

Análisis de la absorción de cadmio por *Leucaena leucocephala* en presencia de fitohormonas utilizando la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES)

Por

Efraín Salas Vázquez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
en
Química

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2018

Tesis aprobada por:

Martha L. López Moreno, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Carmen A. Vega Olivencia, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Juan López Garriga, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Oscar J. Abelleira, Ph.D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Enrique Meléndez, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

RESUMEN

La contaminación ambiental es un problema que ha afectado la calidad de vida del ser humano durante años. La contaminación por cadmio (Cd) es un problema de gran impacto ambiental debido a su efecto considerablemente tóxico al ambiente, y por consiguiente a la salud humana. Por tal razón, esta investigación estuvo enfocada en analizar la posibilidad de utilizar la planta *Leucaena leucocephala* en el proceso de fitorremediación de Cd. Los niveles del contaminante que la planta puede remover fueron evaluados tomando en consideración la tolerancia y el efecto de fitohormonas presentes en la toma del mismo. Las fitohormonas estudiadas fueron la cinetina (KN) y el ácido giberélico (GA3) que pertenecen al grupo de las citocininas y giberelinas, respectivamente. Éstas se encargan de regular los procesos fisiológicos en la planta. La cuantificación de la absorción de Cd en los extractos de *Leucaena leucocephala* se llevó a cabo mediante la técnica de Espectroscopia de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES).

Los resultados mostraron un efecto favorable y significativo ($p \geq 0.05$) en la producción de clorofila en las hojas de la planta cuando las plantas fueron expuestas a 10 ppm de Cd + 50 μM de KN (73.4 (± 0.8)). La elongación de la raíz fue mayor en las plantas expuestas a una concentración de 10 μM de GA3 y Cd (23.7 (± 0.7)) cm comparado con 20.0 (± 0.7) cm del grupo control. Se observó un aumento significativo ($p \geq 0.05$) en la absorción de Cd por las raíces en presencia de GA3 comparada a la absorción en presencia de KN. La translocación de Cd de la raíz hacia el tallo en presencia de 10 ppm de Cd + 10 μM de GA3 fue significativamente mayor ($p \geq 0.05$) en comparación con el tratamiento de 10 μM y 50 μM de KN. En términos generales, las plantas expuestas a GA3 mostraron un valor de

bioacumulación mayor a las plantas expuestas a KN. El estudio muestra resultados prometedores en la utilización de fitohormonas para la fitoextracción de metales como el Cd.

ABSTRACT

Environmental contamination has affected the quality of life during years. Contamination by cadmium (Cd) is environmental concerns which have a direct impact due to its considerably toxicity, and therefore effects to the human health. Due to these facts, this research was focused to analyze the potential removal of Cd from contaminated soils and waters by phytoremediation using *Leucaena leucocephala*. Pollutant concentrations which this plant was able to uptake were evaluated taking in consideration the specie accumulation ability and the effect of the phytohormones in the absorption process. The phytohormones evaluated were kinetin (KN) and gibberellic acid (GA3) which belong to the group of cytokinins and gibberellins, respectively. Several physiological processes inside plants are regulating by these group of phytohormones. Cd uptake and metal quantification in extracts of *Leucaena leucocephala* were performed by Inductive Couple Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP - OES).

The results showed a favorable and significant effect ($p \geq 0.05$) in the chlorophyll content in the leaves of the plant when they were exposed to 10 ppm of Cd + 50 μM of KN (73.4 (± 0.8)). Root elongation was greater in plants exposed to concentrations of 10 μM of GA3 and Cd (23.7 (± 0.7)) cm compared with 20.0 (± 0.7) cm of the control group. A significant increase ($p \geq 0.05$) in Cd absorption by roots in presence of GA3 was observed compared with the absorption in presence of KN. The translocation of Cd by root towards the stem in presence of 10 ppm of Cd + 10 μM of GA3 was significantly greater ($p \geq 0.05$) in comparison with the treatment of 10 μM and 50 μM of KN. In general, the exposed plants to

GA3 showed a greater bioacumulación factor that plants exposed to KN. The study shows very promising results in the use of phytohormones for the phytoextraction of metals like the Cd.

Derechos reservados© Efraín Salas Vázquez, 2018

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza para llegar hasta donde he llegado. A mi familia por su apoyo incondicional, en especial a mi madre Nereida Vázquez y mi abuela Rosa Pérez por ser los pilares más importantes en mi vida. Gracias por siempre estar presentes a pesar de todo. ¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le doy las gracias a Dios por permitirme vivir esta experiencia única en mi vida. Fue un camino lleno de tropiezos del cual aprendí inmensamente; además de tener el privilegio de conocer personas maravillosas que de una forma u otra forman, y formaron parte de mi vida.

Antes que nada, le agradezco inmensamente a mi madre Nereida Vázquez y mi abuela Rosa Pérez por todo el apoyo, comprensión y motivación brindada durante todos estos años. Sin ustedes mi vida no tendría sentido. Gracias por siempre motivarme a seguir luchando por lo que deseo, pero sobre todo por siempre creer en mí. A mis hermanos Juan M. Salas y Krystal N. Colón, gracias por ser un apoyo incondicional siempre que los necesito. A mi padrastro Eugenio Colón, gracias por ser un padre para mí. Ustedes son el mejor regalo que la vida me ha dado.

Un especial agradecimiento a la Dra. Martha Laura López – Moreno por la oportunidad que me brindo de pertenecer a su grupo de investigación. Le agradezco inmensamente todo el apoyo que me ha brindado durante este proceso evolutivo de mi vida. Gracias por creer en mí y siempre darme palabras de aliento cuando más lo necesitaba. La vida no me alcanzará para agradecerle tanto, le debo mucho, gracias. A los miembros de mi comité: Dra. Carmen A. Vega y Dr. Juan López Garriga, gracias por su apoyo.

A la Dra. Ivelisse Padilla y la Prof. Verónica Sánchez, les debo tanto que jamás podré terminar de decir lo que siento. Ambas han sido una bendición en mi vida, no sé cómo hubieran sido estos años sin sus consejos, palabras de aliento, y sobre todo su amistad y cariño. Gracias por ser como unas madres para mí. Les agradezco todas las oportunidades

que me brindaron, y la confianza que depositaron en mí. Siempre les estaré agradecido.

A Lizmarie Quintana, gracias por ser la amiga que eres. Eres un ejemplo a seguir en mi vida. Te agradezco tu amistad incondicional por más de 10 años. Gracias por siempre creer en mí y apoyar mis locas decisiones.

Gabriela Padilla, tú eres un ser único en mi vida. Gracias por siempre estar presente cuando más lo he necesitado. Muchas personas deberían ser como tú, y me incluyo. Siempre le buscas el lado positivo a todo, y eres una mujer muy luchadora. Sabes que desde el cielo tienen un hermoso ángel que te cuidará siempre. Tu amistad ha sido un privilegio en mi vida.

Marielys Crespo, mi compañera y gran amiga. Gracias por ser como eres, gracias por permitirme ser parte de tú vida. Gracias por sacarme una sonrisa los días que más lo necesitaba. Gracias por tu apoyo y confianza. Y algo muy importante, gracias por regalarme a mi hermoso sobrino Kelian.

Un agradecimiento muy especial y de todo corazón a mi gran amiga y compañera de experiencias de investigación, Jomarys González. En tan poco tiempo has ocupado un lugar muy importante en mi corazón. Tu amistad es una bendición y un maravilloso regalo que Dios me ha dado el privilegio de tener. Nunca podré agradecer todo lo que has hecho por mí. Gracias por esas horas interminables de trabajo en el laboratorio, esas cosechas que parecía nunca tendrían fin; bueno gracias por apoyarme y motivarme a seguir luchando. Eres excelente educadora e investigadora, y sé que la vida, y sobre todo Dios, te tienen reservado algo maravilloso.

Al Sr. Delvis Pérez, gracias por su apoyo y disponibilidad al permitirme analizar mis muestras en las facilidades de su laboratorio en la Estación de Investigación Agrícola Tropical (TARS, por sus siglas en inglés).

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras	xiii
Lista de tablas	xvii
Lista de símbolos y abreviaciones	xviii
1. Introducción	1
1.1. Motivación y justificación	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. Revisión de literatura	3
2.1. Contaminación por metales pesados	3
2.2. Contaminación por cadmio (Cd)	4
2.3. Mecanismo de transporte de Cd en las plantas	7
2.4. Efectos generales de Cd en las plantas	8
2.5. Fitorremediación	9
2.6. Fitohormonas	11
2.7. Contenido de clorofila	13
2.8. Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo	15
2.9. Leucaena leucocephala	17

3. Materiales y métodos	19
3.1. Germinación, crecimiento y desarrollo de <i>Leucaena leucocephala</i>	19
3.2. Preparación de muestras	20
3.2.1. Soluciones de cadmio	20
3.2.2. Soluciones de fitohormonas	21
3.2.2.1. Solución de cinetina	21
3.2.2.2. Solución de ácido giberélico	21
3.3. Exposición de la planta <i>Leucaena leucocephala</i> a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (10 μ M y 50 μ M)	21
3.4. Evaluación del crecimiento y determinación del contenido de clorofila	22
3.5. Determinación de Cd por Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES) en tejidos de <i>Leucaena leucocephala</i>	23
3.6. Validación del método de digestión ácida y de la técnica de cuantificación por ICP – OES	24
3.7. Análisis estadístico	24
4. Resultados y discusión	26
4.1. Contenido de clorofila	26
4.1.1. Efecto de cinetina (KN) en el contenido de clorofila	26
4.1.2. Efecto de cinetina (KN) y cadmio (Cd) en el desarrollo físico de la planta y el contenido de clorofila	28
4.1.3. Efecto de ácido giberélico (GA3) en el contenido de clorofila	32

4.1.4. Efecto de ácido giberélico (GA3) y cadmio (Cd) en el contenido de clorofila	34
4.1.5. Comparación entre KN y GA3 a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd	36
4.2. Elongación de la raíz	39
4.2.1. Efecto de cadmio en el largo de la raíz	39
4.2.2. Efecto de cinetina (KN) y ácido giberélico (GA3) en el largo de raíz	42
4.2.3. Efecto de cinetina (KN) y ácido giberélico (GA3) en el largo de la raíz en presencia de cadmio	44
4.3. Análisis de la absorción de cadmio	47
4.3.1. Absorción de Cd en presencia y ausencia de KN en los diferentes tejidos de <i>Leucaena leucocephala</i>	47
4.3.2. Absorción de Cd en presencia y ausencia de GA3 en los diferentes tejidos de <i>Leucaena leucocephala</i>	52
4.4. Factores de concentración	56
5. Conclusiones	59
6. Trabajos futuros y/o recomendaciones	61
7. Referencias	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procesos de fitorremediación en la planta (Dhir, 2013)	----- 10
Figura 2. Interacciones de las fitohormonas en la planta (Jain, 2005)	----- 12
Figura 3. Espectro de absorción para clorofila a, clorofila b y β -carotenoides (Singer, 2015)	----- 14
Figura 4. Esquema de los componentes básicos de un ICP – OES (Boss et al., 1997).	----- 16
Figura 5. Efecto de 10 μ M KN y 50 μ M KN en el contenido de clorofila en las hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 27
Figura 6. Plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 0 ppm de Cd, 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd. Se muestran las réplicas (R1, R2 y R3) para (a) el grupo control, (b) grupo expuesto a 10 ppm de Cd y (c) grupo expuesto a 30 ppm de Cd por un período de 5 días.	----- 29
Figura 7. Efecto de la exposición a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de 10 μ M KN y 50 μ M KN en el contenido de clorofila en las hojas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 30

- Figura 8.** Efecto de 10 μM de GA3 y 50 μM de GA3 en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 33
- Figura 9.** Efecto de la exposición a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de 10 μM de GA3 y 50 μM de GA3 en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 35
- Figura 10.** Contenido de clorofila en hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 37
- Figura 11.** Contenido de clorofila en hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 38
- Figura 12.** Largo de raíz en plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 40
- Figura 13.** Plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a: (a) 0 ppm de Cd, (b) 10 ppm de Cd y (c) 30 ppm de Cd luego de 5 días de exposición al metal. ----- 41

Figura 14. Largo de raíz en plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 10 μM y 50 μM de KN y GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 43
Figura 15. Largo de raíz en plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 10 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 45
Figura 16. Largo de raíz en plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> expuestas a 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 46
Figura 17. Concentración de Cd en los diferentes tejidos de <i>Leucaena leucocephala</i> . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 47
Figura 18. Concentración de Cd en el sistema de raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona KN. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 49
Figura 19. Concentración de Cd en el tallo de <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona KN. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.	----- 51

Figura 20. Concentración de Cd en el sistema de raíces de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 53

Figura 21. Concentración de Cd en el tallo de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida. ----- 55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva Hoagland	----- 20
Tabla 2. Concentraciones de exposición para <i>Leucaena leucocephala</i> de Cd y fitohormonas	----- 22
Tabla 3. Concentración de Cd en el sistema de raíces y tallos de la planta <i>Leucaena leucocephala</i>	----- 48
Tabla 4. Concentración de Cd en el sistema de raíces de la planta <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de la fitohormona KN.	----- 50
Tabla 5. Concentración de Cd en el tallo de la planta <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de la fitohormona KN.	----- 52
Tabla 6. Concentración de Cd en el sistema de raíces de la planta <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de la fitohormona GA3.	----- 54
Tabla 7. Concentración de Cd en el tallo de la planta <i>Leucaena leucocephala</i> en presencia y ausencia de la fitohormona GA3.	----- 56
Tabla 8. Factor de traslocación (TF) y factor de bioconcentración (BCF) a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de KN.	----- 57
Tabla 9. Factor de traslocación (TF) y factor de bioconcentración (BCF) a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de GA3.	----- 58

Lista de símbolos y abreviaciones

KN	Cinetina
GA3	ácido giberélico
ICP - OES	Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
Pb	Plomo
As	Arsénico
Fe	Hierro
Mn	Manganeso
Zn	Zinc
Mg	Magnesio
Mo	Molibdeno
Se	Selenio
Al	Aluminio
Sb	Antimonio
Ba	Bario
Ag	Plata
Hg	Mercurio
Au	Oro
Ni	Níquel
Cr	Cromo

U	Uranio
ppm	partes por millón
ppb	partes por billón
μM	micro - molar
QC	Control de calidad
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
WHO	Organización Mundial de la Salud
MCL	Nivel máximo de concentración
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
AND	Ácido desoxirribonucleico
CPEO	Centro de Supervisión del Ambiente Público
TF	Factor de translocación
BCF	Factor de bioconcentración
RF	Radiofrecuencia

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Motivación y justificación

La contaminación por metales pesados es un asunto de salud pública que ha adquirido mayor importancia en los últimos años debido al efecto adverso que trae a la salud humana y al medio ambiente. Existen tecnologías químicas y procesos físicos (extracción de contaminantes con disolventes, remoción de la capa superficial de suelo, etc.) para recuperar suelos y aguas contaminadas, sin embargo, la mayoría de las veces estos procesos son costosos, requieren alto consumo energético, se utilizan disolventes que pueden ser tóxicos, o compuestos químicos que pueden generar residuos peligrosos. El desarrollo e implementación de nuevas técnicas para mejorar la calidad ambiental es indispensable en la actualidad. En el pasado, se han utilizado tecnologías ambientalmente amigables y de bajo costo como la fitorremediación. Este proceso, aunque es lento, es una tecnología sustentable que no implica consumo energético y se puede utilizar para remover contaminantes orgánicos e inorgánicos, entre otras ventajas. La fitorremediación juega un rol importante en el proceso de descontaminación de lugares con medianas y bajas concentraciones de algunos metales pesados. En el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas, las fitohormonas son una pieza clave en el proceso de fitorremediación ya que se encargan de regular los procesos fisiológicos en la planta.

Piotrowaska et al. (2013) evaluó la influencia de diferentes fitohormonas en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* expuesta a metales pesados como cadmio (Cd), cobre (Cu) y plomo (Pb). Determinó que las auxinas, citocininas y giberelinas pueden

aliviar los síntomas de estrés al inhibir la biosorción de metales pesados restaurando el crecimiento del alga. Por su parte, López et al. (2008) estudió el efecto de cisteína, agentes quelantes y cinetina en la concentración y especiación de arsénico (As) en la planta Mesquite tratada con 30 ppm de As^{3+} y 50 ppm de As^{5+} . Algunos de los resultados mostraron que la tolerancia de la planta a As^{5+} aumentó en presencia de cisteína más cinetina debido a similitudes entre las raíces del grupo control (sin arsénico) y las plantas tratadas con el contaminante (López, et al. 2008). Este proyecto de investigación se enfocará al estudio y evaluación del efecto que ejercen las fitohormonas en la remoción y tolerancia al Cd en la planta *Leucaena leucocephala*.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos generales

Esta investigación tiene como objetivo principal evaluar la posible eficiencia y tolerancia de la planta *Leucaena leucocephala* en el proceso de fitorremediación de suelos y aguas contaminados con Cd en presencia de fitohormonas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las fitohormonas cinetina (KN) y ácido giberélico (GA3) en el crecimiento y desarrollo de *Leucaena leucocephala*.
- Evaluar la absorción de Cd por *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de fitohormonas.
- Determinar la tolerancia de *Leucaena leucocephala* en la remoción de Cd en base a la concentración de exposición al metal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La contaminación ambiental es un problema que ha afectado la calidad de vida del ser humano durante años. El uso inadecuado de los recursos naturales tiene un impacto negativo en el medio ambiente, provocando que el ser humano se vea expuesto a contaminantes que atentan contra su salud, como es el caso de los metales pesados.

2.1. Contaminación por metales pesados

Los metales pesados se definen como elementos químicos que se caracterizan por tener una densidad mayor a la del agua (Tchounwou et al., 2014) y son clasificados en esenciales y no esenciales, dependiendo de su funcionalidad (Singh et al., 2016). La contaminación por metales pesados es un problema que ha ido en aumento proporcional al desarrollo industrial y la actividad humana (Tuzen, 2003; Sastre et al., 2002; Tchounwou et al., 2014). Por tal motivo, en los últimos años ha incrementado el interés con relación a la salud pública asociada a la contaminación del medio ambiente por estos elementos (Tchounwou et al., 2014).

