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 159–182.
- De la Rosa G., Peralta-Videa J., Montes M., Pearson J., Cano-Aguilera I. & Gardea-Torresdey J. 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* **55**, 1159-1168.
- Drazic G. & Mihailovic N. 2005. Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Science* **168**, 511-517.
- Drazkiewicz M., Tukendorf A. & Baszynski T. 2003. Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: Effect on chlorophyll

- fluorescence and phytochelatin accumulation. *Journal of Plant Physiology* **160**, 247-254.
- Di Salvatore M., Carafa A.M. & G. Carratú. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* **73**, 1461- 1464.
- Di Toppi L. & Gabrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**, 105- 130.
- Durcekova K. & Huttova E. 2007. Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant & Soil* **290**, 61–68.
- Ebbs S. & Uchil S. 2008. Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b. *Photosynthetica* **46**, 49-55.
- Eguiarte I., Souza V, & Silva-Montellano A. 2003. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **66**, 131–150.
- García, I. & Dorronsoro, C. 2005. Contaminación por Metales Pesados en Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.ugr.es>.
- Gardea-Torresdey J.L., Hernandez A., Tiemann K.J., Bibb J. & Rodriguez O. 1998. Adsorption of toxic metal ions from solution by inactivated cells of *Larrea tridentata* (Cresotee bush). *Journal of Hazardous Substance Research* **1**, 1-16.
- Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann K. J., Gamez G., Dokken K., Cano-Aguilera I., Renner M. W. & Furenlid L. R. 2000. Reduction and accumulation of gold (III) by *Medicago sativa* Alfalfa biomass: X-ray Absorption Spectroscopy, pH, and Temperature Dependence, *Environmental Science Technology* **34**, 4392-4396.
- Gardea-Torresdey J. L., Gomez E., Peralta-Videa J., Parsons J., Troiani H. & Yacaman M. 2003. Alfalfa Sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir* **19**, 1357–1361.

- Gardea-Torresdey J. L., Aldrich M.V., Peralta-Videa J. & Parsons J.G. 2004. Reduction of health risks due to chromium (VI) using mesquite: a potential Cr phytoremediator. *Symposia Papers Presented Before the Division of Environmental Chemistry American Chemical Society* **53**, 1-11.
- Gardea-Torresdey J., Parsons J.E., Gomez E., Peralta-Videa J., Troiani E & Yacaman J. 2002. Formation and growth of Au nanoparticles inside live Alfalfa Plants. *Nano Letters* **4**, 397-412.
- Goldstein J.I, Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori C. & Lifshin E. 1992. Scanning electron microscopy & X-Ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, & geologists. Nueva York-Londres: *Kluwer Academic Publications*. 23: 134-146
- González D.J. 2006. *Riesgo ecológico en la zona minera de Villa de la Paz, San Luis Potosí*. Tesis de maestría del Programa multidisciplinario de ciencias ambientales de la Universidad Autonoma de San Luis Potosi UASLP.
- González-Salvatierra C. 2009. *Antioxidantes y fotoprotección en dos especies con metabolismo ácido de las crasuláceas en una selva baja de Yucatán*. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), pp. 144-145.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 2008. Síntesis geográfica del estado de San Luis Potosí, México.
- Hall J. L y Williams L. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2601-2613.
- Hamer D. 1985. Metallothionein. *Anual Review of Biochemistry* **55**, 913-951.
- Haque N., Peralta-Videa J.R., Duarte-Gardea M. & Gardea-Torresdey J.L. 2009. Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial sedes. *Bioresource Technology* **100**, 6177–6182.
- Helfferich F. 1995. Ion exchange. *Dover publications INC*. New York.
- Jamal S.N., Zafar Iqbal M. & Athar M. 2006a. Effect of aluminum and chromium on the growth and germination of mesquite (*Prosopis juliflora* swartz) DC. *International Journal of Environmental Science and Technology* **3**, 173-176.

- Jamal S.N., Zafar Iqbal M. & Athar M. 2006b. Phytotoxic effect of aluminum and chromium on the germination and early growth of wheat (*Triticum aestivum*) varieties Anmol and Kiran. *Environmental Science and Technology* **3**, 411-416.
- Kabir M., Zafar Iqbal M., Shafiq M. & Farooqi Z.R. 2008. Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatment. *Department of Botany, University of Karachi* **40**, 2419-2426.
- Kagi J.H. & Shaffer A. 1991. Biochemistry of metallothionein. *Perspectives in Biochemistry* **3**, 46-52.
- Karin M. 1985. Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell* **4**: 9-10.
- Kranner I. & Colville L. *In press*. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*.
- Laszlo, J.A., 1994. Changes in soybean fruit  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Sr}^{2+}$ ) and  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ) transport ability during development. *Plant Physiology* **104**, 937-944.
- Li W., Khan M. A., Yamaguchi S. & Kamiya Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **46**, 45-50.
- Liu M., Li P.J., Qi X.M., Zhou Q.X., Zheng L., Sun T.H. & Yang Y.S. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD análisis. *Chemosphere* **61**, 158-167.
- Llugany M., Tolrá M., Poschnrieder C. & Barceló J. 2007. Hiperacumulación de metales: ¿Una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente* **16**: 56-68.
- Monroy M., Díaz Barriga M.F., Razo I. & Carrizales L. 2002. *Evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados (Pb, Cu, Zn) y análisis de riesgo en salud en Villa de la Paz-Matehuala S.L.P.* Tesis de maestría del Instituto de Metalurgia Universidad Autónoma de San Luis Potosí, UASLP.

