



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

I z t a p a l a p a

**ANÁLISIS DE TOLERANCIA AL PLOMO EN GAMETOFITOS DE *ADIANTUM*
CAPILLUS-VENERIS L., EN PRESENCIA DE COBRE Y ZINC**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BIÓL. LAURA GUZMÁN CORNEJO

DIRECTORA: Armida Leticia Pacheco Mota

México, D F. 15 de diciembre de 2015

La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al
Padrón de Posgrados de Calidad del CONACyT. Clave: 1462.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biosistemática de Helechos y Licofitas, del
Departamento de Biología, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, el
laboratorio de Células Vegetales de la Universidad Politécnica de Pachuca y el
Laboratorio Central de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

BIÓL. LAURA GUZMÁN CORNEJO

El día 15 de diciembre de 2015

Comité Tutorial

Directora: Dra. Armida Leticia Pacheco Mota

Asesor: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Asesor: Dr. Pedro Luis Valverde Padilla

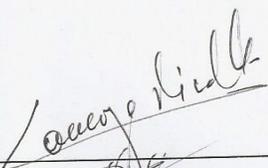
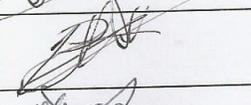
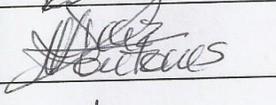
Jurado

Presidente: Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde

Secretario: Dr. Pedro Luis Valverde Padilla

Vocal: Dr. David Manuel Díaz Pontones

Vocal: Dr. Alejandro Alarcón


Dedicatoria

A mis padres que siempre me han apoyado, alentándome a trabajar para lograr las metas que me he trazado en la vida; a mis hermanos, quienes me inspiran para luchar cada día y buscar el bienestar familiar. A todas las personas que me acompañan y me impulsan en el ámbito académico, de quienes he recibido apoyo tanto económico como moral para la realización de este proyecto.

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Pacheco por la dirección y financiamiento de este proyecto; asimismo por su cercanía y atención que día con día me brindó, impulsándome a mejorar profesional y personalmente.

A mis asesores, Dr. David Díaz Pontones y Dr. Pedro Luis Valverde Padilla, por estar al pendiente de mis necesidades académicas en cada una de las partes de la tesis, ayudándome a crecer profesionalmente con su experiencia y correcciones acertadas.

Al Dr. José Luis Blasco Cabal quien fue uno de mis asesores al inicio de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Flores de la Universidad Politécnica de Pachuca, por facilitar el uso de las instalaciones del Laboratorio de Células Vegetales durante la fase experimental del proyecto.

A la Ing. Patricia Castillo del Laboratorio Central de Microscopía Electrónica de esta institución, quien me proporcionó los conocimientos para esta parte de mi trabajo, así como el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB) de alta resolución de emisión de campo, con espectrómetro de dispersión de energía (EDS).

Finalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante el periodo de la maestría, y a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa por la oportunidad de llevar a cabo el proyecto de Maestría en Biología en su programa académico.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Minería en México	7
2.2 Contaminación por residuos	8
2.3 Los metales pesados	9
2.4 Vegetación asociada a jales	11
2.5 <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	13
2.6 Estudios sobre metales en helechos	15
2.7 Efecto tóxico de los metales en vegetales	17
2.8 Plantas tolerantes a metales pesados	19
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	26
6.1. Objetivo general	26
6.2. Objetivos particulares	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Trabajo de campo	27
7.1.1 Área de recolección	27
7.2. Trabajo de laboratorio	28
7.2.1. Siembra de esporas	28
7.2.2. Supervivencia y desarrollo de gametofitos	31

7.2.3. Ubicación de metales en tejidos del gametofito	32
a) Técnica histoquímica para Pb	32
b) Técnica histoquímica para Zn	33
c) Técnica de MEB-EDS	33
7.3. Datos y estadística	34
7.3.1. Efecto del Pb, Cu Zn en los gametofitos	34
7.3.2. Índice de tolerancia	35
8. RESULTADOS	36
8.1. Fase I	36
8.1.1 Germinación y sobrevivencia	36
8.1.2 Desarrollo de gametofitos	40
8.1.3 Caracteres morfométricos	43
8.1.4 Detección de Cu, Zn y Pb en tejidos	47
a) Ubicación <i>in situ</i> de los metales pesados	47
b) Técnica MEB-EDS	50
8.2 Fase II	55
8.2.1 Germinación y sobrevivencia	55
8.2.2 Desarrollo de gametofitos	57
8.2.3 Caracteres morfométricos	59
8.2.4 Detección de Zn y Pb en tejidos	61
a) Ubicación <i>in situ</i> de metales pesados	61
8.3. Índice de tolerancia	63
9. DISCUSIÓN	64
10. CONCLUSIONES	74
11. LITERATURA CITADA	75

RESUMEN

Algunos metales pesados son micronutrientes para las plantas, pero en concentraciones que rebasan dichas necesidades se vuelven tóxicos. Los helechos son metalofitas capaces de tolerar estas condiciones mediante mecanismos de evasión, exclusión y/o acumulación de los metales. Este estudio determinó la toxicidad del plomo (Pb), cobre (Cu) y zinc (Zn) en los gametofitos de *Adiantum capillus-veneris* L., desde la germinación de esporas, desarrollo y en parámetros morfométricos (en etapa joven). Se recolectaron esporas de individuos encontrados a orillas de un jale en Zimapán, Hidalgo, se sembraron y mantuvieron en medio de cultivo Thompson, bajo tratamientos de Pb (45-257 μM), Cu (13-77 μM) y Zn (81-463 μM); los intervalos se basan en la concentración de los metales presentes en el jale muestreado, obtenidas en un estudio previo, con valores mayores y menores a éstos. Además, se incluyeron tratamientos de los metales combinados con las concentraciones equivalentes al sitio. Los datos se analizaron mediante una prueba estadística de ANOVA. Asimismo, se localizó, mediante pruebas histoquímicas al Pb y al Zn en los tejidos del gametofito joven y se corroboró su presencia, incluyendo al Cu, mediante un microscopio electrónico de barrido de alta emisión de campo con espectrómetro de dispersión de energía. Los metales disminuyen la proporción de esporas germinadas de *A. capillus-veneris*, el desarrollo y el largo y ancho de los gametofitos. El número y longitud de los rizoides presentan poca variación al incrementar la concentración de metales, con respecto al control. Las pruebas histoquímicas y de microscopía electrónica, indican que los metales se acumulan principalmente en el clorénquima de la costa del gametofito y en los rizoides. La

sobrevivencia de los gametofitos en tales condiciones y la acumulación de metales en sus tejidos, muestran su capacidad de aclimatación y que está generando respuestas para evitar daños severos.