En organismos vivos como por ejemplo las plantas, metales tales como el hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), magnesio (Mg), molibdeno (Mo) y selenio (Se) son nutrientes esenciales que utilizados en pequeñas cantidades realizan funciones bioquímicas y fisiológicas adecuadas (Singh et al., 2016; Tchounwou et al., 2014). Sin embargo, a pesar de suplir nutrientes indispensables para el desarrollo y crecimiento de las plantas pueden llegar a poseer un efecto nocivo si son absorbidos en concentraciones mayores a las necesarias,

resultando en efectos no deseados (Tuzen, 2003). Por ejemplo, la exposición excesiva a Cu está relacionada a alteraciones metabólicas e inhibición del crecimiento de la planta, además de interferir con aspectos bioquímicos como la fotosíntesis y el bloqueo del transporte de electrones provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fernandes, J.C. et al., 1991). Iruela (2005) reportó que concentraciones mayores de 10 µg de Cu/g de peso seco en los tejidos de las plantas produce una reducción en la biomasa y aparecen síntomas cloróticos debido a la exposición al Cu.

Por otra parte, los metales no esenciales son aquellos que no son necesarios para llevar a cabo funciones metabólicas. Algunos de estos metales son: aluminio (Al), antimonio (Sb), arsénico (As), bario (Ba), cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg), oro (Au) y uranio (U) (Tchounwou et al., 2014, Dabonne et al., 2010). Por ejemplo, el Pb ha sido asociado a inhibición del proceso de germinación y retraso en el crecimiento de algunas plantas debido a su alta toxicidad (Muhammad et al., 2008).

Trazas de estos elementos se pueden encontrar en varias matrices ambientales, y su disponibilidad biológica se asocia a factores como temperatura, capacidad de adsorción y fases de asociación (Tchounwou et al., 2014). Por tal motivo, la determinación de metales pesados en diferentes matrices ambientales como el suelo y el agua es de vital importancia al monitorear la calidad del medio ambiente (Tuzen, 2003).

2.2. Contaminación por cadmio (Cd)

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) et al., (1993) establece que la exposición a Cd está relacionada a diversas fuentes

como son el humo del cigarrillo, ingesta de alimentos, industrias de metales o exposición a lugares contaminados con el metal (Paschal et al., 2000). La ruta alimentaria y el tracto respiratorio son las principales fuentes de exposición. Algunos síntomas relacionados con la ingesta de Cd son: dolor abdominal, sensación de quemazón, náuseas, vómitos, vértigo y pérdida de la conciencia. Generalmente los niveles de Cd son determinados analizando muestras de sangre y orina. En Estados Unidos alrededor de 2.3% de la población posee niveles elevados de Cd en la orina siendo las personas fumadoras las que presentan los niveles más elevados (Tchounwou et al., 2014).

Clasificado como un elemento no esencial, el Cd posee un efecto considerablemente tóxico al medio ambiente, siendo su forma iónica una especie altamente tóxica (Pompeu et al., 2016; Wao et al., 2014). Su efecto tóxico está directamente relacionado a su alta movilidad en el sistema suelo – planta (Singh et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud (WHO), estableció un nivel máximo de contaminación riguroso para la presencia de Cd en aguas naturales (MCL= 5.0 g/L), el cual es mucho más bajo que el nivel permitido para otros metales (WHO, 2007). En suelos considerados no contaminados se pueden encontrar concentraciones de Cd en $\mu\text{g}/\text{kg}$. En cambio, en suelos contaminados la concentración promedio de Cd es de 4 mg/kg (De La Rosa et al., 2004). Debido a su alta dispersión, ocasionada por la actividad humana, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) establece una concentración máxima permitida de 3 mg/kg de Cd en suelos destinados a fines agrícolas (Muhammad et al., 2009; De La Rosa, 2004).

En las últimas décadas la Isla de Vieques ha sido considerada como un ejemplo de uno de los suelos de mayor contaminación por metales pesados debido a su utilización como campo militar por la Marina de Estados Unidos. Niveles elevados de elementos como el Cd y el Pb, fueron determinados en algunos cultivos agrícolas (calabaza, ají, gandul, piña, yuca, entre otros). En el caso de Pb se han encontrado concentraciones de 33 µg/g por peso seco en la planta *Ipomea violacea*. Concentraciones mayores a 1000 veces la dosis máxima tolerable, 0.007 µg/g a la semana, fueron detectadas en algunas poblaciones de cangrejos que habitan en el área. La concentración de algunos metales en diferentes cultivos agrícolas excede los límites establecidos por el Concilio de la Unión Europea para Asuntos de la Salud y Seguridad de Alimentos (1999) siendo para Cd 1.2 µg/peso seco y para Pb 11.2 µg/peso seco. En adición, se encontraron niveles excesivos de otros metales como: Ni, Cr, Mn, Cu y Co en la raíz, tallo, hoja y frutos de plantas que generalmente no son bioacumuladoras como *Calotropis procera*, *Acacia farnesiana* y *Urochloa máxima*. Los niveles detectados en raíces de *Urochloa máxima*, por ejemplo, fueron 14.19 µg/g de Ni, 115.44 µg/g de Mn, 21.04 µg/g de Cr, 63.66 µg/g de Co y 12.85 µg/g de Pb (Massol et al., 2002).

Acevedo et al., (2006) estudió la presencia de As, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb y Zn en los sedimentos de los estuarios Laguna San José y la Laguna Joyuda en Puerto Rico. Concentraciones de 1.8 mg/g, 105 mg/g, 219 mg/g y 531 mg/g por peso seco de los metales Cd, Cu, Pb y Zn, respectivamente, fueron determinadas en muestras de sedimentos de la Laguna San José. Por su parte, en la Laguna Joyuda se determinó la presencia de 0.1 mg/g de Cd, 0.17 mg/g de Hg, 22 mg/g de Cu y 8 mg/g de Pb por peso seco.

2.3. Mecanismo de transporte de Cd en las plantas

La exposición a Cd provoca un efecto negativo al metabolismo de las plantas, por lo tanto, es esencial conocer el proceso de absorción por el cual ocurre su bioacumulación ya que actualmente el mecanismo de toxicidad de Cd es poco conocido. Según Tchounwou y colaboradores (2014), el Cd causa un efecto nocivo a la célula mediante la generación de ROS provocando daño al ADN e interrumpiendo la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Tchounwou et al., 2014).

Singh y colaboradores (2016), reportaron que el Cd puede reemplazar la absorción de metales de la familia de zinc, calcio y reguladores transportadores de hierro. Dicho comportamiento se debe a que el metal puede ser absorbido por las plantas, específicamente, la raíz, mediante los canales que permiten el paso de algunos micronutrientes. Por otra parte, Tuzen (2003) indica que la absorción de Cd está relacionada con una reacción de quelación con los grupos sulfhidrilo de la metionina que poseen las proteínas.

De La Rosa et al. (2004) mediante estudios de espectroscopia de absorción de rayos X demostró que en las raíces de *Salsola kali* el Cd está unido a oxígeno, mientras en el tallo y las hojas el metal está unido a los grupos de oxígeno y azufre. Como implicación se concluyó que algunos ácidos orgánicos podrían ser responsables del transporte de Cd desde las raíces hasta el tallo y las hojas. Por otra parte, se ha propuesto que el Cd es incorporado a las raíces de la planta a través de los canales de transporte de calcio provocando una disminución en la incorporación del mismo. Esta disminución en calcio, y aumento en Cd, provoca estrés oxidativo en la planta lo que tiene como consecuencia una depresión en la actividad de la enzima catalasa (De La Rosa et al., 2005).

2.4. Efectos generales de Cd en las plantas

La exposición a Cd induce condiciones de estrés oxidativo en el metabolismo de las plantas, dando como resultado un efecto negativo en el proceso de germinación, crecimiento y biodiversidad (Pompeu et al., 2016; Muhammad, 2009). La presencia de Cd en algunos suelos puede llegar naturalmente a concentraciones de 2 mg/kg particularmente en suelos que se formaron de sedimentos aluviales y rocas volcánicas (Gramlich et al., 2018). A altas concentraciones, el efecto tóxico de Cd promueve la generación de especies ROS induciendo un efecto perjudicial para el organismo (Singh et al., 2016). Además, provoca alteraciones en los procesos fisiológicos llevados a cabo por la planta como son la fotosíntesis, toma de minerales y procesos de respiración. Una reducción en el crecimiento de la planta, disminución celular y muerte celular también se relacionan con la acumulación de Cd en los tejidos de la misma. En adición, debido a su alta movilidad se ven afectados mecanismos bioquímicos, alterando el balance reducción – oxidación del metal, causando ruptura del plasma en la membrana y llegando a provocar la pérdida de algunas funciones fisiológicas esenciales en la planta (Pompeu et al., 2016).

Poniedziatek et al. (2010) menciona que la toma de Cd por las plantas está relacionada con diversos factores. El pH y tipo de suelo, concentración de la materia orgánica, y especiación del metal son factores a considerar durante la absorción de Cd. La movilidad de éste en el sistema suelo – planta se ve directamente afectado por el pH. Un rango en pH de 4.5 – 5.5 ayuda a que el Cd tenga una alta movilidad y pueda interactuar con la planta. A valores mayores de pH el Cd se torna insoluble al formar compuestos con

carbonatos y fosfatos, lo que limita la disponibilidad de Cd para su absorción (Poniedzialek et al., 2010).

2.5. Fitorremediación

El Centro de Supervisión del Ambiente Público (CPEO, por sus siglas en inglés) define fitorremediación como un proceso de biorremediación en donde se utilizan diferentes tipos de plantas para remover, transferir, estabilizar o destruir contaminantes presentes en el suelo o aguas subterráneas. En el proceso de fitorremediación la planta lleva a cabo diversos mecanismos cuando entra en contacto con el contaminante para lograr su remoción y/o incorporación. Los procesos llevados a cabo se clasifican en: fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización, fitoestimulación, fitovolatilización y fitodegradación. En el caso particular de la fitoextracción, conocida también como fitoacumulación, es utilizada para remover contaminantes inorgánicos como metales de suelos contaminados mediante el sistema de raíces de la planta (Jadia et al., 2008). Sin embargo, la selección de la planta a ser utilizada se basa en la concentración de los metales presentes y las características del terreno (Beltrán, 2001). La **Figura 1** ilustra las partes de las plantas en donde se llevan a cabo los procesos de fitorremediación.

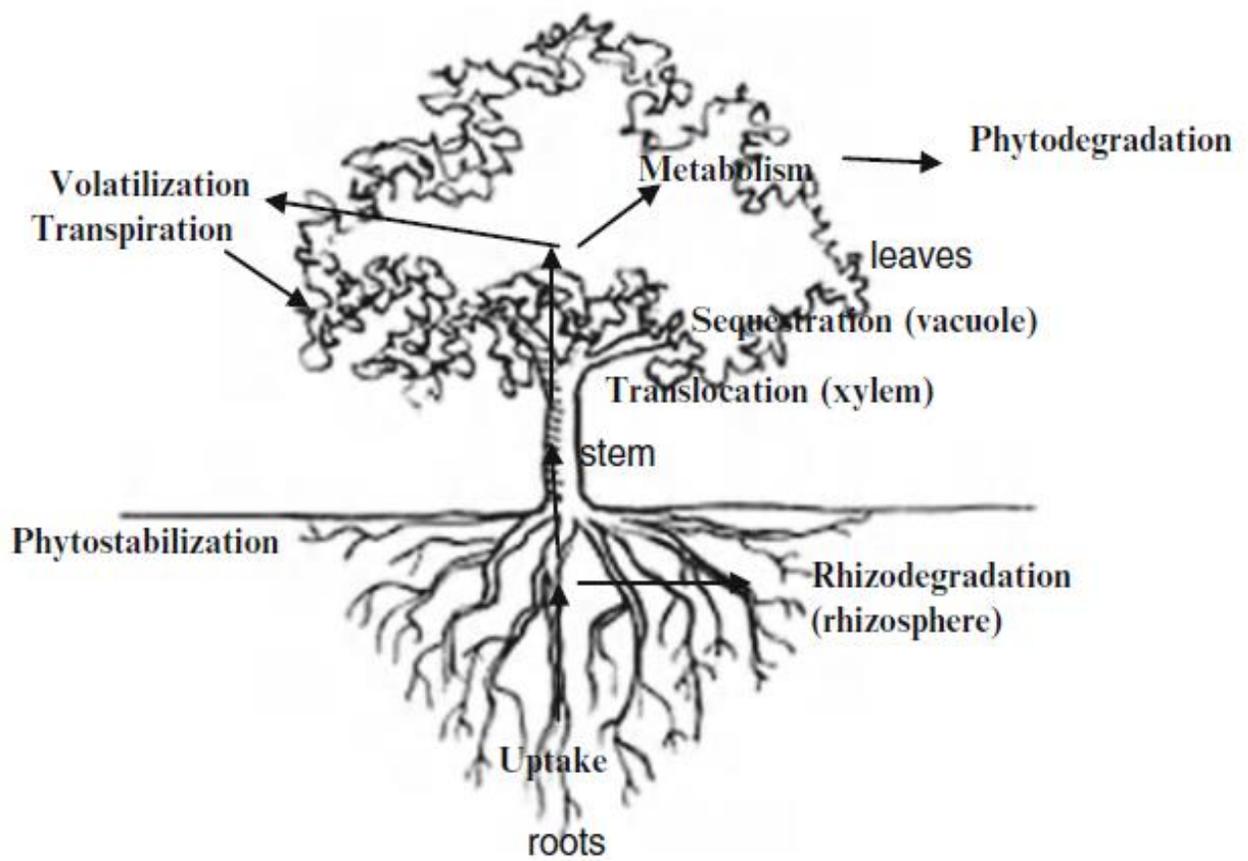


Figura 1. Procesos de fitorremediación en la planta (Dhir, 2013)

Algunas plantas tienen la capacidad de crecer y desarrollarse en lugares donde existe una elevada concentración de contaminantes. Estas plantas se conocen como hiperacumuladoras. En el caso particular de Cd, se considera una planta hiperacumuladora de Cd cuando en la parte aérea ésta es capaz de acumular una concentración de 100 µg/g de Cd (Delgadillo et al., 2011). En este caso, el sistema de raíces transporta el Cd a la parte aérea mediante diversos mecanismos fisiológicos.

Una especie acumuladora de Cd puede distinguirse de una no acumuladora cuando el factor de bioconcentración (BCF) y el factor de translocación (TF) son > 1 . BCF es la relación entre la concentración de Cd en la parte aérea de la planta y la concentración de Cd en la solución (tratamiento). TF es la relación entre la concentración de Cd en la parte aérea de la planta y la concentración de Cd en las raíces (He et al., 2017).

2.6. Fitohormonas

El desarrollo y crecimiento de la planta depende en gran medida de la interacción de factores externos e internos. Los factores externos responsables del crecimiento adecuado son los nutrientes, luz solar, agua y temperatura. Por su parte, las hormonas son consideradas factores internos (son sintetizadas naturalmente por las plantas). Éstas en particular son responsables de regular los procesos fisiológicos que ocurren en la planta a concentraciones a nivel µM.

Específicamente, las fitohormonas son responsables de regular la respuesta de la planta a los factores bióticos y abióticos que pueden afectar su crecimiento y desarrollo (Schmelz et al., 2003). En el caso particular del grupo de las auxinas, giberelinas, citocininas

y etileno, éstas se encargan de promover y regular el crecimiento de la planta. Por su parte, el ácido abscísico es clasificado como un inhibidor del crecimiento (Jain, 2005). La **Figura 2** hace referencia a las diferentes interacciones de las fitohormonas en los segmentos de la planta.

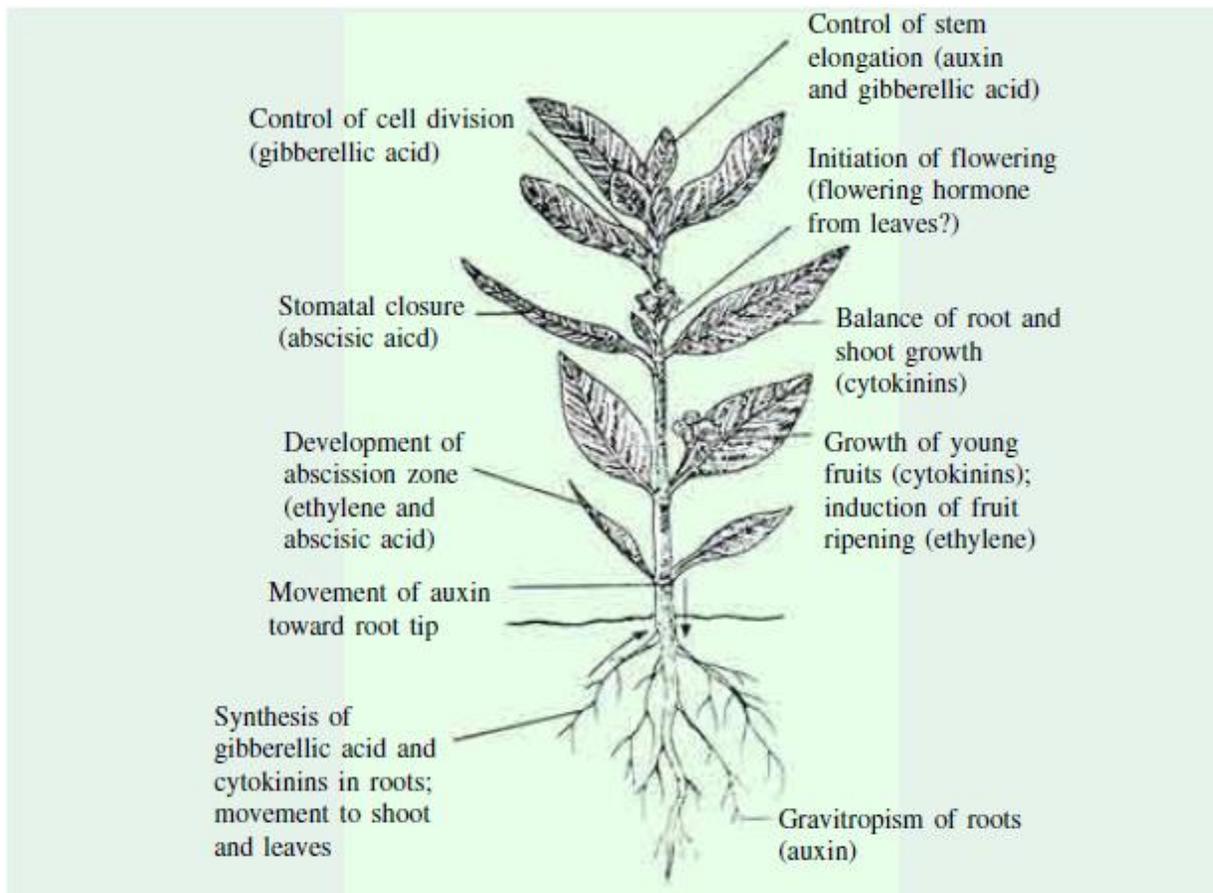


Figura 2. Interacciones de las fitohormonas en la planta (Jain, 2005)

En esta investigación se evaluaron el ácido giberélico (GA3) y cinetina (KN), las cuales pertenecen al grupo de las giberelinas y citocininas, respectivamente y se encargan de regular los procesos fisiológicos en la planta. El ácido giberélico (GA3) promueve la división

y la elongación celular lo que implica un efecto fisiológico en el crecimiento de la planta. En el caso de la cinetina (KN), ésta promueve la división celular en tejidos no meristemáticos en la planta (Jain, 2005).