- Nieboer E. & Richardson D.S. 1980. The replacement of the nondescript term “heavy metal” by a biologically significant and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution* **1**, 3-26.
- Nobel P. & Quero E. 1986. Environmental productivity indices for a Chihuahuan Desert CAM plant, *Agave lechuguilla*. *Ecology* **67**, 1-11.
- Pando-Moreno M., Pulido R., Castillo D., Jurado E. & Jiménez J. 2008. Estimating fiber for lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr., Agavaceae), a traditional non-timber forest product in Mexico. *Forest Ecology and Management* **255**, 3686-3690.
- Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Álvarez-Uría M., Fraile B., Anadon. R y Saez F. 2002. Citología e histología vegetal y animal. McGraw –Hill interamericana, Tercera edición.
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey J.L., Tiemann K.J., Gomez E. & S. Arteaga et al., 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* **66**, 727-734.
- Pernia B., Sousa A., Reyes R. & Castillo M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia* **32**: 24-26.
- Pietrini F., Lannelli M.A., Pasqualini S. & Massacci A. 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology* **133**, 829-837.
- Pires-da-Silva A., Imhoff S., Giarola N.F.B & Tormena C. 2001. Análisis multivariado y univariado en la discriminación de sistemas de uso de suelo del centro de Santa Fe. *Edafología* **8**, 21-34
- Prasad M., Malec P., Waloszek A, Bojko M. & Strzałka K. 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to bioaccumulation. *Plant Science* **161**, 881-889.
- Polle A. & Schützendübel A. 2003. Heavy metal signalling in plants: linking cellular and organismic responses. *Topics in Current Genetics* **4**, 187- 214.
- Pomponi M., Censi V., Di Girolamo V., De Paolis A., Di Toppi L., Aromolo R., Costantino P. & Cardarelli M .2006. Overexpression of *Arabidopsis*

- phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd<sup>2+</sup> tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* **223**, 180-190.
- Pessaraki, M. 2005. Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker, New York.
- Rai V., Khatoon S., Bisht S.S. & Mehrotra S. 2005. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Ton. *Chemosphere* **61**, 1644-1650.
- Razo S.I. 2006. Identificación de áreas prioritarias de restauración de suelo contaminado por arsénico y metales pesados en el sitio minero y metalúrgico de Villa de la Paz-Matehuala, SLP (México). Tesis de doctorado en ciencias ambientales del Programa Multidisciplinario en Ciencias Ambientales de la Universidad Aautonoma de San Luis Potosí, UASLP.
- Rodríguez-Serrano M., Martínez-de la Casa M, Romero-Puertas M, del Río L & Sandalio L. 2008. Toxicidad de cadmio en plantas. *Ecosistemas* **17**,139-146.
- Romero-González J., Peralta-Videa J.R., Rodríguez E., Delgado M. & Gardea-Torresdey J.L. 2006. Potential of *Agave lechuguilla* biomass for Cr(III) removal from aqueous solutions: Thermodynamic studies. *Bioresource Technology* **97**, 178-182.
- Salt D.E., Smith, R.D. & Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643–668.
- SAS/Institute. 1999. SAS/STAT User's guide version 8. Cary, N.C.: SAS Institute Inc
- Sauquillo A., Rigol A. & Rauret G. 2003. Overview of the use of Leaching Extraction Tests for Risk Assessment of Trace Metals in Contaminated Soils and Sediments. *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 152-159.
- Sauvé S., Hendershot W. & Herbert E. 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology* **34**, 1125-1131.
- Servicio Geológico Mexicano (SGM). 2008. Panorama Minero del estado de San Luis Potosí, pp. 31-50.

- Silva-Montellano A. y Eguiarte L. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* **90**, 700-706.
- Sistema Nacional para la Reforestación (SIRE), CONAFOR. 2000. fichas técnicas para la reforestación. <http://www.conafor.gob.mx/portal/SIRE>
- Stacey M.G., Patel A., McClain W.E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers E.E., Gassmann W., Blevins D.G. & Stacey G., 2008. The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology* **146**, 589–601.
- Street R. A., Kulkarni M.G., Stirk W.A., Southway C. & Van Staden, J., 2007. Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to Hyacinthaceae. *Environmental Contamination and Toxicology* **79**, 371–376.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 2000. Mining and sustainable development II. *Challenges and perspectives, Industry and Environment*.
- Uraguchi S., Mori S., Kuramata M., Kawasaki A., Arao T. & Ishikawa, S. 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot 1260 and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2677–2688.
- Van Assche F. & Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environmental* **13**, 195-106.
- Weigel H. & Jäger H. 1980. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. *Plant Physiology* **65**, 480-482.
- Xiong Z.T. & Peng Y.H. 2001. Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special reference to low concentration exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **48**, 51-55.
- Yañez-Espinosa L., Angeles G., López-Portillo J. & Barrales S. 2009. Variación anatómica de la madera de *Avicennia germinans* en la Laguna de la Mancha, Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **85**, 7-15.

Zhou J. & Goldsbroug P. 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics* **248**, 318-328.

Zhou W, Qiu B. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Science* **169**, 737-745.