Palabras clave: metales pesados, helecho, gametofito, germinación, morfometría.

ABSTRACT

Some heavy metals are micronutrients for plants, but in concentrations that exceed such necessities turn out to be toxic. Ferns are metalophytes able to tolerate these conditions through evasion mechanisms, exclusion and/or metal accumulation. This study determines the toxicity of lead (Pb), copper (Cu) and Zinc (Zn) in the gametophytes of *Adiantum capillus-veneris* L., from the spore germination, development and in morphometric parameters (at a young stage). Spores were collected from individuals found on the banks of a jale at Zimapan, Hidalgo, they were sowed and they were kept in a Thompson cultivation medium, under treatments of Pb (45-257 μM), Cu (13-77 μM) and Zn (81-463 μM); the ranges are based upon the concentration of the present metals in the sampled jale, obtained in a previous study with higher and lower values than these ones.

Moreover, treatments of the combined metals with equivalent concentrations to the locality were included. The data was analyzed by means of the ANOVA statistical test. Also, Pb and Zn were tracked down, through histochemical tests in the tissues of the young gametophytes, and their presence, together with the Cu were borne out through a scanning electronic microscope of high field emission with a energy dispersive spectrometer. The metals diminish the proportion of the germinated spores of *A. capillus-veneris*, the development, length and width of the gametophytes. The number and length of the rhizoids that present few variation by increasing the concentration of metals regarding the control. The histochemical and the electronic microscopy tests, indicate that the metals were accumulated mainly in the chlorenchyma of the coast of the gametophyte and in the rhizoids. The survival of the

gametophytes in such conditions and the accumulation of metals in their tissues, show their ability of acclimation and their generation of responses in order to avoid severe dangers.

Key words: heavy metals, fern, gametophyte, germination, morphometry.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos y cuerpos de agua es uno de los principales problemas ambientales en México, siendo la minería una de la principales fuentes de residuos tóxicos, tales como metales pesados (Hernández-Acosta *et al.*, 2009). Hidalgo es uno de los estados de la República Mexicana que se dedica a la minería desde hace varios siglos, de manera que sus regiones mineras, como Zimapán, han acumulado residuos tóxicos desde su inicio en 1632 en donde la extracción de minerales se realizaba en hornos de la región (SGM, 2014). La presa de jales Santa María es una fuente de contaminación importante desde hace 50 años aproximadamente, debido explotación excesiva de plata (Ag), plomo (Pb) y zinc (Zn) en el último siglo (Moreno Tovar *et al.*, 2012).

A pesar de los contaminantes, en este caso metales pesados, existen especies vegetales que se desarrollan exitosamente en dichos sitios, las cuales cuentan con mecanismos fisiológicos que les permiten aminorar su efecto tóxico (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Algunas de estas especies, se utilizan en procesos de fitorremediación, ya que se aprovecha su capacidad de eliminación de metales en el suelo, para remediar áreas contaminadas (Punshon y Dickinson, 1997).

Los helechos son organismos vegetales que, recientemente, se les conoce por su condición metalófito y potencial fitorremediador (Navarrete *et al.*, 2006). La fase de gametofito es más lábil que la de esporofito y de ésta depende el establecimiento exitoso de una población (Nayar y Kaur, 1971), por lo que los metales pesados modifican las condiciones apropiadas del suelo para su desarrollo.

Sin embargo, una población de *Adiantum capillus-veneris* se desarrolla exitosamente (completan su ciclo de vida), a 50 metros de un jale en Zimapán, Hidalgo; dicha zona presenta altas concentraciones de Pb, Cu y Zn (entre otros metales) (Moreno Tovar *et al.*, 2012). Por esta razón, resulta importante, conocer los mecanismos que involucra la tolerancia a estos metales; incluso su capacidad de acumulación y a qué concentraciones la especie es afectada. Conocer los efectos de Pb, Cu y Zn en gametofitos de *A. capillus-veneris*, es parte del objetivo del presente estudio, el cual contribuye al conocimiento de las especies metalófitas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Minería en México

La minería es una actividad económica primaria en México, la cual inició en la época prehispánica y se expandió durante la época Colonial en varias regiones del país, permitiendo así el desarrollo económico, modernización y avance industrial, principalmente en la construcción, metalurgia, siderurgia, química y electrónica. En México, se realiza, principalmente, en los estados del norte con clima predominantemente árido y, en menor proporción, en el centro del país (Hernández-Acosta *et al.*, 2009).

El estado de Hidalgo ocupa el 17° lugar a nivel nacional en producción de minerales; éste se localiza en la porción central del país, en las inmediaciones del Eje Volcánico Transmexicano (SGM-CGMINERÍA, 2013). Destaca como principal productor de manganeso (Mn), ocupa el tercer lugar en la producción de cadmio (Cd) y, en menor proporción, de oro (Au), Ag, Pb y Zn; aunque, estos últimos han incrementado su extracción desde 2010 (SGM-CGMINERÍA, 2011).

Zimapán, uno de los cuatro distritos mineros de Hidalgo, se encuentra entre los paralelos 20°34' y 20° 58' de latitud norte y entre los meridianos 99°11' y 99° 33' de longitud oeste, y a altitud entre 900 y 2900 m.s.n.m. (Figura 1). Su régimen climático es semiárido con periodos restringidos de lluvia en verano, presentando un rango de temperatura de 12-20°C y 400-1100 mm de precipitación anual; la vegetación predominante en la región está compuesta en su mayoría por matorral xerófilo (INEGI, 2009). Presenta un tipo de suelo calcisol, de cuyos yacimientos se extrae Au,

Ag, Pb, Zn y Cu. En 1632 inició la extracción de minerales, principalmente de Pb, en la mina Lomo de Toro (SGM-CGMINERÍA, 2011). Actualmente el distrito esta en operación, aunque con baja producción, y cuenta con varias presas de jales (antiguos y recientes).

La presa El Monte, es la de mayor volumen (9.58 hectáreas) y se ubica a 9.5 km al norte del poblado Zimapán; asimismo, los jales San Miguel y Santa María son de los más antiguos (50 años aproximadamente), ubicados a la periferia noreste de la localidad (Moreno Tovar *et al.*, 2012).