2.7. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila juega un rol esencial en el desarrollo de las plantas debido a que es parte fundamental del proceso fotosintético de la misma (Dong et al., 2008). La determinación cuantitativa del nivel de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* se realizó para monitorear la respuesta de la planta a los cambios en su entorno. Experimentalmente se analizó el contenido de clorofila a y b en el punto isobéptico a una longitud de onda de 650 nm. En dicha región coexiste tanto la clorofila a como la clorofila b indicando que sólo hay dos especies principales a esa longitud de onda (Harris, 2007). En la **Figura 3** se ilustra gráficamente el punto donde coexisten ambos pigmentos fotosintéticos.

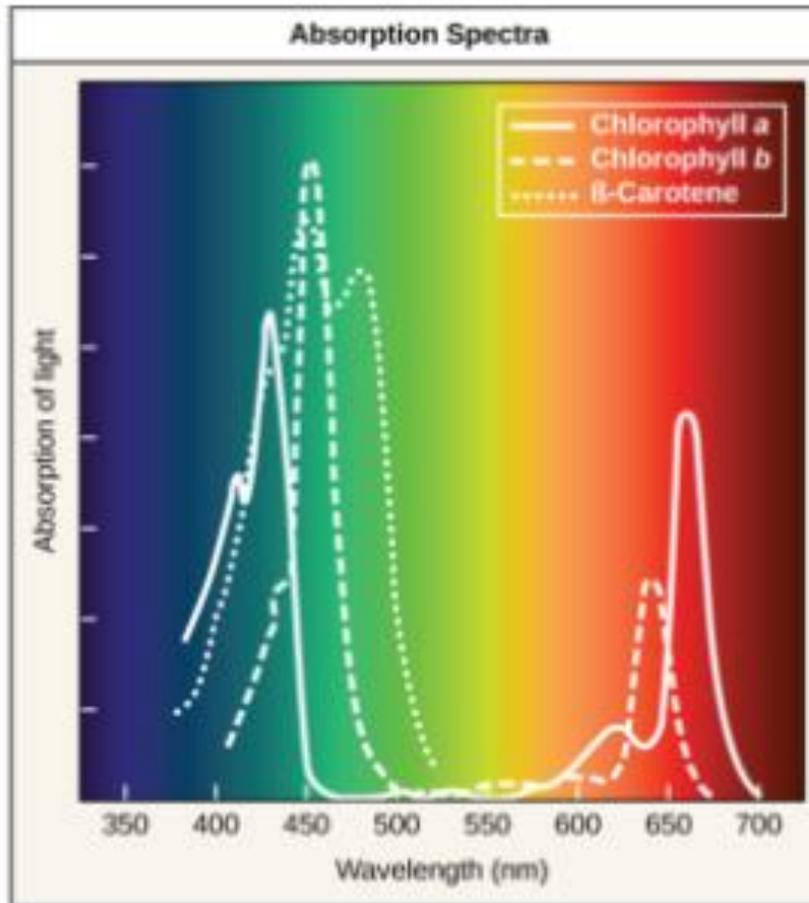


Figura 3. Espectro de absorción para clorofila a, clorofila b y β -carotenoides (Singer, 2015)

2.8. Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES)

La Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES) es una herramienta conveniente utilizada en la determinación y cuantificación de metales en diversas matrices ambientales (Kiran et al., 2017). ICP – OES permite cuantificar elementos trazas a concentraciones de hasta 10 ng/L (Caruso et al., 2017). La técnica está basada en la emisión espontánea de fotones de átomos e iones que son excitados por una descarga de radiofrecuencia (RF). Cuando la muestra líquida es convertida en aerosol, mediante un proceso denominado nebulización, ésta es dirigida hacia el plasma, el cual se encuentra a una temperatura de 10,000 K, e inmediatamente el analito pasa a la fase gaseosa. Energéticamente los analitos liberados adquirirán energía suficiente para llevar a cabo una promoción a estados excitados. Las altas temperaturas en el plasma excitan los átomos e iones propiciando la emisión de luz a un largo de onda característico (Kiran et al., 2017). Durante el proceso de relajación se emiten fotones, con energía específica que ayuda a la identificación del elemento que le dio origen a una longitud de onda en particular (Hou et al. 2000). La radiación emitida es detectada por un dispositivo y convertida en señal eléctrica que es relacionada con la concentración del analito (Boss et al., 1997). En la **Figura 4** se ilustran los componentes básicos de un ICP – OES.

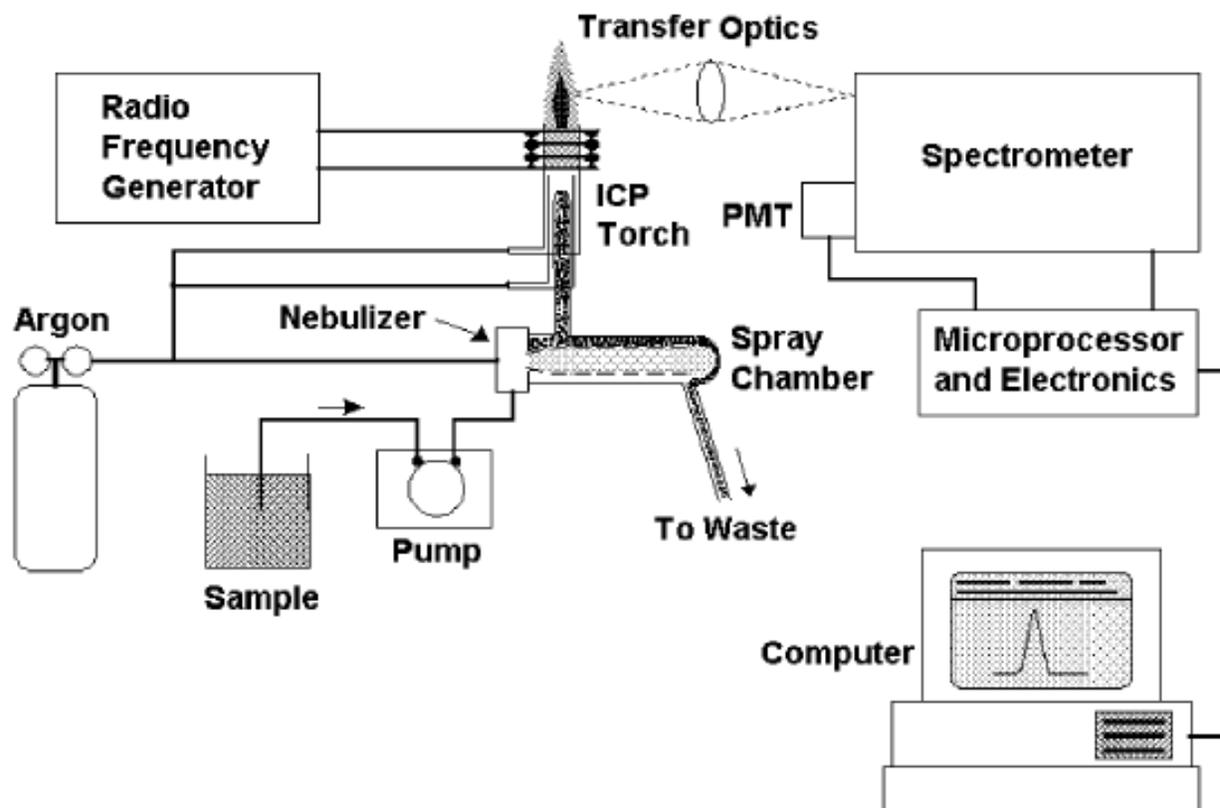


Figura 4. Esquema de los componentes básicos de un ICP – OES (Boss et al., 1997).

Debido a las altas temperaturas a las que opera el plasma, la eficiencia del proceso de atomización/excitación es mucho mayor que en las técnicas de llama y horno de grafito. De esta forma se obtienen mejores límites de detección (Caruso et al., 2017). Adicional a las altas temperaturas, la estabilidad y ambiente relativamente inerte del argón (Ar) eliminan las interferencias propiciadas por la llama (Harris, 2016).

2.9. *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala es una planta leguminosa que crece en diferentes ambientes del trópico y puede alcanzar una altura de entre 7 – 20 metros. El crecimiento adecuado de la planta ocurre a una temperatura de entre 25 °C – 30 °C y la presencia de altos niveles de fósforo y calcio mejoran su crecimiento. En adición, ésta planta posee la capacidad de crecer en diversos tipos de suelos incluyendo suelos levemente ácidos con un pH > 5.2 (Muhammad et al., 2009).

Helal et al. (2000) evaluó el efecto en la toma de Cd y Zn por *Leucaena leucocephala* en presencia de 10 mM de NaCl. Se reportó que estas plantas en presencia de un ambiente salinizado mostraron una reducción en la retención de Cd y Zn en las raíces y tallos, pero una translocación considerable de estos metales a las hojas (Helal et al., 2000). Por su parte, Muhammad et al., 2009 estudió el efecto de diferentes concentraciones de Cd y Pb en el proceso de germinación y crecimiento de semillas de *Leucaena leucocephala*. Las semillas expuestas a concentraciones de 75 ppm de Pb mostraron una reducción significativa en el proceso de germinación mientras que a concentraciones de 50 ppm de Cd las semillas mostraron reducción en el proceso de germinación y el largo de la raíz (Muhammad et al.,

2009). Zhan et al. (2017) analizó el crecimiento, toma de nutrientes y absorción de metales pesados por *Leucaena leucocephala* al ser inoculada con hongos micorrízicos arbusculares. Estos investigadores demostraron que el hongo *Glomus mosseae* promueve el crecimiento de la planta y la toma de P, S, Pb y Zn. La inoculación del hongo *Diversispora sparcum* provocó que la planta de *Leucaena leucocephala*, redujera la absorción de Cd, Pb, y As de suelos contaminados con metales pesados (Zhan et al., 2017).

Debido a que las investigaciones anteriores hacen referencia a la tolerancia de *Leucaena leucocephala* hacia varios metales, este proyecto de investigación estuvo enfocado en estudiar el rol que juegan las fitohormonas en la tolerancia y absorción de Cd por la planta *Leucaena leucocephala*. Como criterio de tolerancia al metal, se evaluó el crecimiento y desarrollo de la planta considerando medidas de raíz y tallo, así como el contenido de clorofila luego de la exposición a Cd. Se realizó un análisis de espectroscopia de emisión óptica para determinar la concentración de Cd absorbida por la planta y se calcularon los valores de BFC y TF.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Germinación, crecimiento y desarrollo de la planta *Leucaena leucocephala*

Las semillas de *Leucaena leucocephala* utilizadas en se recolectaron en la autopista PR-2 E Sabana Grande, Puerto Rico (18°03'06.1" N 66°57'16.8" W). Éstas fueron colocadas en un vaso de precipitado con ácido sulfúrico concentrado (WWR Scientific, PA) por aproximadamente 10 minutos para romper la capa de latencia. Transcurrido dicho período de tiempo las semillas fueron lavadas con agua destilada para remover el exceso de ácido sulfúrico. Posteriormente, se esterilizaron con una solución de NaClO al 4% por 30 minutos; y se lavaron con agua destilada. Finalmente se colocaron en agua destilada por 24 horas para inducir el proceso de hidratación.

Al transcurso de 24 horas las semillas hidratadas se colocaron en papel de germinación, se transfirieron a un vaso de precipitado y fueron colocadas en oscuridad por un lapso de 7 días. Después de dicho período, 36 brotes se transfirieron a un recipiente de 250 mL que contenía solución nutritiva Hoagland a un pH aproximado de 5.4. El pH de la solución fue ajustado con soluciones diluidas de NaOH o HCl utilizando un pH-metro (Orion 710 A PH-ISE System Instrument). La solución Hoagland está compuesta por varias sales inorgánicas que brinda a la planta los macro y micro nutrientes necesarios para un crecimiento adecuado. En la **Tabla 1** se indica la composición y concentración de cada nutriente en la solución Hoagland según reportado por López et al. (2008) con algunas variaciones.

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva Hoagland

Solución	Concentración (M)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.57×10^{-2}
H_3BO_3	2.31×10^{-3}
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2.14×10^{-2}
KH_2PO_4	9.68×10^{-2}
KNO_3	2.55×10^{-2}
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.04×10^{-1}
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6.83×10^{-3}
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7.69×10^{-4}
MoO_3	1.00×10^{-3}
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-3}
$\text{Zn} (\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-3}

El crecimiento de las plántulas fue llevado a cabo en un ambiente controlado con 16 h luz / 8 h oscuridad en un sistema hidropónico por un período de 21 días. Cada recipiente fue conectado a un sistema de bombeo que permitía una aireación constante dentro del sistema.

3.2. Preparación de muestras

3.2.1. Soluciones de cadmio

Se preparó una solución con una concentración de 1000 ppm de Cd en ácido nítrico al 5% (Fisher Scientific; Lot. 1114030) utilizando una sal de $\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 98% (Acros

Organic, USA; Lot. A0249125). A partir de esta solución se prepararon soluciones con concentraciones de 10 ppm y 30 ppm de Cd en solución Hoagland y se ajustó el pH a 5.4.

3.2.2. Soluciones de fitohormonas

3.2.2.1. Solución de cinetina (KN)

Se preparó una solución de 5 mM de KN (Sigma Aldrich Co.; Lot. 22K4113) disolviendo 0.0270 g de KN en aproximadamente 1 mL de NaOH 1 M (Sigma Chemical Co.; Lot. 42H0542) en agua deionizada. A partir de esta solución se prepararon soluciones con concentraciones de 10 μ M y 50 μ M de KN en solución Hoagland y se ajustó el pH a 5.4.

3.2.2.2. Solución de ácido giberélico (GA3)

Se preparó una solución de 5 mM de GA3 (Sigma Cell Culture.; Lot. 58H0595). disolviendo 0.0433 g de GA3 en aproximadamente 2 mL de etanol 95% en agua deionizada. A partir de esta solución se prepararon soluciones con concentraciones de 10 μ M de GA3 y 50 de μ M GA3 en solución Hoagland y se ajustó el pH a 5.4.

3.3. Exposición de la planta *Leucaena leucocephala* a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (10 μ M y 50 μ M)

Luego de 21 días de crecimiento en solución Hoagland, las plantas fueron expuestas a diferentes concentraciones de Cd y/o fitohormonas por un período de 5 días. En la **Tabla 2** se indica el protocolo llevado a cabo durante el proceso de exposición a Cd para cada tratamiento en triplicado. El pH de las soluciones se ajustó a 5.4 después de la adición de Cd y fitohormonas. El estado físico de las plantas fue monitoreado diariamente durante el período de exposición.

Tabla 2. Concentraciones de exposición para *L. leucocephala* de Cd y fitohormonas

Concentración	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Fitohormona	(0 ppm Cd)	(10 ppm Cd)	(30 ppm Cd)
(μM)			
0	0 , 0	0 , 10	0 , 30
10	10 , 0	10 , 10	10 , 30
50	50 , 0	50 , 10	50 , 30

3.4. Evaluación de crecimiento y determinación del contenido de clorofila

Las plantas fueron cosechadas y el crecimiento se evaluó tomando en consideración medidas de raíz y tallo de 30 plantas. El contenido de clorofila en las hojas se midió en una población de 30 hojas por tratamiento. La determinación del nivel de clorofila en *Leucaena leucocephala* se llevó a cabo utilizando un analizador de clorofila total SPAD 502, con un receptor de fotodiodo de silicio. Éste fue utilizado para monitorear y cuantificar cambios sutiles en la salud de la planta que no son visibles al ojo humano. Esta técnica no destructiva estima el nivel de clorofila a y b en la hoja in situ. El contenido de clorofila de las plantas tratadas fue comparado con el grupo control.

3.5. Determinación de Cd por la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica de Acoplamiento de Plasma Inductivo (ICP – OES) en tejidos de la planta *Leucaena leucocephala*.

El análisis de Cd en los diferentes segmentos de la planta fue evaluado utilizando espectrometría de emisión óptica (OES, por sus siglas en inglés). Esta técnica analítica permite cuantificar metales en concentraciones de partes por millón y partes por billón (ppm y ppb, respectivamente). El método EPA 6010D se utilizó de referencia para llevar a cabo la preparación, digestión, y análisis de las muestras. Antes del análisis, las plantas fueron lavadas con una solución diluida de HNO₃ 0.010 M para remover el Cd que pudiera estar adherido a la superficie de la raíz, y posteriormente las plantas se enjuagaron con agua deionizada. Éstas fueron segmentadas en raíz, tallo y hoja y secadas en un horno a 60 °C por 96 horas. Posteriormente las muestras fueron digeridas (DigiPREP Jr, SCP Science) en 3 mL de HNO₃ ultra puro y llevadas a un volumen de 50 mL con agua desionizada.

Se prepararon curvas de calibración utilizando un estándar de 1004 µg/mL de Cd en HNO₃. La concentración de Cd fue determinada a un largo de onda de 228.8 nm utilizando un equipo ICP – OES Optima 8000 (Perkin Elmer Shelton, USA). Como control de calidad (QC) se analizaron soluciones de concentración conocida, soluciones blanco y un estándar de hojas de espinaca NIST (1570a).

3.6. Validación del método de digestión ácida y de la técnica de cuantificación por ICP – OES

La cuantificación de Cd en los diferentes segmentos de *Leucaena leucocephala* se llevó a cabo utilizando la técnica espectroscópica de ICP – OES. El método de digestión ácida utilizado en la preparación de muestras fue validado mediante el análisis de un estándar de hojas de espinaca NIST (1570a). Según reportado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) la concentración de Cd en las hojas de espinaca es de 2.89 (\pm 0.07) mg/kg. Experimentalmente la concentración de Cd determinada por ICP – OES fue 2.65 (\pm 0.02) mg/kg con un porcentaje de recuperación de la muestra de aproximadamente 95%.

El funcionamiento adecuado del instrumento se evaluó mediante la utilización de controles de calidad (QC, por sus siglas en inglés). Un control de calidad de 2.25 ppm de Cd fue analizado dando una concentración experimental de 2.31 (\pm 0.02) ppm, indicando un buen funcionamiento del instrumento con un porcentaje de error de 2.67%. El coeficiente de correlación en la calibración utilizada en la cuantificación de las concentraciones de las muestras fue de 0.9997.

3.7. Análisis estadístico

Un diseño experimental completamente aleatorio fue realizado en triplicado para cada tratamiento. Los resultados se reportaron considerando el promedio e incertidumbre asociada a cada medida, así como las oscilaciones de la media muestral alrededor de la media poblacional ($\bar{x} \pm SE$). Las diferencias estadísticas entre medidas fueron identificadas

mediante un análisis ANOVA considerando un valor de $p \geq 0.05$. Al 95% de confianza se determinó que la hipótesis alterna fue cumplida ya que la planta en presencia de fitohormonas aumentó la absorción de Cd.

4. Resultados y Discusión

4.1. Contenido de clorofila

4.1.1. Efecto de cinetina (KN) en el contenido de clorofila

La **Figura 5** muestra el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento con KN. Experimentalmente se observó una tendencia ascendente en el contenido de clorofila a y b a medida que se aumentaba la concentración de KN de 10 μM a 50 μM comparado con el grupo control. El contenido de clorofila de las plantas expuestas a 50 μM de KN fue de 69.5 (± 1.0) mientras que el contenido en las plantas control fue de 66.1 (± 1.0). Las hormonas presentes en las plantas son sustancias orgánicas que en pequeñas cantidades regulan los procesos intracelulares, fisiológicos y bioquímicos. En el caso de las citocininas, éstas tienen un rol esencial en el desarrollo de la planta que abarca desde el proceso de germinación hasta la edad adulta (Pazurkiewicz-Kocot et al., 2012).

En estudio realizados por Pazurkiewicz et al. (2012) con semillas de *Zea mays L.* se observó una disminución en el contenido de clorofila a medida que se aumentaba la concentración de KN en el medio de cultivo. Sin embargo, el decrecimiento en el nivel de clorofila se puede atribuir al efecto tóxico que presenta la KN a elevadas concentraciones ya que esta fitohormona a bajas concentraciones contribuye positivamente en el desarrollo de la planta como se ilustra en la **Figura 5**.

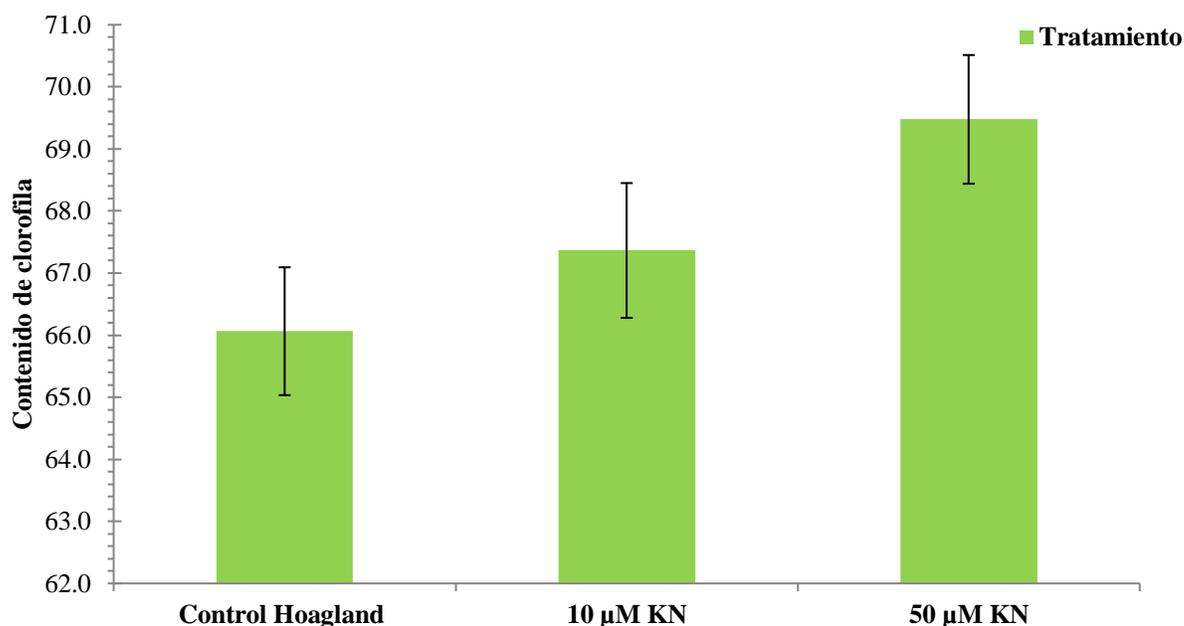


Figura 5. Efecto de 10 μM KN y 50 μM KN en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

En adición, según los resultados obtenidos, se puede indicar que a medida que se aumentaba la concentración de KN los procesos fotosintéticos eran más favorables para el crecimiento y desarrollo de la planta. Según establecido en investigaciones previas, los pigmentos fotosintéticos son factores importantes en el proceso de desarrollo del sistema vegetal (Pazurkiewicz et al., 2011).

4.1.2. Efecto de cinetina (KN) y cadmio (Cd) en el desarrollo físico de la planta y el contenido de clorofila

En la **Figura 6** se observan las plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a concentraciones de 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd por un lapso de 5 días. Las plantas expuestas a una concentración de 10 ppm de Cd no mostraron síntomas de deterioro en comparación al grupo control (**Figuras 6a y 6b**). Sin embargo, las plantas expuestas a concentraciones de 30 ppm de Cd (**Figura 6c**) mostraron un avanzado estado de deterioro debido a la toxicidad del contaminante. Cd es considerado un metal pesado extremadamente tóxico que afecta el medio ambiente y limita el desarrollo y crecimiento de las plantas (Muradoglu et al., 2015).

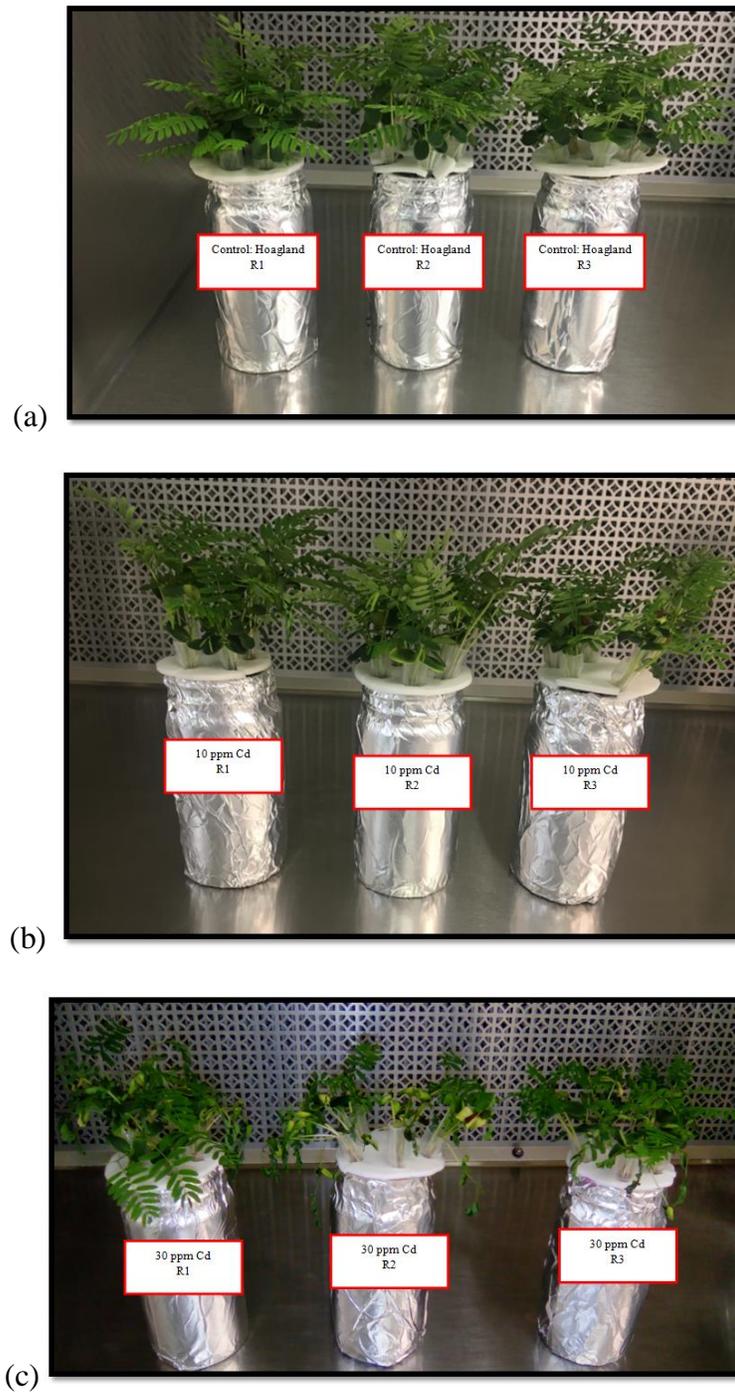


Figura 6. Plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 0 ppm de Cd, 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd. Se muestran las réplicas (R1, R2 y R3) para (a) el grupo control, (b) grupo expuesto a 10 ppm de Cd y (c) grupo expuesto a 30 ppm de Cd por un período de 5 días.

En la **Figura 7** se puede apreciar un aumento en el nivel de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd de 66.1 (± 1.0) a 73.5 (± 1.5) comparado con el grupo control. Sin embargo, en investigaciones realizadas por Zengin et al., (2005) en brotes de frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) se encontró una relación inversa entre el contenido de clorofila, prolina y agentes antioxidantes respecto a la concentración de exposición a metales como: Pb, Cu, Cd y Hg. Según Zengin e investigadores se observó una disminución entre 18.3% - 22.5% en el contenido total de clorofila en los brotes de frijol a medida que se aumentaba la concentración de Cd de 5.6 ppm a 9.0 ppm. Considerado los resultados mostrados en la **Figura 7** para 10 ppm de Cd se puede concluir que el aumento inesperado en el contenido de clorofila está relacionado al efecto de hormesis que presentó la planta al ser expuesta al Cd. Según el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) el efecto de hormesis es un término utilizado en el campo de la toxicología para indicar la respuesta bifásica que hay a un agente ambiental caracterizado por una baja dosis de estimulación o efecto beneficioso y un efecto inhibitor o tóxico de dosis elevada (Mattson, 2008).

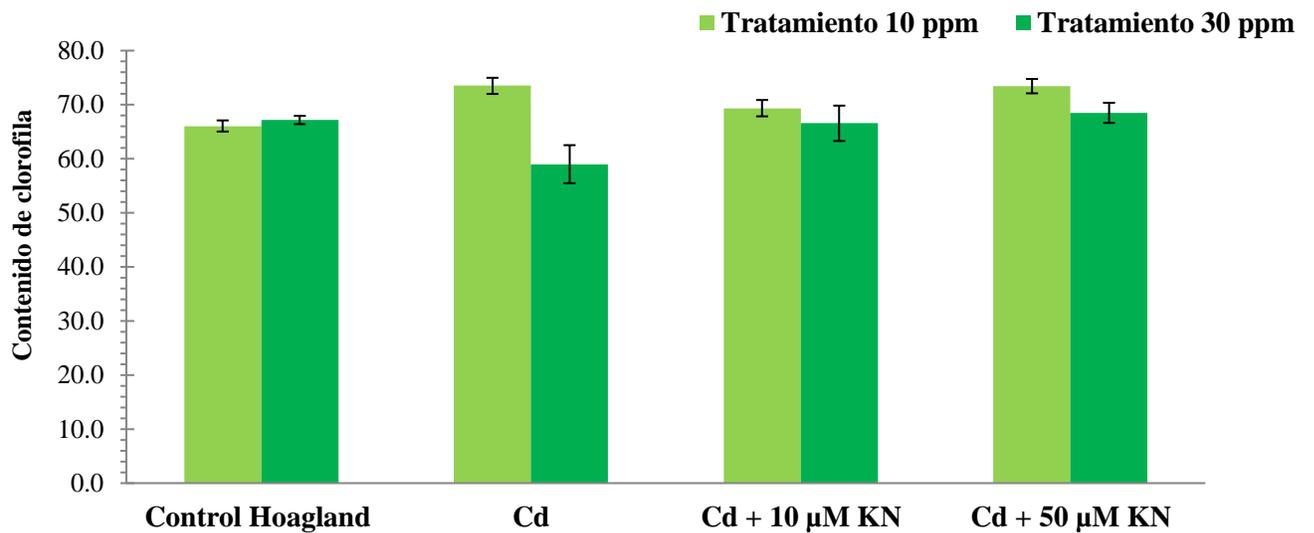


Figura 7. Efecto de la exposición a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de 10 μ M KN y 50 μ M KN en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Por otra parte, a concentraciones de 30 ppm de Cd el estrés provocado en la planta afecta significativamente el proceso fotosintético disminuyendo notablemente el contenido de clorofila comparado con el grupo control. En el caso de los tratamientos de Cd + KN se observa un patrón favorable para la planta. Cuando se utiliza la combinación 10 ppm de Cd + 10 μ M de KN se ve un aumento en el nivel de clorofila comparado al control. El comportamiento observado en presencia de 10 μ M de KN se atribuye a que la KN a concentraciones bajas puede aliviar el estrés ocasionado por el Cd (Gadallah, 2008). A concentraciones de 10 ppm de Cd + 50 μ M de KN se observó un comportamiento similar dado que hubo un aumento en el contenido de clorofila.

El tratamiento de 30 ppm de Cd + 10 μ M de KN mostró un mejor desarrollo físico considerando el estrés ocasionado a la planta la presencia de Cd respecto al tratamiento que incluía sólo 30 ppm de Cd; donde las plantas fueron consideradas poco saludables debido al bajo nivel de clorofila producido. Las plantas expuestas a 30 ppm de Cd + 50 μ M de KN siguieron un comportamiento similar a las expuestas a 30 ppm de Cd + 10 μ M de KN indicando que a 30 ppm de Cd la concentración de la KN no produce diferencias significativas.

4.1.3. Efecto de ácido giberélico (GA3) en el contenido de clorofila

En la **Figura 8** se puede observar un aumento considerable en el nivel total de clorofila en las plantas expuestas a 10 μ M de GA3 de 62.8 (\pm 0.8) a 67.7 (\pm 0.8) comparado al grupo control. Las plantas expuestas a 50 μ M de GA3 mostraron un leve aumento en el nivel de clorofila de 62.8 (\pm 0.8) a 64.1 (\pm 1.0) respecto al control. Sin embargo, se observó que a mayor concentración de fitohormona el nivel de clorofila descendió dando a concluir que la concentración óptima de GA3 fue 10 μ M, aunque el contenido de clorofila no varió significativamente ($p \geq 0.05$) entre tratamientos.

Las fitohormonas son utilizadas para mejorar la productividad en las plantas. En el caso de las giberelinas, éstas ayudan en la división celular y aumentan el tamaño de la planta promoviendo un efecto fisiológico positivo (Ozioko et al., 2015). El ácido giberélico (GA3) en particular puede mejorar el crecimiento de la planta y la absorción y transporte de nutrientes iónicos. Además de estar relacionada con el proceso favorable de germinación, elongación de tallos y expansión de hojas (Rashad et al., 2014).

Según resultados obtenidos por Gomathinayagam et al., (2009) los niveles de clorofila a, clorofila b y carotenoides aumentaron en presencia de ácido abscísico y ácido giberélico al exponer la planta *Andrographis paniculata* a concentraciones de 5 μM de ambos reguladores de crecimiento. Por su parte Bata et., (1974) expuso cultivos de *Lemna trisulca* a diferentes concentraciones de GA3 y KN encontrando que a concentraciones de 2.9 μM de GA3 el contenido de clorofila en los cultivos no sufría deterioro al ser comparado con un grupo control.