2.2. Contaminación por residuos mineros

La industria minera genera serios problemas de contaminación por sulfatos, residuos ácidos y metales pesados (Velasco *et al.*, 2004), generando el 65% de los residuos industriales producidos en México (Mejía *et al.*, 1999), los cuales, usualmente, son depositados a cielo abierto (**jales**) y pasan por procesos de intemperismo (Hernández-Acosta *et al.*, 2009). Dichos depósitos, son las principales fuentes de partículas contaminantes metálicas, las cuales se pueden encontrar en el aire, suelo (minas y alrededores) e incluso en cuerpos de agua, debido al lavado de jales o suelos contaminados (Mejía *et al.*, 1999).

De las miles de zonas contaminadas en el país, la mayoría carece de información que indiquen su riesgo potencial; sin embargo, en algunas entidades de la República, han sido identificados sitios con algún tipo de residuo de la industria minera (Velasco *et al.*, 2004). En el estado de Hidalgo se registraron, durante el año 2008, 19 sitios

con escorias de fundición (SEMARNAT, 2008). De hecho, en Zimapán, los jales ha incrementando la contaminación de la zona, pues con frecuencia se presentan vientos fuertes que dispersan las partículas contaminantes en distintas direcciones (Duarte Zaragoza, 2013).

2.3. Los metales pesados

Son aquellos elementos que tienen una densidad mayor de 5 g/cm^3 en su forma elemental, éstos agrupan a 38 elementos (Navarro Aviñó *et al.*, 2007), de los cuales, el arsénico (As), berilio (Be), cromo (Cr), mercurio (Hg), selenio (Se), titanio (Ti), vanadio (V), níquel (Ni), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn), se encuentran regulados en México debido a su abundancia (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). En la NOM-147 SEMARNAT/SSA1-2004, se establecen los límites máximos permisibles de metales pesados para suelos de uso agrícola-residencial e industrial (SEMARNAT, 2007) (Cuadro 1).

Uno de los metales pesados más comunes en sitios contaminados del país es el Pb (Navarro Aviñó *et al.*, 2007). Este elemento es altamente tóxico sin funciones biológicas conocidas (Navarro Aviñó *et al.*, 2007) y se presenta de manera natural en pequeñas cantidades en la corteza terrestre (0.002%) (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Se obtiene, principalmente, de la galena (PbS), la anglesita (PbSO₄) y la curocita (PbCO₃); su uso más amplio es para la fabricación de acumuladores, pinturas, cerámicas, elementos de construcción, pigmentos y municiones, entre otros (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Dicho metal tiene valencias 2⁺ y 4⁺, de las cuales la primera

es la forma más común y reactiva; cuando forma complejos con compuestos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos) o inorgánicos como cloro (Cl⁻), carbonatos (CO₃²⁻), sulfatos (SO₄²⁻) y fosfatos (PO₄³⁻), éstos son poco solubles (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Concentraciones de referencia totales (CR_T) por tipo de uso de suelo (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004).

Contaminante	Uso agrícola/residencial/comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5400	67000
Berilio	150	1900
Cadmio	37	450
Cromo Hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1600	20000
Plata	390	5100
Plomo	400	800
Selenio	390	5100
Talio	5.2	67
Vanadio	78	1000

Existen metales como el Cu y Zn que, siendo recursos necesarios para los seres vivos, son inhibidores en exceso esto, debido al incremento de sus concentraciones en el suelo, alterando así los ecosistemas (Navarro Aviñó *et al.*, 2007).

El Cu es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra en minerales que contienen sulfuros, arsénidos, cloruros y carbonatos. Las formas más comunes de este metal pesado son el ion cobre (Cu²⁺), y los complejos hidróxido de cobre (CuOH⁺) e hidróxido cúprico (Cu(OH)₂); además, puede asociarse con ácidos

húmicos y formar complejos solubles (Evanko y Dzombak, 1997). Este metal es utilizado para elaborar productos de plomería y electricidad; en insecticidas y en la industria, se encuentra en pigmentos y catalizadores. Al ser liberado al ambiente, el Cu interacciona con la materia orgánica y sedimentos y, a través de ellos, puede contaminar el agua (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Por su parte, el Zn no se produce naturalmente en su forma elemental; se extrae, principalmente, a partir de la esfalerita [(ZnFe)S], comúnmente asociada a la galena (PbS) para formar óxido de zinc (ZnO). Se usa en la industria, principalmente, como un revestimiento resistente a la corrosión en hierro y acero. Generalmente, se presenta en el estado de oxidación +2 y forma complejos con diferentes aniones, aminoácidos y ácidos orgánicos. (Evanko y Dzombak, 1997; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). En condiciones de pH neutro o ácido, el Zn se comporta como uno de los metales pesados más móviles y, a un pH alcalino puede formar carbonatos (ZnCO₃) e hidróxidos (Zn(OH)₂).

2.4. Vegetación asociada a jales

La actividad minera en el país es motivo de alteraciones ambientales, debido a la contaminación; pese a esto, algunas especies que logran establecerse en sitios contaminados. Sin embargo, son escasos los estudios sobre especies vegetales que puedan crecer en suelos contaminados por residuos de minas; además, es poca la información acerca de la concentración que pueden acumular dichas especies y los mecanismos involucrados (Gómez-Bernal *et al.*, 2010).

En el estudio realizado por Díaz-Garduño *et al.* (2005), se mencionan 44 especies vegetales asociadas a suelos contaminados, en cuatro jales de Zacatecas, y 29 especies en Temascaltepec, Edo. de México. En el estado de Hidalgo, Hernández-Acosta *et al.* (2009), citan 25 especies vegetales creciendo en un jale de una mina de Pachuca, de las cuales las especies que acumularon mayor cantidad de metales fueron: *Solanum corymbosum* Jacq. (Solanaceae) con 6.63 mg/kg de Cd, *Brickellia veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae) con 5.15 mg/kg de Cu, *Atriplex suberecta* Verd. (Chenopodiaceae) con 1.82 mg/kg de Mn, y *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Poaceae) con 16.03 mg/kg de Ni.

En Zimapán, los jales permanecieron sin vegetación en un principio, sin embargo, algunas plantas lograron establecerse y sobrevivir en dichos sitios a pesar de la contaminación de los suelos principalmente por Pb, que se encuentran en concentraciones que van de 320 a 3000 mg/kg, rebasando por mucho su límite permisible según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (de 400 a 800 mg/kg dependiendo del uso de suelo), junto con otros metales pesados como Ni, Cd y As (Ortega-Larrocea *et al.*, 2010).

En un estudio realizado por Prieto-García *et al.* (2005) en Zimapán, se determinó que diversas especies vegetales de uso alimenticio y medicinal, acumulan As en sus tejidos debido a los altos niveles de As presentes en el agua y suelo de la región. Las especies con mayor acumulación del metal se detallan en el cuadro 2. Armienta *et al.* (2008) citan a *Prosopis leavigata* L. y *Acacia farnesiana* (L.) Willd. (Leguminosae) en suelos ricos en As de la zona.