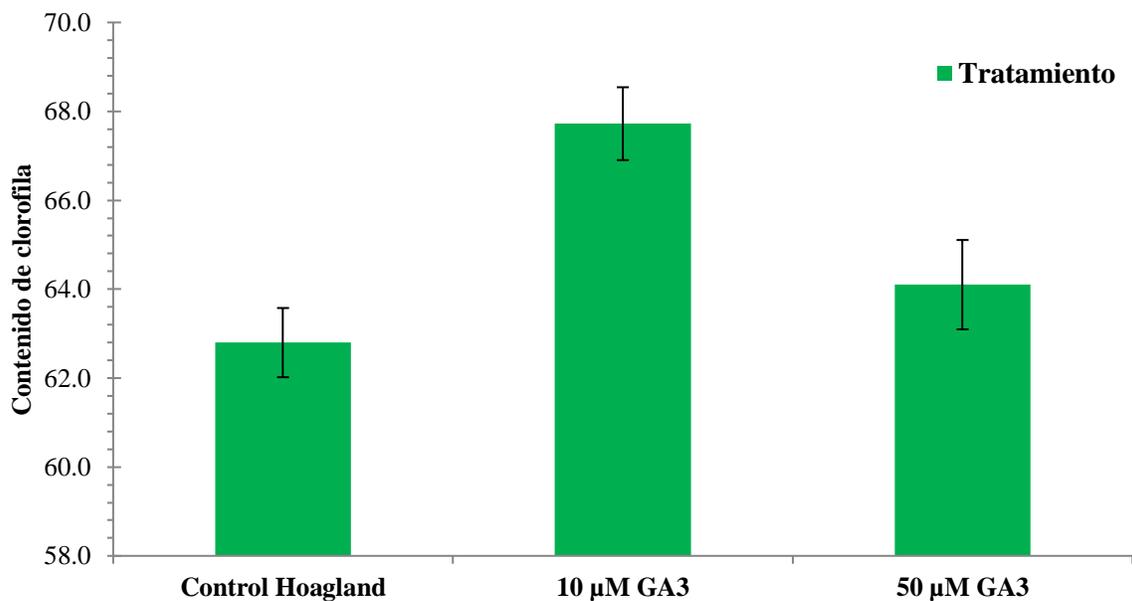


Figura 8. Efecto de 10 μM de GA3 y 50 μM de GA3 en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

4.1.4. Efecto de ácido giberélico (GA3) y cadmio (Cd) en el contenido de clorofila

La exposición de la planta *Leucaena leucocephala* a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd se monitoreó como parámetro de la toxicidad del metal hacia la planta considerando el contenido de clorofila total. En la **Figura 9** se puede observar una diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los grupos control de 5.6 (± 0.8) en el contenido total de clorofila. La discrepancia observada se puede atribuir al tiempo de colecta de las semillas utilizadas ya que fue realizado en diferentes estaciones del año. En cuanto a las plantas expuestas a concentraciones de 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd se puede apreciar una disminución en el nivel de clorofila como indicativo del efecto tóxico del metal como discutido anteriormente. Según Küpper et al., (2007), el Cd es un inhibidor efectivo de la síntesis de clorofila debido a que se enlaza fuertemente con las proteínas dañando el aparato fotosintético como son el complejo reductor de luz II y los fotosistemas I (PSI) y II (PSII).

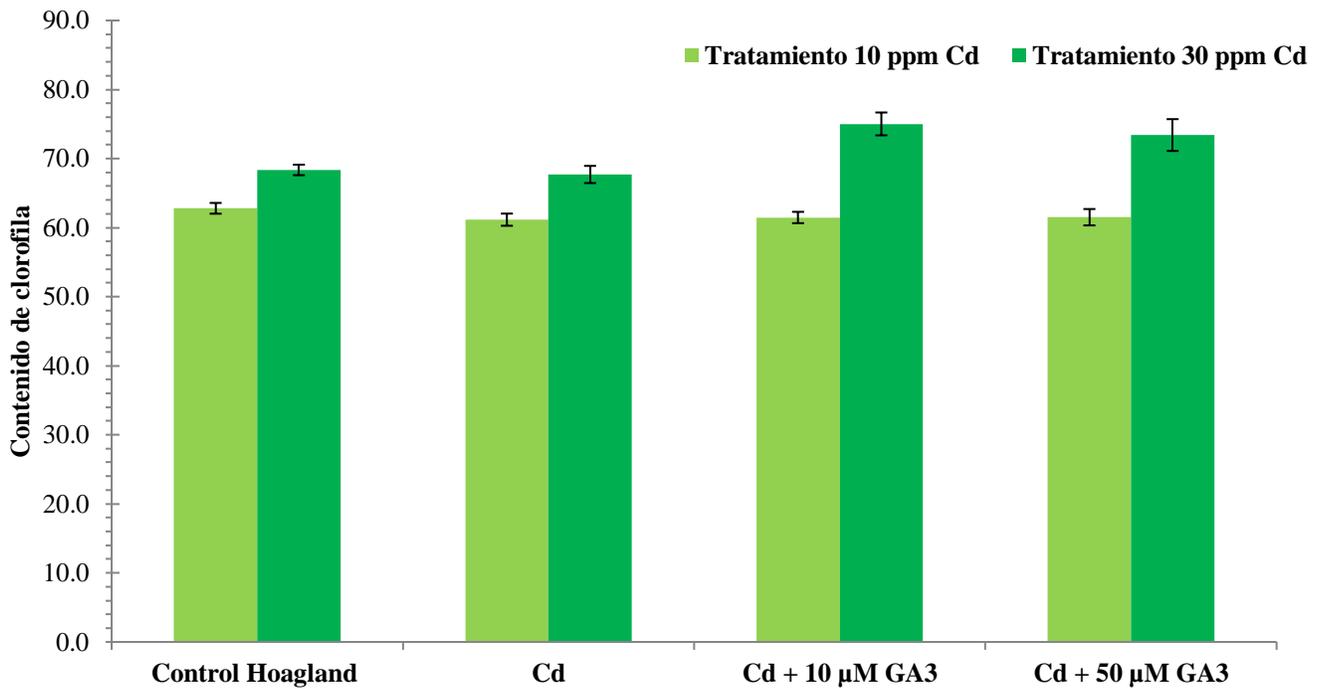


Figura 9. Efecto de la exposición a 10 ppm y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de 10 µM de GA3 y 50 µM de GA3 en el contenido de clorofila en las hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 5 días de tratamiento. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Por su parte la presencia de GA3 a una concentración de 50 µM mitiga notablemente el estrés ocasionado por el Cd mediante un aumento en el nivel de clorofila. Sin embargo, no hubo diferencias significativas para las plantas tratadas con 10 ppm de Cd + 10 µM de GA3 y 30 ppm de Cd + 10 µM de GA3 comparado con las plantas expuestas a solamente 10 ppm de Cd.

El efecto del GA3 en *Chlorella vulgaris* (Green Algae) expuesta a Cd y Pb fue estudiado por Falkowska et al., (2011). La fitohormona GA3 mostró un efecto positivo reduciendo el estrés ocasionado a la exposición de los metales en concentraciones de 0.011 ppm a 0.11 ppm. Por su parte, Wheeler et al., (1963) estudió el efecto de GA3 en el contenido de clorofila de *Solanum tuberosum*. Las plantas expuestas a una solución de GA3 mostraron un aumento en el nivel de clorofila por hoja, además de un aumento en el área de la misma.

4.1.5. Comparación entre KN y GA3 a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd

En la **Figura 10** se establece una comparación entre las plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd en presencia y ausencia de las fitohormonas KN y GA3 a 10 μ M y 50 μ M. Se puede observar un aumento significativo ($p \geq 0.05$) en el contenido de clorofila en las hojas de la planta expuestas a 10 ppm de Cd + KN de 69.4 (± 0.7) a 73.4 (± 0.8) a medida que aumenta la concentración de la fitohormona en solución. Esto da indicio de un alivio al estrés ocasionado por la presencia de Cd dado que se observó un aumento en el proceso fotosintético de clorofila comparado al grupo control. Es importante recalcar, como mencionado anteriormente, que las plantas expuestas a 10 ppm de Cd mostraron un aumento en el nivel de clorofila debido al efecto de hormesis que presentó la planta al entrar en contacto con el Cd. Por otro lado, las plantas expuestas a 10 ppm de Cd + 10 μ M de GA3 y 10 ppm de Cd + 50 μ M de GA3 no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre el grupo control y las expuestas a una concentración de 10 ppm de Cd. Por

tanto, se puede concluir que la KN contribuyó notablemente aliviando el estrés ocasionado por el Cd en solución.

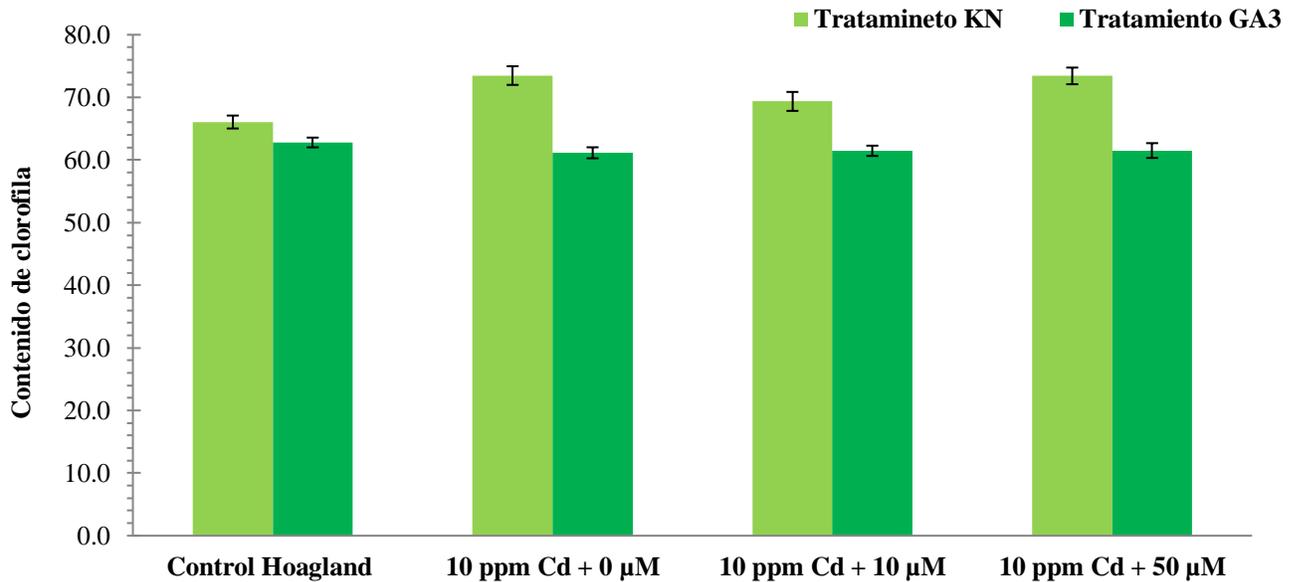


Figura 10. Contenido de clorofila en hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Las plantas expuestas a 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de las fitohormonas KN y GA3 a 10 μM y 50 μM se muestran en la **Figura 11**. En términos comparativos se puede observar que ambas fitohormonas redujeron significativamente el estrés ocasionado por la exposición a 30 ppm de Cd. En adición se puede observar el efecto tóxico del metal por una disminución en el contenido de clorofila comparado con el grupo control.

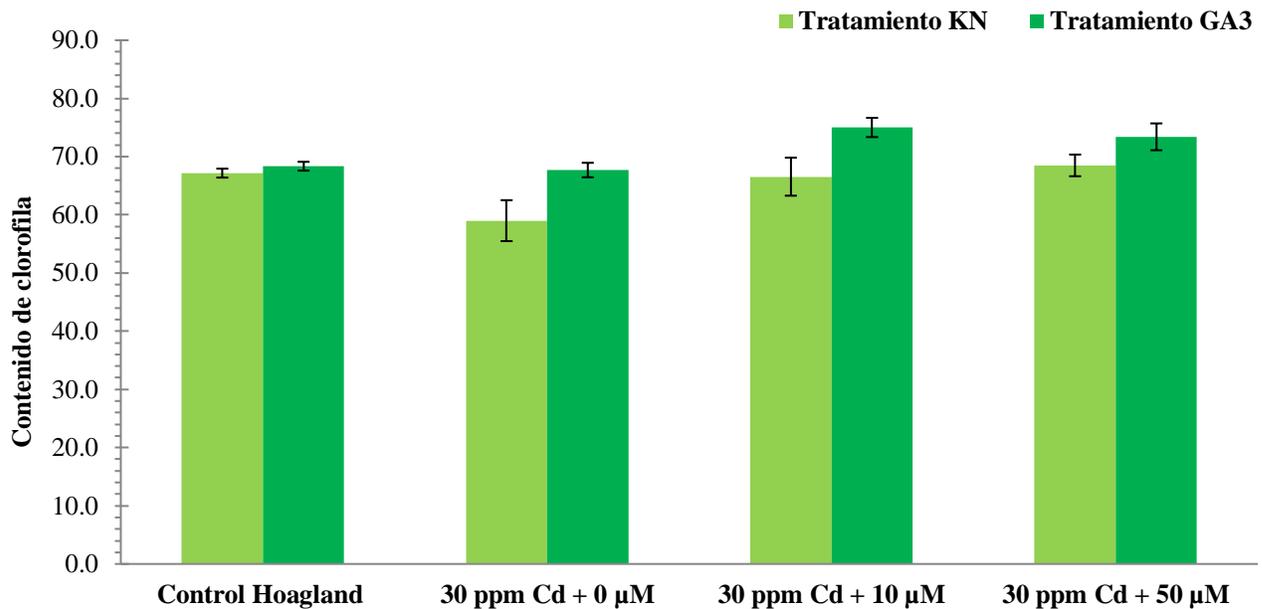


Figura 11. Contenido de clorofila en hojas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM . Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Kabar (1989) reportó el efecto de KN y GA3 en el proceso de germinación de semillas de monocots y dicots bajo condiciones de salinidad. Según sus resultados se observó que el regulador de crecimiento KN fue más efectivo aliviando el estrés ocasionado por la presencia de un ambiente salino para dicots, pero GA3 fue más efectivo para monocots.

4.2. Elongación de la raíz

4.2.1. Efecto de cadmio en el largo de la raíz

La exposición de *Leucaena leucocephala* a diferentes concentraciones de Cd se llevó a cabo experimentalmente, y se estableció una correlación entre el proceso de elongación de raíces y la concentración de exposición. Según se ilustra en la **Figura 12** la presencia de Cd inhibió el proceso de elongación de las raíces comparado con el grupo control. Grãtao et al., (2009), estableció que la presencia de Cd inhibe la elongación de la raíz y disminuye la materia seca. Por su parte, Bautista et al., (2013) reporta el efecto de Cd y Cr en el proceso de germinación y elongación de la raíz en lechuga, espinaca y acelga. Las especies expuestas a concentraciones de Cd entre 2.81 ppm – 5.62 ppm mostraron una reducción en el proceso de germinación y elongación de su sistema de raíces al ser comparadas con un grupo control.

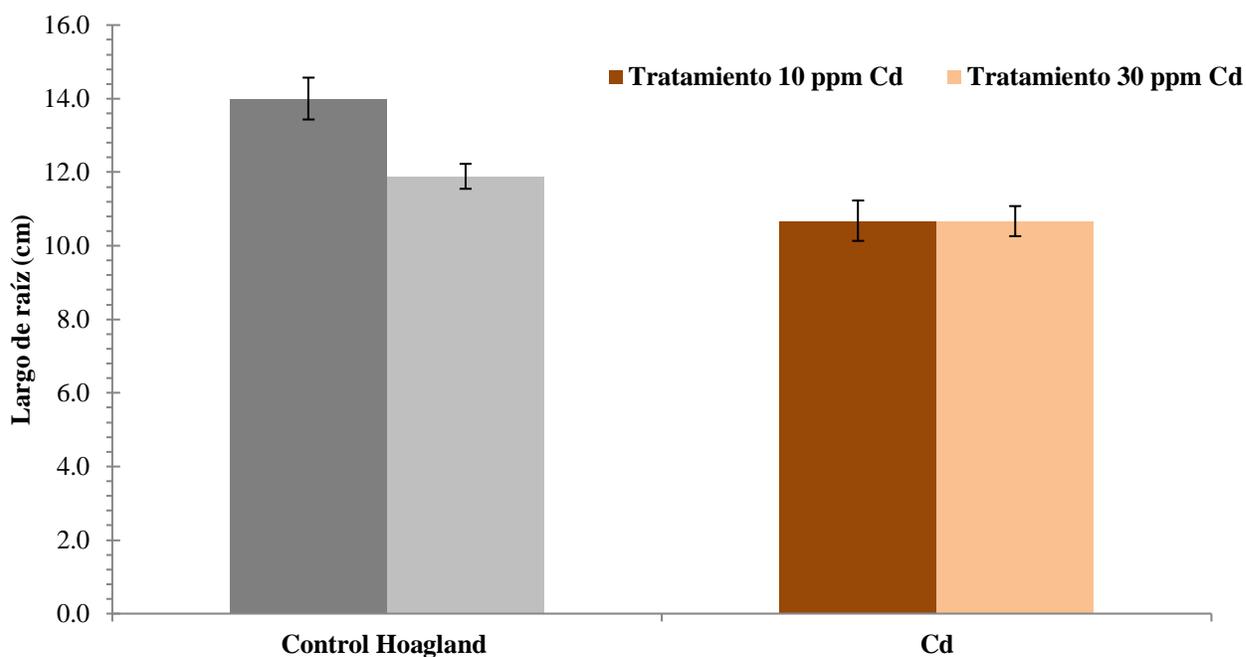


Figura 12. Largo de raíz en plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

En las **Figuras 13 a – c** se muestran imágenes del proceso de cosecha luego del período de exposición a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd (**Figuras 13 b y 13 c**) comparadas con el grupo control (**Figura 13a**). Las plantas expuestas a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd muestran, en general, síntomas físicos de deterioro en sus hojas al ser comparadas con el grupo control. En adición, según indicado anteriormente, el sistema de raíces de las plantas expuestas al contaminante muestra una menor longitud debido a la inhibición ocasionada por la presencia tóxica de Cd. El proceso de inhibición del largo de raíz es uno de los síntomas

que se observa en la etapa inicial del proceso inhibitorio ocasionado por el período de exposición a Cd (He et al., 2017).