Cuadro 2. Concentración de As (mg/kg) acumulada en los órganos de plantas de uso alimenticio y medicinal de Zimapán, Hgo. (Prieto-García et al., 2005)					
Especie	Hoja	Tallo	Raíz	Fruto	Flor
Chenopodiaceae					
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Epazote)	12.39	7.93	10.16	--	--
Apiaceae					
<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss (Perejil)	10.73	4.42	--	--	--
Cucurbitaceae					
<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Swartz (Chayote)	10.77	5.05	--	7.90	--
<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché, (Chilacayote)	8.36	<0.018	--	10.74	--
Solanaceae					
<i>Capsicum annum</i> L. (Chile)	8.02	4.49	--	6.26	--
Myrtaceae					
<i>Psidium guajava</i> L. (Guayabo)	8.42	--	--	--	--
Rutaceae					
<i>Citrus sinenses</i> (L.) Osbeck (Naranja)	0.003	--	--	8.44	--
Lauraceae					
<i>Persea americana</i> Mill. (aguacate)	8.18	--	--	5.73	5.73
Asteraceae					
<i>Artemisa abrotanum</i> L. (Toronjil)	20,13	7.87	--	--	--

2.5. *Adiantum capillus-veneris* L.

La mayoría de las especies del género *Adiantum*, se encuentran en la región tropical y en el resto de las regiones templadas de América. En México, se encuentran 35 de las 200 especies conocidas para este género a nivel mundial. *A. capillus-veneris* L. es un helecho de hábito terrestre; sin embargo, también se puede encontrar sobre rocas (rupícola); se distribuye ampliamente en el país en diferentes tipos de vegetación, incluyendo al matorral xerófilo (Mickel y Smith, 2004).

Los gametofitos de *Adiantum capillus-veneris*, al igual que el resto de los helechos, son autotróficos, se desarrollan de una forma, patrón, estructura y reproducción definidos. Durante el desarrollo del gametofito de *A. capillus-veneris* se pueden diferenciar cuatro etapas (Nayar y Kahur, 1971), las cuales son: crecimiento

unidimensional (E1, filamentoso), crecimiento bidimensional (E2, espatulado; gametofito joven (E3, cordiforme) y gametofito maduro (E4, con estructuras reproductoras, anteridios y/o arquegonios).

En Zimapán, la población de *A. capillus-veneris* se encontró muy cerca del jale Santa María, aproximadamente a 50 m, en contacto directo con los contaminantes del suelo (Fig. 1). Para la determinación taxonómica a nivel de género y especie se utilizaron las claves de Mickel y Smith (2004), y para la asignación de familia el trabajo de Smith *et al.* (2006).



Figura 1. Esporofito de *Adiantum capillus-veneris* L., establecido a orillas del jale Santa María, en Zimapán, Hidalgo.

2.6. Estudios sobre metales en helechos

En México, los helechos y licofitas tienen 1008 especies que se encuentran distribuidas en un amplio rango de hábitats, lo que indica su alta riqueza y diversidad (Mickel y Smith, 2004), se establecen principalmente, en las regiones templadas y cálido húmedas. El uso de los helechos y licofitas, se ha clasificado en varias categorías: alimenticias, forrajeras, servicios ambientales (incluyendo ornamentales), malezas, materiales, medicinales, cosméticas, tóxicas y culturales (Navarrete *et al.*, 2006). Dentro de la categoría de servicios ambientales, se consideran, a los helechos como metalófitos, pues se tiene evidencia de géneros acumuladores de As y Se, tales como *Pteris* y *Pityrogramma* (Pteridaceae), que son de los más eficientes para absorber As (Navarrete *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Zhao *et al.* (2002), se mencionan a *Pteris vittata* L., *P. cretica* L., *P. longifolia* L. y *P. umbrosa* R. Br., como helechos hiperacumuladores de As, asimismo, realizaron experimentos con dicho metal en *Asplenium nidus* L., *Davallia canarensis* (L.) J. E. Sm., *Polypodium aureum* L. y *Polystichum tsus-simense* (Hook.) J. Sm., que aunque no mostraron ser hiperacumuladores, en sus tejidos se hallaron concentraciones entre 60 y 168 mg/kg de As. Otros helechos considerados hiperacumuladores de metales pesados son: *Azolla filiculoides* Lam. (Cu, Ni, Mn, y Pb), *Salvinia molesta* D. S. Mitch (Cr, Ni, Pb y Zn) y *Athyrium yokoscense* (Fr. & Sav.) C. Chr. (Cd, Cu, Pb y Zn) (McIntyre, 2003).

En el trabajo realizado por Vidal-Álvarez (2009), se determinó que *Salvinia minima* Baker, es capaz de absorber altas concentraciones de Pb a corto plazo y que puede

tolerar hasta 27.58 g/L de Pb sin presentar daños en sus hojas, por lo que se le atribuyen mecanismos de tolerancia. También se ha citado que, en cultivo hidropónico en condiciones de invernadero, *Thelypteris kunthii* (Desv.) C. V. Morton y *Equisetum hyemale* L. subsp. *affine* (Engelm.) Calder et Roy L. Taylor, asimilan y acumulan Mn (Gómez-López *et al.*, 2011). Srivastava *et al.* (2010) realizaron un experimento donde expusieron a 18 especies de helechos a una concentración de 300 µM de arseniato de sodio (Na₃AsO₄) en un medio hidropónico durante tres días; mostrando que dichos helechos absorbieron diferentes concentraciones (µg/g de peso seco) de As en sus hoja (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies y concentración de As que pueden almacenar en sus tejidos de acuerdo a Srivastava *et al.*, 2010.

Especies	As (µg/g peso seco)
<i>Pteris vittata</i> L.	404
<i>Cheilanthes sinuata</i> (= <i>Astrolepis sinuata</i> (Lag. ex Sw.) D. M. Benham & Windham)	341
<i>Adiantum raddianum</i> C. Presl	326
<i>Polystichum acrostichoides</i> (Michx.) Schott	271
<i>Actiniopteris radiata</i> (Sw.) Link	244
<i>Pellaea rotundifolia</i> (G. Forst.) Hook	254
<i>Nephrolepis cordifolia</i> (L.) C. Presl	228
<i>Dennstaedtia punctilubula</i> (Michx.) T. Moore	220
<i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth	144
<i>Didymochlaena truncatula</i> (Sw.) J. Sm.	120
<i>Hemionitis arifolia</i> (Burm. f.) T. Moore	<100
<i>Microlepia strigosa</i> (Thunb. ex Murray) K. Presl	<100
<i>Davallia griffithiana</i> Hook	<100
<i>Onoclea sensibilis</i> L.	<100
<i>Osmunda regalis</i> L. var. <i>spectabilis</i> (Willd.) A. Gray	<100
<i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forster) Ching	60
<i>Microsorium</i> sp.	90
<i>Blechnum spicant</i> (L.) Sm.	29

La mayoría de los estudios sobre tolerancia a metales pesados en helechos, se realizan en torno al As y pocos en relación a Pb en helechos, y menos sobre Cu y Zn. Así mismo, se enfocan más en la fase de esporofito y pocos en la fase de gametofito. Al respecto, Kamachi *et al.* (2005) determinaron la resistencia a Pb en gametofitos de *Athyrium yokoscense* (Fr. et Sav.) Christ, el cual es conocido por su tolerancia a altas concentraciones de Pb, Cu, Zn y Cd. Como resultado obtuvieron que los gametofitos de *A. yokoscense* son capaces de acumular más de 10,000 µg/g de Pb en el citosol y vacuolas de las células rizoidales; además de presentar una gran cantidad de proantocianidinas, las cuales forman complejos con iones de Pb (Kamachi *et al.*, 2005).

2.7. Efectos tóxicos de los metales en vegetales

Algunos metales pesados como el Hierro (Fe), molibdeno (Mo), níquel (Ni), cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn), son esenciales para las plantas, pues son micronutrientes involucrados en el crecimiento, generación de energía y senescencia de las mismas (Shah *et al.*, 2010), entre otras funciones (Cuadro 4). La presencia excesiva de metales pesados en el entorno puede activar mecanismos de defensa, que dependen de factores genéticos y fisiológicos de cada especie (Prieto Méndez *et al.*, 2009).

Elemento	Función bioquímica
Cu	Asociado a enzimas involucradas en reacciones redox. Componente de las oxidasas como: ácido ascórbico oxidasa, tyrosinasa, monoamina oxidasa, citocromo oxidasa y plastocianina, entre otras.
Fe	Constituyente de proteínas involucradas en la fotosíntesis, fijación de N ₂ y respiración.
Mn	Requerida en la actividad de algunas deshidrogenasas, descarboxilasa, oxidasas, y peroxidasas.
Mo	Constituyente de la nitrogenasa, nitrato reductasa y xantin deshidrogenasa.
Ni	Constituyente de la ureasa. En bacterias en el proceso de fijación de N ₂ .
Zn	Constituyente de la alcohol deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa, etc.

Los metales pesados tienen gran capacidad de unirse a moléculas orgánicas (grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo) y causar daños a nivel celular, por inhibición de la actividad de proteínas y alteraciones estructurales; por desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar y por la catálisis de las moléculas especies reactivas de oxígeno (ERO), o radicales libres que provocan estrés oxidativo (Navarro Aviñó *et al.*, 2007). Sin embargo, la toxicidad de los metales no sólo depende de su concentración en el suelo, sino también de su movilidad y biodisponibilidad, influidas por las propiedades del suelo (pH, capacidad de intercambio catiónico, textura, materia orgánica, etc.) (Sahuquillo *et al.*, 2003), condiciones medioambientales y biológicas (Guala *et al.*, 2010).

En el caso del Pb, se sabe que, en plantas disminuye la fotosíntesis, la actividad enzimática y el transporte mitocondrial de electrones (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). En *Allium cepa* L. (cebolla) reduce el crecimiento radicular y la frecuencia mitótica, así como el incremento de células aberrantes, y la intensidad del efecto está en función de la concentración del Pb (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Además, tanto en plantas como en animales (Moreno-Sánchez y Devars, 1999), interfiere en la síntesis

del grupo hemo (compuestos involucrados en reacciones de oxidorreducción, oxigenación, hidroxilación, y en el transporte y almacenamiento de oxígeno) inhibiendo, por ejemplo, la actividad de la ferroquelatasa y magnesio quelatasa, así como induce la formación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Castro y Moreno, 2004).

Por su parte, el Cu en grandes cantidades afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas, e inhibe la fotosíntesis, entre otros procesos fisiológicos (Shah *et al.*, 2010). Por otro lado, el Zn bloquea la absorción de Cu e interviene en los procesos de fotosíntesis, de crecimiento y desarrollo (Shah *et al.*, 2010).

2.8. Plantas tolerantes a metales pesados

La respuesta de los individuos y poblaciones vegetales ante el incremento de factores ecológicos como la concentración de metales, es regulada por una serie de umbrales críticos (González, 1997).

Las plantas pueden establecerse en un suelo donde la disponibilidad metálica esté entre el límite mínimo de subsistencia y el nivel máximo de letalidad, por lo que entre estos se encuentra el rango general de sobrevivencia; sin embargo, la mayor adaptación de las plantas ocurre cuando la concentración de metales se ubica entre el nivel crítico de deficiencia y el de toxicidad, es decir, en el rango de tolerancia u óptimo ecológico (González, 1997) (Fig. 2).

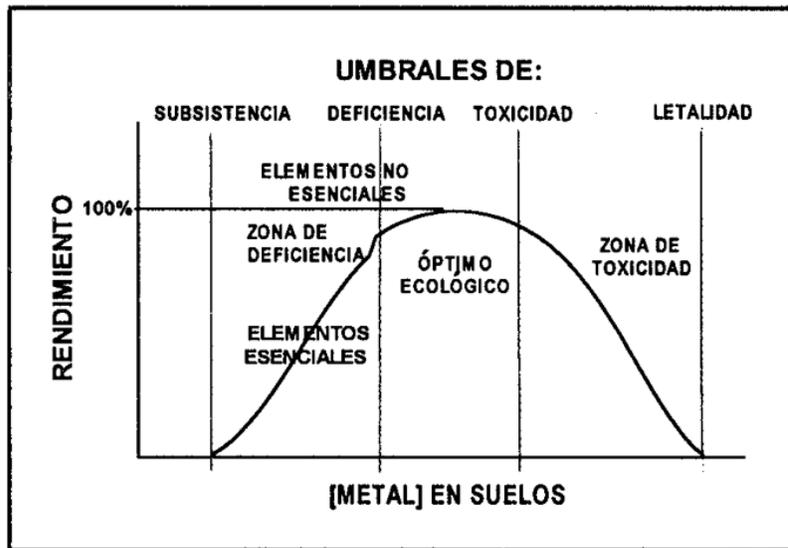


Figura 2. Curva de respuesta de las plantas ante la presencia de metales en el suelo (González, 1997).