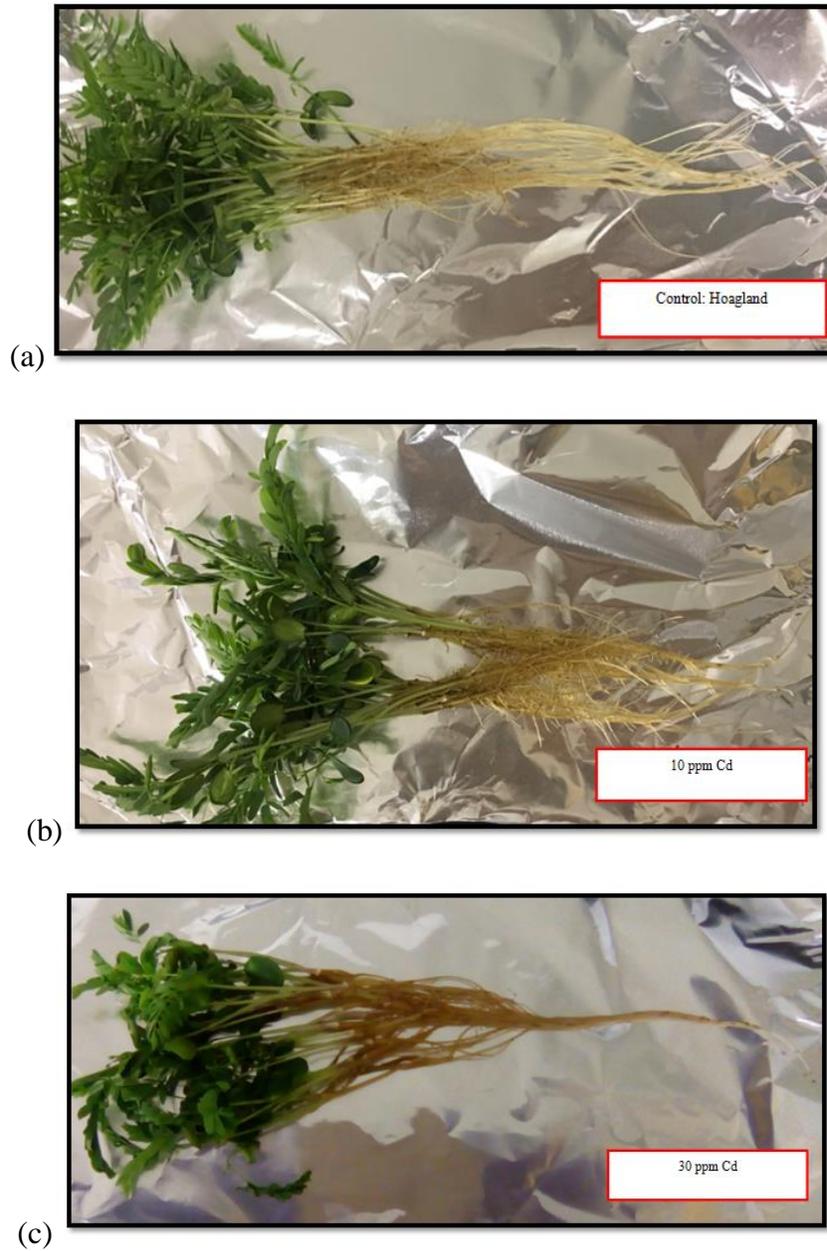


Figura 13. Plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a: (a) 0 ppm de Cd, (b) 10 ppm de Cd y (c) 30 ppm de Cd luego de 5 días de exposición al metal.

Según indicado por Seth et al., (2008) la despolimerización de los microtubos del citoesqueleto celular y las deformaciones cromosómicas son síntomas inducidos por Cd dando como resultado la inhibición en el proceso de elongación de la raíz. Por su parte, Liu et al., (2003) estudió el efecto de Cd sobre el crecimiento de la raíz y división celular en *Allium sativum* L. Sus resultados mostraron que la velocidad de elongación de las raíces disminuía por día a medida que la concentración de Cd se aumentaba en los grupos tratados.

4.2.2. Efecto de cinetina (KN) y ácido giberélico (GA3) en el largo de raíz

El efecto de KN y GA3 en la elongación de la raíz de *Leucaena leucocephala* se evaluó a diferentes concentraciones de la fitohormona. En la **Figura 14** se puede observar un aumento significativo en el largo de la raíz de las plantas que estuvieron en presencia de GA3. En adición, a una concentración de 10 μ M de GA3 ocurrió la mayor elongación de la raíz con una longitud de 23.7 (\pm 0.7) cm comparado con 20.0 (\pm 0.7) cm del grupo control. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Ohkawa et al., (1989) en los que reporta que el GA3 aplicado de forma exógena a *Datura innoxia* promueve la elongación de la raíz y ramificación lateral.

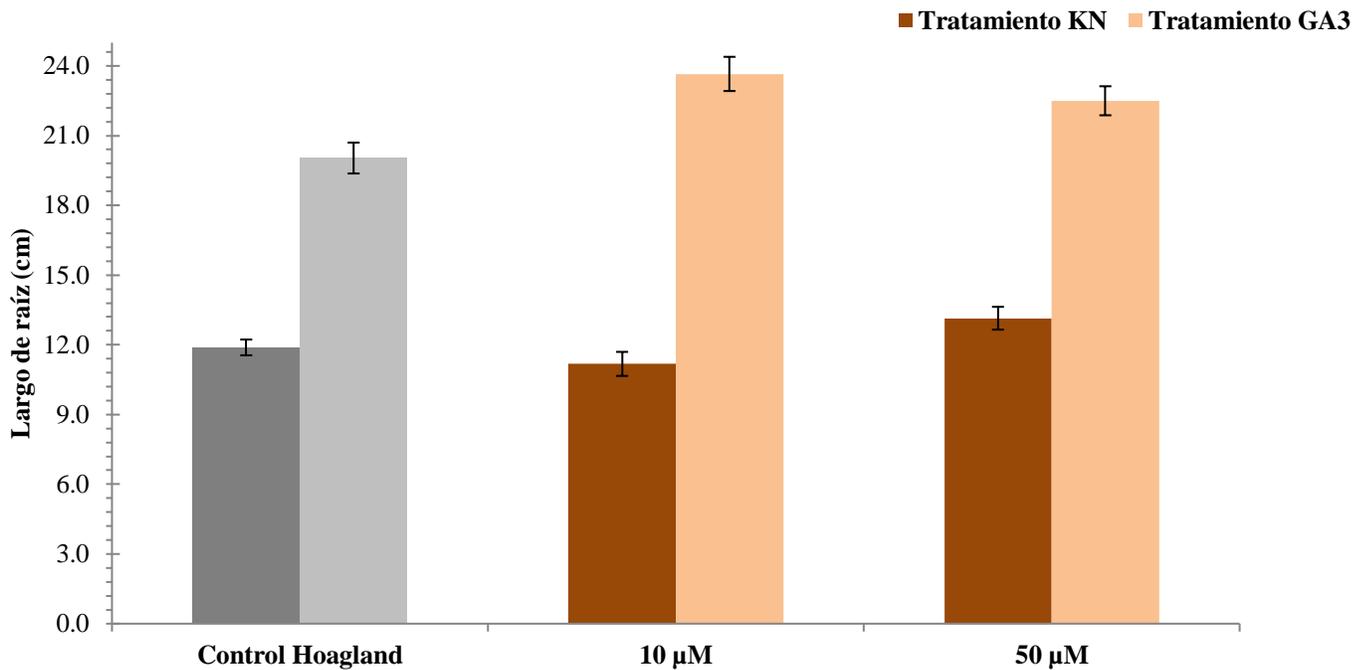


Figura 14. Largo de raíz en plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 μ M y 50 μ M de KN y GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Las plantas expuestas al tratamiento con KN no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en la elongación de la raíz entre el grupo control y las plantas expuestas a 10 μ M de KN. Engelbrecht et al., (1961) indica que la KN puede inhibir o prevenir la regeneración y el crecimiento de las raíces; lo cual se atribuye a la capacidad de la KN para inhibir la migración de aminoácidos y otras sustancias. Sin embargo, la KN brinda un efecto estimulador en la división celular; aunque su efecto es más pronunciado cuando trabaja en conjunto con ácido indolacético.

4.2.3. Efecto de cinetina (KN) y ácido giberélico (GA3) en el largo de la raíz en presencia de cadmio

Según discutido en secciones previas, la presencia de un factor externo puede afectar negativamente el desarrollo y funcionalidad de un sistema. En este caso se observó el efecto tóxico que indujo la presencia de Cd a la planta *Leucaena leucocephala*. La **Figura 15** ilustra el efecto de 10 ppm de Cd en el largo de raíz en plantas expuestas por un periodo de 5 días al Cd. Se puede observar una leve disminución en el largo de la raíz comparado al grupo control. Sin embargo, los sistemas tratados con Cd más la hormona de crecimiento GA3 mostraron un leve aumento en la elongación de la raíz. Respecto al efecto de KN hubo un aumento en la raíz a 10 ppm de Cd + 10 μ M comparado con el tratamiento de 10 ppm de Cd, aunque comparado con el grupo control el GA3 arrojó mejores resultados.

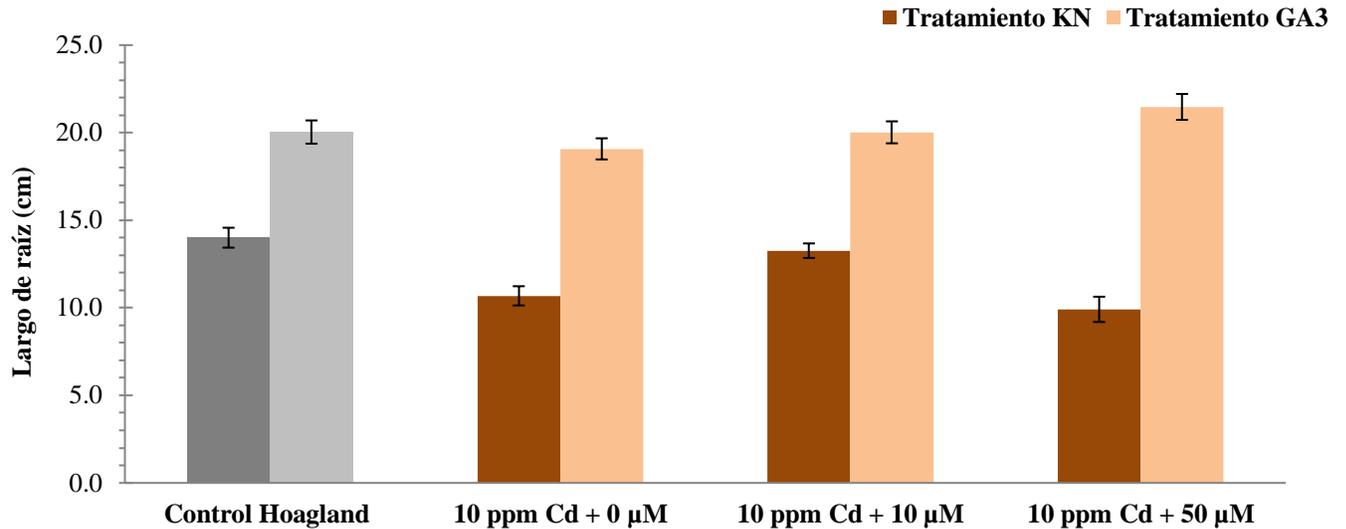


Figura 15. Largo de raíz en plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μM y 50 μM. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Las plantas tratadas con 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas mostraron un comportamiento similar al discutido previamente. Se puede observar en la **Figura 16** que la presencia de GA3 aumentó significativamente el largo del sistema de raíces en la planta *Leucaena leucocephala* comparado con las plantas en presencia de 30 ppm de Cd. En el caso de KN no hubo cambios significativos ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos expuestos al Cd y las fitohormonas.

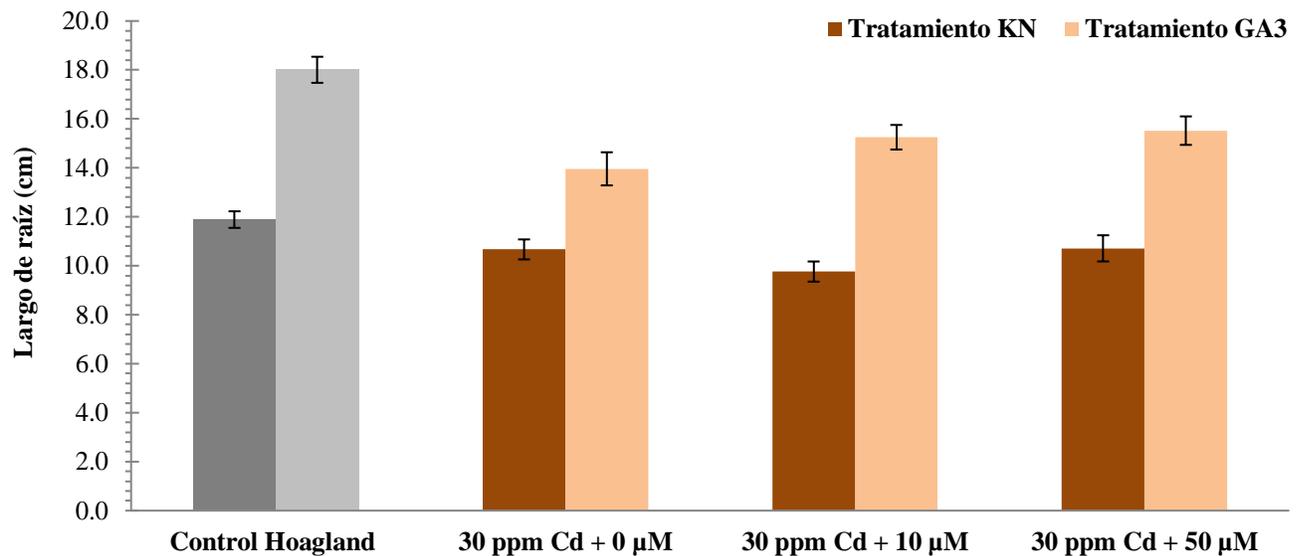


Figura 16. Largo de raíz en plantas de *Leucaena leucocephala* expuestas a 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de fitohormonas (KN y GA3) a 10 μ M y 50 μ M. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Ivanov et al., (2003) reportó el impacto de los metales pesados en el crecimiento de las raíces de *Zea mays* L. relacionado a su selectividad y especificidad. Según sus resultados la exposición diferentes metales como: Cd, Pd, Zn, Cu, Tl, Co, Hg y Ag propiciaron un efecto tóxico en la planta que fue reflejado con la inhibición del crecimiento de las raíces en los primeros días de exposición.

4.3. Análisis de la absorción de cadmio

4.3.1. Absorción de Cd en presencia y ausencia de KN en los diferentes tejidos de *Leucaena leucocephala*

La concentración de Cd en la raíz, tallo y hoja de la planta *Leucaena leucocephala* se evaluó a concentraciones de exposición de 10 y 30 ppm de Cd. La absorción del metal por el sistema de raíces de la planta fue significativamente mayor ($p \geq 0.05$) en relación con la concentración del metal traslocado al tallo. Cuando las plantas fueron expuestas a 30 ppm de Cd se observó una mayor absorción de Cd por las raíces lo que se puede explicar por la bio-disponibilidad del Cd iónico en solución (Cd^{2+}). Al existir una concentración mayor de Cd en el medio, se observa una mayor absorción del mismo por las raíces de las plantas (**Figura 17**).

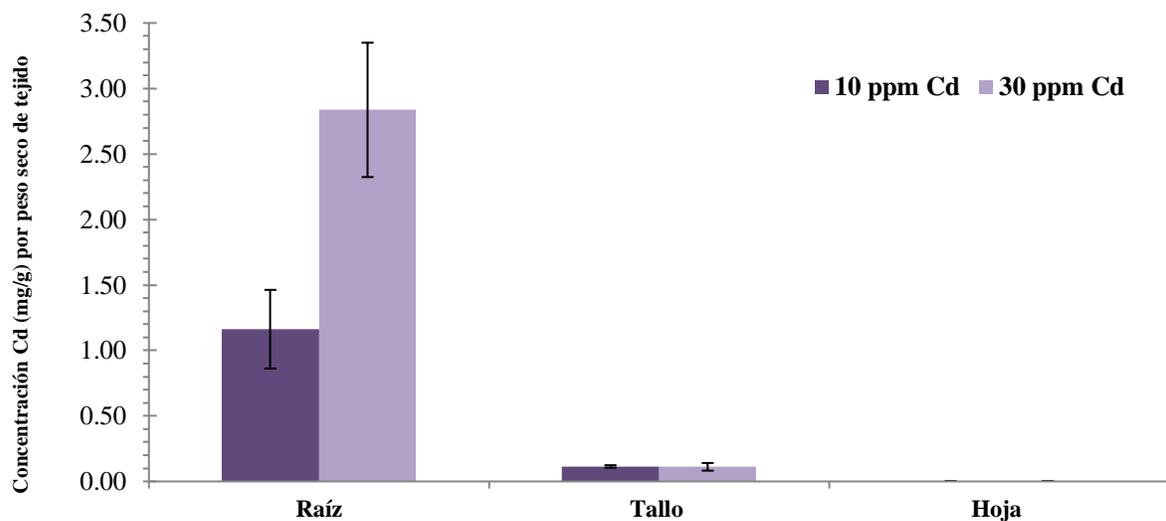


Figura 17. Concentración de Cd en los diferentes tejidos de *Leucaena leucocephala*. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Según se ilustra en la **Figura 17** la translocación de Cd fue mínima hacia el tallo; sin embargo, la hoja no mostró presencia del contaminante. La poca presencia y/o ausencia de Cd en los segmentos aéreos (tallo y hoja) de la planta hacen referencia a un mínimo proceso de translocación, ya que ocurrió una mayor retención de Cd por el sistema de raíces justificando el proceso de fitoestabilización llevado a cabo por la planta. En la **Tabla 3** se muestra la concentración de Cd absorbida por la raíz y el tallo con su error estándar asociado.