Las plantas vasculares son consideradas como las más tolerantes a metales pesados; su sensibilidad y respuesta varía en cada familia, dependiendo de su capacidad de retención del metal en cuestión, del suelo y de la interacción planta-metal, así como del propio metabolismo vegetal (Prieto Méndez *et al.*, 2009). Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno: mediante una eficiente exclusión del metal (resistentes), restringiendo su transporte a la parte aérea (Becerril *et al.*, 2007); y otras acumulan el metal en una forma no tóxica para la planta (tolerantes e hiperacumuladoras) (Prieto Méndez *et al.*, 2009).

Algunas plantas son capaces de acumular cantidades excesivas de metales pesados y se les conoce con el término "hiperacumuladoras", refiriéndose a las plantas que pueden acumular 100 o más veces los valores normales de metales acumulados en

sus tejidos. Estas plantas son especies muy tolerantes a uno o más metales pesados y, a menudo, su distribución está restringida a suelos ricos en metales con un amplio rango de concentraciones, pues no son competitivas en zonas no contaminadas. (Prieto Méndez *et al*, 2009). Sin embargo, existen especies que se distribuyen ampliamente en la naturaleza, pero que algunas de sus poblaciones logran sobrevivir ante la presencia de metales pesados: las “pseudometalofitas” (Becerril *et al.*, 2007). Su éxito se debe a la capacidad de respuesta de las poblaciones, ante la presión de selección que ejercen las zonas contaminadas con metales y a su capacidad de vivir ante otros factores adversos (edáficos y/o climáticos) (Becerril *et al.*, 2007).

Esta capacidad que tienen las plantas para responder al estrés causado por el incremento de metales pesados en el suelo, permite el desarrollo de tecnologías de remediación basadas en los mecanismos de resistencia y tolerancia de las metalofitas (Punshon y Dickinson, 1997). En algunos casos, la remediación con plantas, involucra la participación de la comunidad microbiana asociada a su sistema radical (Núñez *et al.*, 2004).

La efectividad del método depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, de la solubilidad de los metales, de los procesos de inmovilización y de la medida en que éstos puedan migrar en el suelo (Velasco *et al.*, 2004). Por otra parte, el costo y el tiempo de la remediación de un sitio, son factores a considerar para elegir un método de tratamiento para un contaminante y un sitio en particular (Velasco *et al.*, 2004).

Los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la remediación de suelos contaminados con metales y otros contaminantes son: fitodegradación, fitoestimulación, fitoestabilización, rizofiltración, fitoacumulación, y fitovolatilización. (Fig. 3 y Cuadro 5).

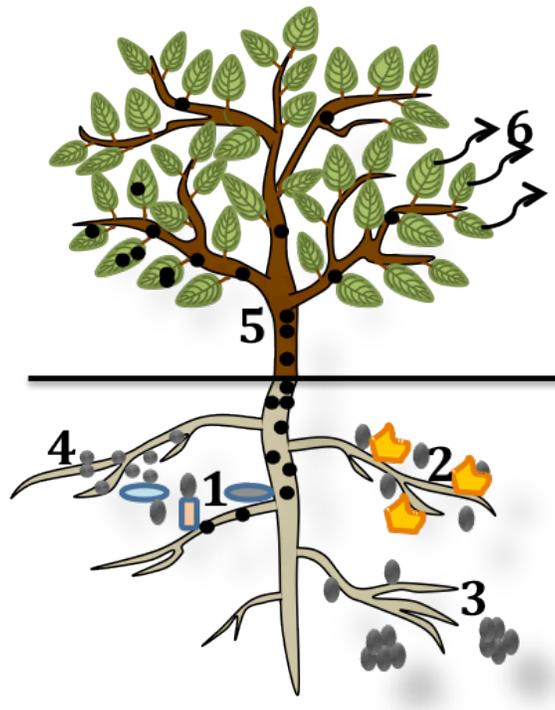


Figura 3. Mecanismos de fitorremediación en plantas: 1) fitodegradación, 2) fitoestimulación, 3) fitoestabilización, 4) rizofiltración, 5) fitoacumulación y 6) fitovolatilización. Modificado de Núñez *et al.*, 2004).

Cuadro 5. Mecanismos de fitorremediación en plantas (Núñez *et al.*, 2004)

Mecanismo	Contaminante involucrado	Descripción del proceso
1. Fitodegradación	ORGÁNICOS: hidrocarburos aromáticos polinucleares, hidrocarburos totales del petróleo, plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), compuestos clorados, explosivos y surfactantes (detergentes)	Reacciones enzimáticas que llevan a cabo plantas y microorganismos en la rizósfera, para ser asimilados por las plantas y almacenados en sus vacuolas o fijados a estructuras celulares insolubles como la lignina.
2. Fitoestimulación.	ORGÁNICOS: hidrocarburos aromáticos polinucleares, hidrocarburos totales del petróleo, plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), compuestos clorados, explosivos y surfactantes (detergentes)	Producción de exudados de las raíces de las plantas (azúcares, aminoácidos, compuestos alifáticos y aromáticos, nutrientes, enzimas y oxígeno); estimulan el crecimiento de microorganismos que degradan el contaminante (hongos y bacterias).
3. Fitoestabilización	Orgánicos e inorgánicos: metales y otros contaminantes.	Los metales se fijan fuertemente en las raíces de las plantas o en la materia orgánica de los suelos, limitando así su biodisponibilidad y su migración vertical hacia los mantos freáticos.
4. Rizofiltración	Metales pesados	Las raíces absorben, concentran y precipitan los contaminantes de aguas residuales en un medio hidropónico.
5. Fitoacumulación	Metales pesados, contaminantes orgánicos, elementos e isótopos radiactivos.	Se explota la capacidad de algunas plantas para acumular contaminantes en sus raíces, tallos u hojas, las cuales pueden ser fácilmente cosechadas.
6. Fitovolatilización	Orgánicos, Hg y Se	Los contaminantes son absorbidos, metabolizados, transportados desde su raíz a sus partes superiores y liberados a la atmósfera en formas volátiles, menos tóxicas o, relativamente, menos peligrosas en comparación con sus formas oxidadas.

3. JUSTIFICACIÓN

El municipio de Zimapán, es uno de los más contaminados por los residuos de esta industria en el estado de Hidalgo. La presa de jales Santa María, ha sido parcialmente abandonada y es una de las más antiguas en la región. Estos depósitos contienen gran cantidad de metales pesados que quedan expuestos y se dispersan por el viento o a través del lavado de los jales, hacia las zonas agrícolas y de vegetación primaria. El Pb es uno de los contaminantes más comunes en dicha zona que, junto con el Cu y Zn, se presenta en concentraciones tóxicas para los seres vivos.