Tabla 3. Concentración de Cd en el sistema de raíces y tallos de la planta *Leucaena leucocephala*

	10 ppm Cd (mg/g)	30 ppm Cd (mg/g)
Raíz	1.2 (± 0.5)	2.8 (± 0.9)
Tallo	0.11 (± 0.02)	0.11 (± 0.05)

Song et al., (2017) reportó la absorción y mecanismos de transporte de Cd en las plantas. Estos investigadores concluyen que cuando las plantas son expuestas a Cd, éstas inician procesos que minimizan el efecto tóxico del metal. Por ejemplo, la producción de ácidos orgánicos, quelación y secuestro de metales ayudan a evitar el acceso de Cd hacia la raíz. Sin embargo, éste puede ser transportado a través de las raíces, tallos y hojas mediante rutas apoplásticas y simplásticas.

La exposición a diferentes concentraciones de KN actuó sinérgicamente en el proceso de absorción comparado con las raíces expuestas a 10 ppm y 30 ppm de Cd. Según

ilustrado en la **Figura 18** se puede apreciar un aumento significativo ($p \geq 0.05$) en el proceso de absorción del metal cuando se realizó el tratamiento de Cd + 50 μ M de la hormona de crecimiento (KN). El aumento en la toma del metal se debe al alivio brindado por la hormona al estrés ocasionado por la exposición a Cd.

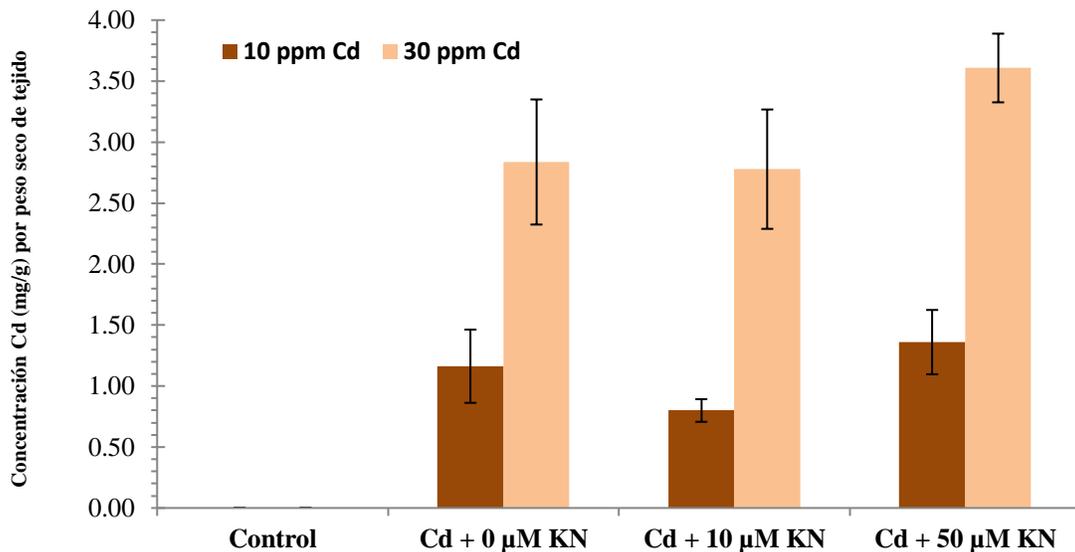


Figura 18. Concentración de Cd en el sistema de raíces de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μ M y 50 μ M de la fitohormona KN. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

El tratamiento de Cd + 10 μ M de KN no mostró aumentos significativos ($p \geq 0.05$) en la toma de Cd comparado con el grupo control expuesto solamente al contaminante (Cd + 0 μ M). En la **Tabla 4** se muestra la concentración de Cd absorbida por el sistema de raíces con su error estándar asociado.

Tabla 4. Concentración de Cd en el sistema de raíces de la planta *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de la fitohormona KN.

	10 ppm Cd (mg/g)	30 ppm Cd (mg/g)
0 uM	1.2 (± 0.5)	2.8 (± 0.9)
10 uM	0.8 (± 0.2)	2.8 (± 0.9)
50 uM	1.4 (± 0.5)	3.6 (± 0.5)

La concentración de Cd en los tallos de *Leucaena leucocephala* en presencia de 10 μ M de KN fue significativamente mayor en el tratamiento de 30 ppm de Cd + 50 μ M de KN (**Figura 19**). El comportamiento observado se debe, como indicado anteriormente, a la mayor bio-disponibilidad de Cd en solución. A concentraciones de Cd + 10 μ M se observa una reducida translocación de Cd²⁺ desde el sistema de raíces hacia el tallo. La baja translocación se puede deber a que la KN no tuvo efecto considerable aliviando el estrés en la planta. En adición, se podría inferir que la reducción en absorción comparada con el grupo expuesto sólo a Cd estaría relacionada al efecto de hormesis mencionado anteriormente. En la **Tabla 5** se muestra la concentración de Cd absorbida por el tallo con su error estándar asociado.

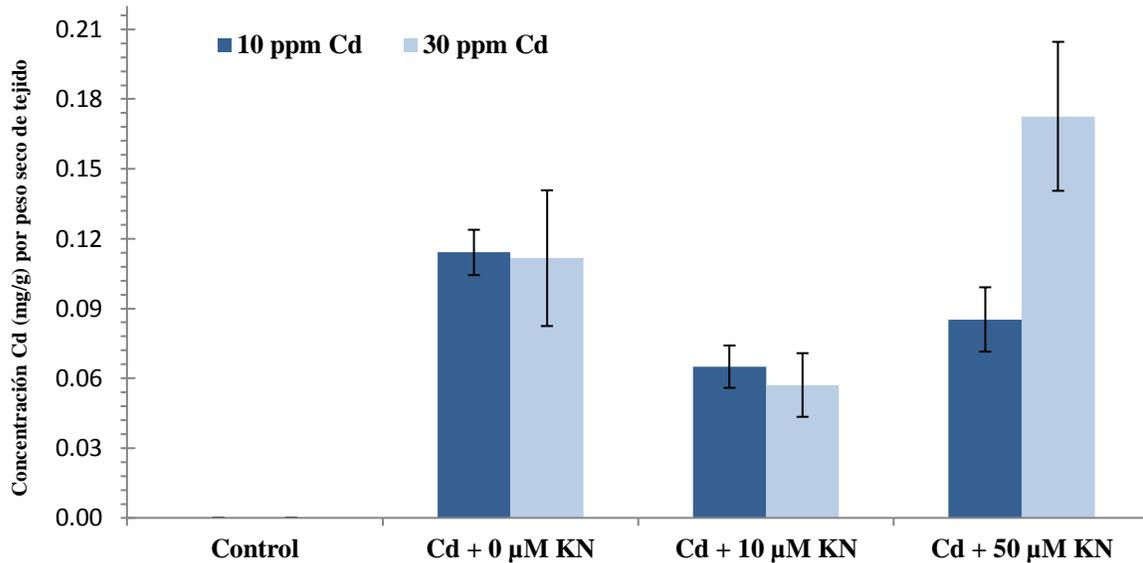


Figura 19. Concentración de Cd en el tallo de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μ M y 50 μ M de la fitohormona KN. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Singh et al., (2018), en los que la planta *Solanum lycopersicum* fue expuesta a 3 y 9 ppm de Cd en arena (simulando el medio de crecimiento en suelo). Los investigadores reportaron una disminución en la translocación de Cd de las raíces hacia la parte aérea cuando la planta fue expuesta a las concentraciones de Cd mencionadas anteriormente y una aplicación foliar de KN. Los investigadores sugieren que el incremento en la acumulación de Cd en las raíces se debe a un aumento en la producción de ácidos orgánicos en los exudados de las raíces por el estrés producido por el Cd. El posible mecanismo de estos ácidos orgánicos sugiere la formación de enlace con el Cd en la parte exterior de la epidermis de la raíz, así como la disminución en la regulación de la expresión genética del transportador *RCD1* en la membrana celular de la raíz.

Tabla 5. Concentración de Cd en el tallo de la planta *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de la fitohormona KN.

	10 ppm Cd (mg/g)	30 ppm Cd (mg/g)
0 μM	0.11 (± 0.02)	0.11 (± 0.05)
10 μM	0.07 (± 0.02)	0.06 (± 0.02)
50 μM	0.09 (± 0.02)	0.17 (± 0.06)

4.3.2. Absorción de Cd en presencia y ausencia de GA3 en los diferentes tejidos de *Leucaena leucocephala*

La **Figura 20** muestra que la exposición a la hormona promovió la absorción de Cd cuando se añadió una concentración de 50 μM de GA3. El tratamiento con GA3 a 10 μM no mostró una diferencia significativa ($p \geq 0.05$) comparado con el grupo expuesto a Cd solamente.

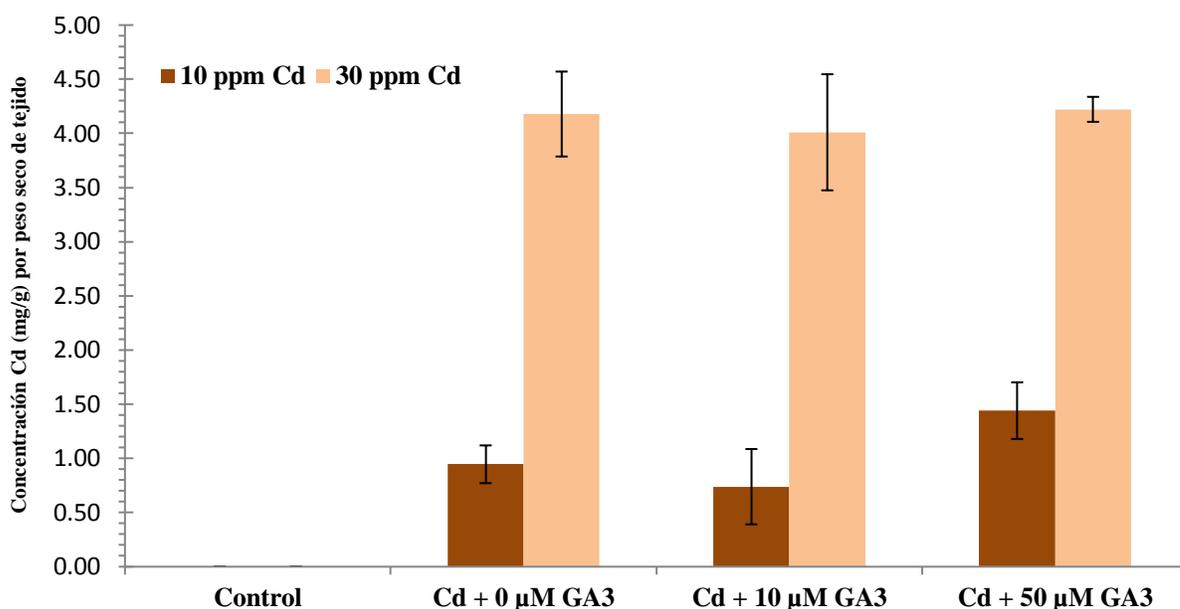


Figura 20. Concentración de Cd en el sistema de raíces de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Al comparar la absorción de Cd por el sistema de raíces en presencia de KN y GA3 se puede observar que la mayor absorción ocurrió en presencia de la fitohormona GA3. Una posible justificación al comportamiento observado puede ser que el GA3 promueve la elongación y ramificación del sistema de raíces (ramificación de raíces secundarias), como discutido en secciones previas, lo que facilita la incorporación de Cd en la planta. Por su parte, la KN inhibe la elongación de las raíces brindando una menor área de contacto y por consiguiente limitando el proceso de absorción. En la **Tabla 6** se reportan los valores de la concentración de Cd absorbida por el sistema de raíces en presencia y ausencia de GA3.

Tabla 6. Concentración de Cd en el sistema de raíces de la planta *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de la fitohormona GA3.

	10 ppm Cd (mg/g)	30 ppm Cd (mg/g)
0 μM	1.0 (\pm 0.3)	4.2 (\pm 0.7)
10 μM	0.7 (\pm 0.7)	4.0 (\pm 0.9)
50 μM	1.4 (\pm 0.4)	4.2 (\pm 0.2)

La translocación de Cd de la raíz hacia el tallo en presencia de GA3 fue significativamente mayor ($p \geq 0.05$) en comparación con el tratamiento de KN. Según se ilustra en la **Figura 21** se obtuvo un comportamiento poco consistente entre tratamientos. Sin embargo, al comparar el tratamiento de 10 ppm de Cd + 0 μ M con las plantas expuestas a 10 ppm de Cd + 10 μ M de GA3, se puede apreciar un proceso de mayor translocación de Cd. Las diferencias significativas entre los tratamientos se pueden atribuir al porcentaje de error estándar en la medida indicado en la gráfica.

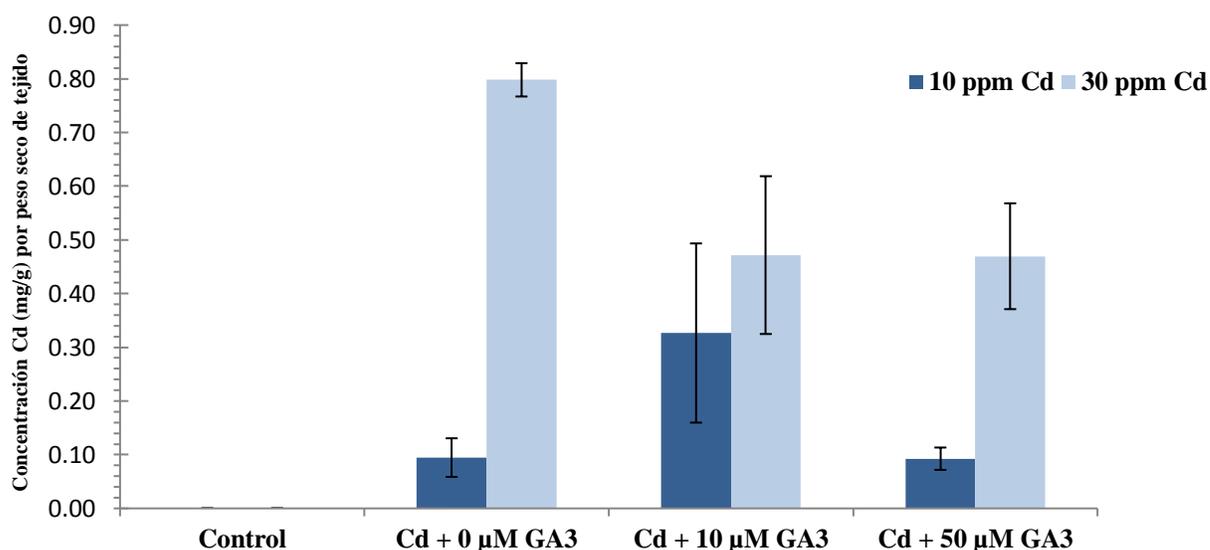


Figura 21. Concentración de Cd en el tallo de *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de 10 μM y 50 μM de la fitohormona GA3. Los resultados representan el valor promedio de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la medida.

Sun et al., (2013) muestra el efecto de GA3 y el surfactante Tween-80 sobre la translocación de Cd en los tallos de *T patula* expuestos a una concentración de 20 ppm de Cd en suelo. Aunque en este caso el medio de crecimiento es diferente, el efecto causado por el ácido GA3 en conjunto con el surfactante es un aumento en la toma y absorción de Cd por la planta. Estos investigadores reportan que la translocación de Cd de la raíz al tallo fue mayor (32% respecto a las plantas control) en los tratamientos que contenían GA3 y Tween-80. Por otro lado, Masood et al., (2016), reportó el efecto de GA3 y etileno en la asimilación de Cd y disminución del efecto tóxico en *Brassica juncea L.* Aunque las plantas fueron crecidas en suelo y la aplicación de GA3 fue foliar, se observa claramente el aumento en la toma del metal en las raíces y hojas de las plantas comparada con la absorción de las plantas control

(22.6 y 24.6 veces más respectivamente). En la **Tabla 7** se muestra la concentración de cadmio absorbida por el tallo en presencia y ausencia de GA3.

Tabla 7. Concentración de Cd en el tallo de la planta *Leucaena leucocephala* en presencia y ausencia de la fitohormona GA3.

	10 ppm Cd (mg/g)	30 ppm Cd (mg/g)
0 uM	0.10 (± 0.06)	0.80 (± 0.05)
10 uM	0.3 (± 0.3)	0.5 (± 0.20)
50 uM	0.09 (± 0.04)	0.5 (± 0.2)

4.4. Factores de concentración

La capacidad que tienen las plantas para absorber y translocar metales del suelo a la parte aérea se puede medir en términos del factor de bioconcentración (BCF) y el factor de translocación (TF) (Lokeshwari et al., 2006). Según los resultados mostrados en la **Tabla 8** y **Tabla 9** se puede concluir que la planta *Leucaena leucocephala* no posee la capacidad de translocar el Cd de su sistema de raíces a la fracción aérea de la planta en grandes cantidades. Lasat et al., (2000) indica que factores de translocación (TF) menores de uno (1) hacen referencia a un proceso ineficiente de translocación hacia los vástagos de la planta. Sin embargo, hay factores importantes como son la edad de la planta, concentraciones de Cd, tiempo de exposición, medio de crecimiento, etc. que deben ser considerados en futuras

investigaciones y que darían una mejor idea del mecanismo de absorción, acumulación y transporte de Cd dentro de los tejidos de la planta.

El factor de bioconcentración (BCF), según los resultados obtenidos, indica que la planta tiene la capacidad de acumular metales del suelo. Damacia et al., (2014) establece que un proceso de bioacumulación eficiente de metales posee valores de BCF mayores a 1.

Tabla 8. Factor de translocación (TF) y factor de bioconcentración (BCF) a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de KN.

	TF	BCF
10 ppm Cd	0.01	11.41
30 ppm Cd	0.04	3.72
10 ppm Cd + 10 µM KN	0.08	6.50
10 ppm Cd + 50 µM KN	0.06	8.53
30 ppm Cd + 10 µM KN	0.02	1.90
30 ppm Cd + 50 µM KN	0.05	5.75

En términos generales, las plantas expuestas a GA3 mostraron un factor de bioacumulación mayor a las plantas expuestas a KN. Como indicado anteriormente la elongación en el sistema de raíces proporcionada por GA3 ayuda en el proceso de bioacumulación de cadmio dado a que hay mayor área de contacto (**Tabla 9**).

Tabla 9. Factor de translocación (TF) y factor de bioconcentración (BCF) a 10 ppm de Cd y 30 ppm de Cd en presencia y ausencia de GA3.

	TF	BCF
10 ppm Cd	0.10	9.46
30 ppm Cd	0.19	26.80
10 ppm Cd + 10 μM GA3	0.44	32.65
10 ppm Cd + 50 μM GA3	0.06	9.92
30 ppm Cd + 10 μM GA3	0.12	15.53
30 ppm Cd + 50 μM GA3	0.11	15.79

5. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra claramente que las fitohormonas juegan un papel crucial en la absorción, tolerancia y disminución del estrés en la planta *Leucaena leucocephala* expuestas a 10 ppm y 30 ppm de Cd y una concentración óptima de fitohormona. Los resultados mostraron un efecto favorable en la producción de clorofila en las hojas de la planta cuando la concentración de KN en el medio fue de 10 μ M y 50 μ M. Se puede observar un aumento significativo ($p \geq 0.05$) en el contenido de clorofila en las hojas de la planta expuestas a 10 ppm de Cd + KN de 69.4 (± 0.7) a 73.4 (± 0.8) a medida que aumenta la concentración de la fitohormona en solución. Esto da indicio de un alivio al estrés ocasionado por la presencia de Cd dado que se observó un aumento en el proceso fotosintético de clorofila comparado al contenido en las plantas control en el que el valor fue de 66.1 (± 1.0). Los resultados mostraron un aumento en la elongación de la raíz cuando las plantas fueron expuestas a una concentración de 10 μ M de GA3 + Cd. Se observó la mayor elongación de la raíz con una longitud de 23.7 (± 0.7) cm comparado con 20.0 (± 0.7) cm del grupo control. En el caso de KN no hubo cambios significativos ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos expuestos al Cd y 10 μ M y 50 μ M de KN. Con respecto a la absorción de Cd se observó un aumento significativo ($p \geq 0.05$) en el tratamiento de Cd + 50 μ M de la hormona de crecimiento (KN). La absorción de Cd por las raíces en presencia de GA3 fue mayor comparada a la absorción en presencia de KN. La translocación de Cd de la raíz hacia el tallo en presencia de 10 ppm de Cd + 10 μ M de GA3 fue significativamente mayor ($p \geq 0.05$) en comparación con el tratamiento de 10 μ M y 50 μ M de KN. En términos generales, las plantas

expuestas a GA3 mostraron un factor de bioacumulación mayor a las plantas expuestas a KN. Como indicado anteriormente la elongación en el sistema de raíces proporcionada por GA3 ayuda en el proceso de bioacumulación de Cd dado a que hay mayor área de contacto. El estudio muestra resultados prometedores en la utilización de fitohormonas para la fitoextracción de metales como el Cd. Mezclas de diferentes fitohormonas a diferentes concentraciones podría ser evaluada en el futuro para implementar la absorción y translocación del metal.

6. TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES

El efecto de las fitohormonas en la incorporación y absorción de metales mediante los diferentes procesos de fitorremediación ha sido estudiado por varios investigadores en los últimos años y es un área que necesita ser explorada ampliamente debido a los excelentes resultados que se han encontrado. Es por eso que recomiendo los siguientes objetivos para la investigación futura:

- Cuantificar los diferentes nutrientes (macro y micro) presentes en la planta *Leucaena leucocephala* antes y después de la exposición al Cd.
- Estudiar el efecto que tiene la absorción de Cd en toma de nutrientes como Ca, ya que se conoce que ambos metales llevan a cabo un proceso de competencia/interferencia al ser absorbidos por la planta.
- Hacer estudios en hidroponía variando la edad de la planta en el proceso de contaminación, para monitorear el efecto en la absorción de Cd.
- Extrapolar los cultivos de hidroponía a suelo evaluando interferencias con otros metales.
- Disminuir la concentración de Cd a rangos más cercanos a los límites encontrados en suelos contaminados con el metal.
- Aumentar el tiempo de exposición.
- Evaluar el efecto de otras hormonas de crecimiento en la planta *Leucaena leucocephala*.
- Evaluar el efecto conjunto de las fitohormonas KN:GA3, y otras mezclas, a diferentes proporciones en la absorción y compartimentalización de Cd en los tejidos de la planta.

- Realizar modelos matemáticos para la simulación de la toma de nutrientes en presencia de metales.
- Evaluar el efecto de las fitohormonas en la absorción de Cd por *Leucaena leucocephala* en suelos contaminados en Puerto Rico.

7. REFERENCIAS

- Acevedo, D.; Jiménez, B. D.; Rodríguez, C. J. (2006). Trace metals in sediments of two estuarine lagoons from Puerto Rico. *Environ. Pollut.*, *141*, 336-342. doi: 10.1016/j.envpol.2005.08.037
- Bata, J., Nešković, M. (1974). The effect of gibberellic acid and kinetin on chlorophyll retention in *Lemna trisulca* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, *73I(1)*, 86-88. doi: 10.1016/S0044-328X(74)80148-0.
- Bautista, O.V., Fischer, G., & Cárdenas, J.F. (2013). Cadmium and chromium effects on seed germination and root elongation in lettuce, spinach and Swiss chard. *Agron. Colomb.*, *31(1)*, 48-57.
- Beltrán, M. (2001). *Fitoextracción en suelos contaminados con cadmio y zinc usando especies vegetales comestibles* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Boss, C.B., Fredeen, K.J. (1997). Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Segunda edición). U.S.A.
- cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, *12(2)*, 61-66.
- Caruso, F., Mantellato, S., Palacios, M., & Flatt, R.J. (2017). ICP-OES method for the characterization of cement pore solutions and their modification by polycarboxylate-based superplasticizers. *Cement. Concrete. Res.*, *91*, 52-60. doi: 10.1016/j.cemconres.2016.10.007.

- Dabonne, S., Koffi, B., Kouadio, E., Koffi, A., Due, E., Kouame, L. (2010). Traditional utensils: Potential sources of poisoning by heavy metals. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.*, *1(2)*, 90–92.
- De La Rosa, G., Martínez, A., Pelayo, H., Peralta, J. R., Sánchez, B., & Gardea, J. L. (2005). Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kali*). *Plant Physiol. Bioch.*, *43(5)*, 491–498. doi: 10.1016/j.plaphy.2005.03.013.
- De la Rosa, G., Peralta, J. R., Montes, M., Parsons, J. G., Cano, I., and Gardea, J. L. (2004). Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, *55(9)*, 1159–1168. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.01.028.
- Delgadillo, A. E., González, C., Prieto, F., Villagómez, J., & Acevedo, O. (2011). Phytoremediation: An alternative to eliminate pollution. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.*, *14*, 597- 612.
- Dhir, B. (2013) Introduction. In: Dhir, B., Ed., *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up*, Springer India, New Delhi, 1-20. doi: 10.1007/978-81-322-1307-9_1
- Dong, J., Cheng, X., Fu, T., Ding, J., & Fan, X. (2008). Determination of chlorophyll a and b using absorption spectrum. *Guang pu xue yu guang pu fen xi*, *28(1)*, 141-144.
- Engelbrecht, L., & Mothes, K. (1961). The Effect of Kinetin on the Development of Roots. *Plant Cell Physiol.*, *2(3)*, 271-276. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077684.

- Falkowska, M., Pietryczuk, A., Piotrowska, A., Bajguz, A., Grygoruk, A., & Czerpak, R. (2011). The Effect of Gibberellic Acid (GA3) on Growth, Metal Biosorption and Metabolism of the Green Algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck Exposed to Cadmium and Lead Stress. *Pol. J. Environ. Stud.*, 20(1), 53-59.
- Fernandes, J.C. and F.S. Henriques. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot Rev* 57 ,246—273. doi: 10.1007/BF02858564.
- Gadallah, M.A. (2008). Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. *Biol. Plantarum*, 37, 233-240. doi: 10.1007/BF02913219
- Gomathinayagam, M., Anuradha, V.E., Zhao, C., Ayoola, G.A., Abdul-Jaleel, C., Anneerselvam, R.P. (2009). ABA and GA3 affect the growth and pigment composition in *Andrographis paniculata* Wall.ex Nees., an important folk herb, *Front Biol (Beijing)*. 4(3), 337-341. doi: 10.1007/s11515-009-0018-5.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Sci. Total Environ.*, 612, 370-378. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.145.
- Grãtao, P. L., Monteiro, C. C., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., Peres, L. E. P., Medici, L. O., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2009). Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. *Environ. Exp. Bot.*, 67, 387–394.
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo* (Tercera edición). Barcelona, España.
- Harris, D. (2016). *Quantitative Chemical Analysis* (Ninth edition). New York, U.S.A.

- He, Y., Yang, X., He, Z., & Baligar, V. C. (2017). Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: A review. *Pedosphere*, 27(3): 421–438. doi: 10.1016/S1002-0160(17)60339-4.
- Helal, H. M., Upenov, A., & Issa, G. J. (2000). Growth and uptake of Cd and Zn by *Leucaena leucocephala* in reclaimed soils as affected by NaCl salinity. *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 162(6), 589–592. doi: 10.1002/(SICI)1522-2624(199912)162:6<589:AID-JPLN589>3.0.CO;2-1.
- Hou, X., & Jones, B.T. (2000). Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 9468-9485.
- Ivanov, V.B., Bystrova, E.I., & Seregin, I.V. (2003). Comparative Impacts of Heavy Metals on Root Growth as Related to Their Specificity and Selectivity. *Russ. J. Plant Physiol.*, 50(3), 398-406.
- Jadia, C. D., & Fulekar, M. H. (2008). Phytoremediation: The application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel, and lead by sunflower plant. *Environ. Eng. Manag. J.*, 7(5), 547–558.
- Jain, J. (2005). *Fundamental of biochemistry* (Six edition). Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/238738376/Fundamentals-of-Biochemistry-J-L-jain-6th-Edn-2005>.
- Kabar, K. (1989). Comparison of Kinetin and Gibberellic Acid Effects on Seed Germination under Saline Conditions. *Phyton*, 30(2), 291-298.

- Kiran, B., Raja, S. (2017). A Review on Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) with a Special Emphasis on its Applications. *Pharm. Lett.*, 9(10), 44-54.
- Küpper, H., Parameswaran, A., Leitenmaier, B., Trtílek, M., & Setlík, I. (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.*, 1175I(4), 655–674. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., & Kochian, L.V. (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.*, 51(342), 71-79.
- Liu, D., Jiang, W., & Gao, X. (2003). Effects of Cadmium on Root Growth, Cell Division and Nucleoli in Root Tip Cells of Garlic. *Biol. Plantarum*, 47(1), 79-83. doi: 10.1023/A:1027384932338.
- Lokeshwari, H., Chandrappa, G.T. (2006). Impact of heavy metal contamination of Bellandur Lake on soil and cultivated vegetation. *Curr. Sci. India*, 91(5), 622-627.
- López, M.L., Peralta, J.R., Parsons, J.G., Duarte, M., & Gardea, J.L. (2008). Concentration and biotransformation of arsenic by *Prosopis* sp. grown in soil treated with chelating agents and phytohormones. *Environ. Chem.*, 5(5), 320-331. doi:10.1071/EN08044.
- Masood, A., Khan, I.R., Fatma, M., Asgher, M., Per, T.S., & Khan, N.A. (2016) Involvement of ethylene in gibberellic acid-induced sulfur assimilation, photosynthetic responses, and alleviation of cadmium stress in mustard. *Plant. Physiol. Biochem.* 104(1), 1-10. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.03.017.

- Massol, A., & Díaz, E. (2002). *Ciencia y ecología: Vieques en crisis ambiental* (Tercera edición). Puerto Rico.
- Mattson, M. (2008). Hormesis defined. *Ageing res. Rev.*, *7*(1), 1-7.
- Muhammad, S., Iqbal, Zafar, M.S., & Mohammad, A. (2009). Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, *12*(2), 61-66.
- Muradoglu, F., Gundogdu, M., Ercişli, S., Encu, T., Balta, F., Jaafar, H.Z., & Zia-ul-Haq, M. (2015). Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biol. Res.*, *48*(11), 1-7. doi: 10.1186/s40659-015-0001-3.
- Ohkawa, H., Kamada, H., Sudo, H., & Harada, H. (1989). Effects of Gibberellic Acid on Hairy Root Growth in *Datura innoxia*. *J. Plant. Phys.*, *134*(5), 633-636. doi: 10.1016/S0176-1617(89)80161-0.
- Ozioko, F.U., Chiejina, N.V., & Ogbonna, J.C. (2015). Effect of Some Phytohormones on Growth Characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under Photoautotrophic Conditions. *Afr. J. Biotechnol.* *14*(30), 2367-2376. doi: 10.5897/AJB2015.14641
- Paschal, D.C., Burt, V., Caudill, S.P., Gunter, E.W., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Miller, D.T., & Jackson, R.J. (2000). Exposure of the U.S. population aged 6 years and older to cadmium: 1988-1994. *Arch. Environ. Con.. Tox.*, *38*(3), 377-387.
- Pazurkiewicz-Kocot, K., Kita, A., Haduch, A., Kita, A.E., & Haduch, A. (2012). The effect of kinetin on the chlorophyll pigments content in leaves of *Zea mays* L. seedlings and accumulation of some metal ions. *Environ. Prot. Eng.*, *14*(4), 397-409.

- Piotrowska-Niczyporuk, A., & Bajguz, A. (2013). The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regul.*, 73, 57-66. doi: 10.1007/s10725-013-9867-7.
- Pompeu, G.B., Vilhena, M.B., Gratão, P.L., Carvalho, R.F., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., & Azevedo, R.A. (2016). Abscisic acid-deficient sit tomato mutant responses to cadmium-induced stress. *Protoplasma*, 254, 771-783. doi: 10.1007/s00709-016-0989-4.
- Poniedziałek, M., Sękara, A., Jędrzeczyk, E., & Ciura, J. (2010). Phytoremediation efficiency of crop plants in removing cadmium, lead, and zinc from soil. *Folia Hortic.*, 22(2), 25-31. doi: <https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0155>.
- Rashad, R., Hussien, R.A. (2014). A comparison study on the effect of some growth regulators on the nutrients content of maize plant under salinity conditions. *Ann. Agric. Sci.* 59(1), 89-94. doi: 10.1016/j.aoas.2014.06.013.
- Sastre, J., Sahuquillo, A., Vidal, M., Rauret, G. (2002). Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Anal. Chim. Acta*, 462(1), 59-72. doi: 10.1016/S0003-2670(02)00307-0.
- Schmelz, E., Engelberth, J., Alborn, H., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., & Iii, J. (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins , and volatile organic compounds in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(18), 10552-10557. doi: 10.1073/pnas.1633615100.

- Seth, C. S., Misra, V., Chauhan, L., Singh, & R. R. (2008). Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *71*, 711–716.
- Singer, M. (2015, September 22). Photophosphorylation: The light reactions in photosynthesis. Retrieved April 20, 2018, from <https://cnx.org/contents/yPpb9Br3@2/Bis2A-063-Photophosphorylation>.
- Singh, S., Singh, A., Srivastava, P.K., & Prasad, S.M. (2018). Cadmium toxicity and its amelioration by kinetin in tomato seedlings vis-à-vis ascorbate-glutathione cycle. *J. Photochem. Photobiol*, *178*, 76-84. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.025.
- Singh, S., Singh, A., Bashri, G., & Prasad, S.M. (2016). Impact of Cd stress on cellular functioning and its amelioration by phytohormones: An overview on regulatory network. *Plant Growth Regul.*, *80*, 253-263. doi: 10.1007/s10725-016-0170-2.
- Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int. J. Phytoremediation*, *19*(2), 133-141. doi: 10.1080/15226514.2016.1207598.
- Sun, Y., Xu, Y., Zhou, Q., Wang, L., Lin, D., & Liang, X. (2013). The potential of gibberellic acid 3 (GA3) and Tween-80 induced phytoremediation of co-contamination of Cd and Benzo[a]pyrene (B[a]P) using *Tagetes patula*. *J. Environ. Manage.*, *114*, 202–208.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2014). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *NIH*, *101*, 133-164. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4.
- Trewavas A.J. (1991). How do plant growth substances work? *Plant, Cell and Environmental*, *14*, 1-12.

- Tuzen, M. (2003). Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 74(3), 289–297. doi: 10.1016/S0026-265X(03)00035-3.
- Wao A.A., Khare S. & Ganguli S. (2014). Extraction and analysis of heavy metals from soil and plants in the industrial area Govindpura, Bhopal. *J. Environ. Human Health*, 1(2), 158-164. doi: 10.15764/EH.2014.02017.
- Wheeler, A.W., & Humphries, E.C. (1963). Effect of Gibberellic Acid on Growth, Gibberellin Content, and Chlorophyll Content of Leaves of Potato (*Solanum tuberosum*). *J. Exp. Bot.*, 14I(1), 132-136. doi: 10.1093/jxb/14.1.132.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Braz. J. Physiol*, 17(1), 145-156.
- Zengin, F.K., & Munzuroğlu, O. (2005). Effects of Some Heavy Metals on Content of Chlorophyll, Proline and Some Antioxidant Chemicals in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings, *Polish Academy of Sciences*, 47(2), 157-164.
- Zhan, F., He, Y., Yue, X., li, Q., & Xia, Y. (2016). Effect of mycorrhizal inoculation on plant growth, nutrients and heavy metals uptake by *Leucaena leucocephala*. *J. Natutal Sci.*, 25(6), 1760-1767.