Las especies vegetales, como los helechos, se han establecido cerca de los jales. Una población de *Adiantum capillus-veneris*, fue encontrada a 50 m aproximadamente del jale Santa María. A pesar ser una población pequeña, los individuos son vigorosos y en etapa de esporofito adulto, indicando su capacidad de reproducción aún con la presencia de metales. Por tal motivo, es importante determinar el efecto que tiene los metales (Pb, Cu y Zn) en la germinación de esporas, desarrollo y reproducción de este helecho, en fase de gametofito, la fase más frágil y de la cual depende el establecimiento de poblaciones vegetales en zonas contaminadas. Son pocos los estudios sobre helechos tolerantes a metales en esta fase y en Zimapán, sólo se conocen algunas angiospermas metalofitas. El estudio de la tolerancia al Pb, Cu y Zn en los gametofitos de *Adiantum capillus-veneris*, representa una contribución importante al conocimiento de la biología y ecología de los helechos con potencial metalófito.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influyen las concentraciones de Pb, Cu y Zn, tanto en la germinación de esporas, como en la sobrevivencia, el desarrollo y morfometría de los gametofitos de *A. capillus-veneris*?

¿Los gametofitos de *A. capillus-veneris* son capaces de almacenar Pb, Cu y Zn, en sus tejidos?

¿Cuál es la concentración de Pb, Cu y Zn con menores efectos tóxicos en los gametofitos de *A. capillus-veneris*?

5. HIPÓTESIS

Adiantum capillus-veneris es una especie que habita en suelos contaminados, por lo que se espera que en altas concentraciones de Pb, Cu y Zn, mayores a las del jale Santa María, se vea afectada la germinación de esporas, la sobrevivencia, el grado de desarrollo y caracteres morfométricos de los gametofitos.

Al tolerar las concentraciones de metales, los elementos son inmovilizados en los tejidos de la planta, por lo que se espera ubicar restos de Pb, Cu y Zn, en las estructuras del gametofito de *A. capillus-veneris*.

Es posible determinar las concentraciones máximas de Pb, Cu y Zn, que toleran los gametofitos de *A. capillus-veneris*, con base en caracteres morfológicos y fisiológicos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto tóxico del Pb, Cu y Zn, en los gametofitos de *A. capillus-veneris*, en condiciones de laboratorio, con el fin de establecer el nivel máximo de tolerancia del gametofito.

6.2. Objetivos particulares

- Determinar, bajo tratamientos con Pb (45 – 257 μM), Cu (13 - 77 μM) y Zn (81 - 463 μM), la proporción de germinación de esporas, sobrevivencia, grado de desarrollo y morfometría de los gametofitos.
- Ubicar tejidos donde se acumulan el Pb, Cu y Zn en los gametofitos mediante pruebas histoquímicas.
- Determinar la concentración máxima de Pb, Cu y Zn, en la cual los gametofitos presenta menores efectos tóxicos, en relación a lo obtenido en los objetivos anteriores.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Trabajo de campo

7.1.1. Área de recolección

El muestreo se realizó a 50 m del jale Santa María, en Zimapán Hidalgo, ubicado en las coordenadas $20^{\circ}44'06.8''N$ $99^{\circ}24'00.4''W$ (Fig. 4). En esta zona se determinó que la concentración de Pb en el suelo es de 1994 mg/Kg de suelo y rebasa el límite máximo permisible según la NOM-147 en México (400-800 mg/Kg). Además de que las concentraciones de Cu y Zn también son mayores que lo esperado para la zona, incluso solo considerando las concentraciones extractables o biodisponibles para las plantas (9.2 mg Cu y 44.2 mg Zn por Kg de suelo).

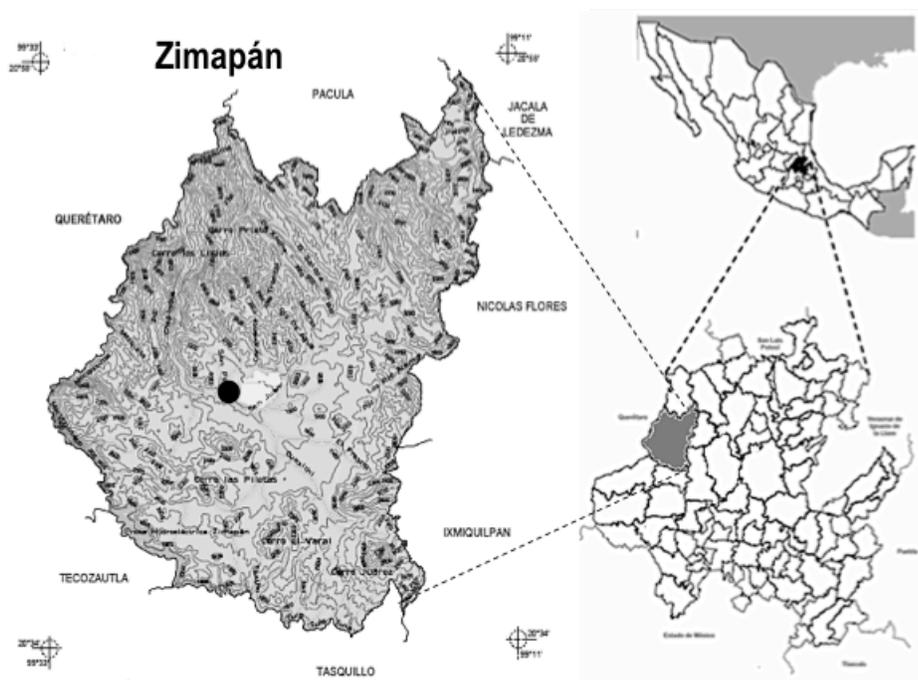


Figura 4. Ubicación de la zona de estudio (círculo) en el municipio de Zimapán, Hidalgo, México. Adaptado de INEGI, 2005 e INEGI, 2009.

Se trazaron dos líneas de 50 x 2 m cada una, paralelas entre sí a una distancia de 10 m (Gentry, 1982) y se colectaron 10 individuos de *A. capillus-veneris*, de acuerdo con el manual de Lorea y Riba (1990).

Las hojas de los esporofitos con esporangios maduros y cerrados, se guardaron en sobres de papel, dejándolos secar a temperatura ambiente para que los esporangios se abrieran por desecación natural. El ejemplar completo y en buenas condiciones para ser utilizado como respaldo, se herborizó y se depositó en el Herbario Metropolitano (UAMIZ), de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

7.2. Trabajo de laboratorio

7.2.1. Siembra de esporas

Fase I. Efecto del Pb, Cu y Zn a diferentes concentraciones, de manera independiente, en los gametofitos de *A. capillus-veneris*.

1. El material fértil recolectado se tamizó en una malla de 0.74 mm para separar las esporas de los residuos de los esporangios y segmentos foliares.
2. Se preparó medio de cultivo de agar solidificado al 1%, adicionado con micro y macro elementos (Cuadro 6) –medio de Thompson- (Klekowski, 1969 a y b), el cual posee como micronutriente una concentración de 1 μM de Cu y Zn.
3. Se elaboraron cinco tratamientos, por separado, de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (45 - 257 μM), CuCl_2 (13 - 77 μM) y ZnCl_2 (81 - 463 μM). Estos intervalos se determinaron con base en la concentración de Pb, Cu y Zn extractable encontrada en el

suelo del sitio de colecta de las esporas, obtenidos previamente por nosotros (Cuadro 7), y en lo establecido por Hernández (2009).

4. Se agregó 0.1g de Mycostatin (antimicótico) por 1L de medio de cultivo, para evitar la proliferación de hongos.
5. Las esporas se colocaron, en condiciones estériles, en cajas de Petri de vidrio (60 mm diámetro) con los medios de cultivo, y se colocaron en una cámara de fotoperiodo a 16 h x 8 h luz-obscuridad (lámpara fluorescente de luz blanca de 60 w) y a 21-25° C de temperatura.
6. Los cultivos se regaron una vez por semana con agua desionizada previamente esterilizada, para evitar la desecación y la interferencia de iones no deseados.
7. La densidad de esporas sembradas se estimó por conteo *in situ* (cm²).
8. El experimento se realizó en tres ocasiones de manera independiente, cada uno por duplicado, tanto para los metales como para el control.

Cuadro 6. Soluciones madre y sustancias para la preparación del medio de cultivo de Thompson.

	SOLUCIÓN MADRE	SUBSTANCIAS PARA MEDIO DE CULTIVO
	Peso (g)/100 ml de agua destilada	Volumen (ml)
MACROELEMENTOS		
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	2.5	5
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	2.0	25
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ 7H ₂ O)	1.0	12
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	1.0	2
	Peso (g)/1000 ml de agua destilada	Volumen (ml)
MICROELEMENTOS		
Sulfato de magnesio (MnSO ₄)	0.0220	10
Sulfato cúprico (CuSO ₄ 5H ₂ O)	0.0240	10 ≈ 1 μM
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	0.0290	10 ≈ 1 μM
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0.1860	10
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O)	0.0035	10
Sulfato ferroso (FeSO ₄ 7H ₂ O)	2.5000	10
Sodio EDTA	3.7000	10
Agar	---	10 g
Agua destilada (aforar a)	---	1000

Tomado de Klekowski (1969 a y b).

Cuadro 7. Propiedades físicas y químicas del suelo asociado a los helechos que viven en el suelo a orillas del jale Santa María.

Parámetro	Cantidad
pH	7.18
Conductividad eléctrica	2.47 (mmohs/cm)
Capacidad de Intercambio Catiónico	9 (mmoles+Kg ⁻¹)
Materia Orgánica	1.74 %
Nitrógeno	0.09 %
Fósforo	55 (ppm)
Elementos extractables	
Potasio	0.43 (meq/100g)
Sodio	0.52 (meq/100g)
Calcio	43 (meq/100g)
Magnesio	5 (meq/100g)
Fierro	3.84 (mg/kg)
Cobre	9.2(mg/kg) ≈ 53 μM
Zinc	44.2 (mg/kg) ≈ 323 μM
Plomo	24(mg/kg) ≈ 91 μM
Elementos totales	
Plomo	1994 (mg/kg)
Textura	
Arena	78 %
Limo	12 %
Arcilla	10 %
SUELO FRANCO ARENOSO	

Fase II. Efecto conjunto de Pb, Cu y Zn en los gametofitos de *A. capillus-veneris*, en concentraciones equivalentes a las de campo.

1. Se preparó un medio de cultivo, como en el experimento anterior en cajas de Petri, pero con las concentraciones de metales del sitio de colecta de las esporas, para una concentración final de Pb 91 μM , Cu 54 μM y Zn 324 μM . Se formaron cuatro tratamientos control: [C], [Pb], [Zn] y [Cu]; así como los tratamientos de combinación de metales: [Pb-Zn-Cu], [Pb-Cu], [Pb-Zn] y [Cu-Zn].
2. Se repitieron los pasos 3 a 6 de la Fase I.
3. El experimento se realizó en dos ocasiones de manera independiente, cada uno por duplicado para todos los tratamientos.

7.2.2. Supervivencia y desarrollo de gametofitos

En ambas fases experimentales, se evaluó el tiempo de germinación de las esporas y la supervivencia de los gametofitos durante nueve semanas, registrando el número de individuos presentes cada etapa de desarrollo.

En la sexta semana después de la siembra, a los gametofitos de cada tratamiento, se les determinó el largo, el ancho, número y largo de rizoides, peso fresco, presencia de arquegonios y anteridios. Las medidas se realizaron a través de fotografías digitales en el programa Sigma Pro Scan 2005, las cuales se calibraron utilizando una reglilla graduada de 2 mm.

7.2.3. Ubicación de metales en tejidos del gametofito

a) Técnica histoquímica para Pb

Para la detección de Pb, se tomaron de 2 a 4 gametofitos expuestos a los tratamientos con el metal, en seguida se realizó el método de detección de Pb en tejidos vegetales propuesto por Tung y Temple (1996), ajustando el tiempo de exposición a los reactivos.

- a) Los gametofitos se lavaron con agua destilada varias veces para eliminar los restos de agar y el metal no absorbido.
- b) Se introdujeron en tubos de ensayo y se adicionaron 2 ml de rodizonato de sodio ($C_6Na_2O_6$) 3 mM durante 20 minutos.
- c) Las muestras se lavaron con agua destilada durante 2 minutos, en tres ocasiones.
- d) Posteriormente, se les adicionaron 2 ml de una solución 150 mM de tartato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), durante 10 minutos.
- e) Enseguida, los gametofitos se sumergieron en alcohol al 50% y, finalmente se almacenaron en alcohol al 70% durante 2-3 h.
- f) Los tejidos se colocaron en portaobjetos cubiertos con grenetina 1% y se montaron en agua destilada con cubreobjetos para ser observados mediante microscopía de campo claro.
- g) Se tomaron fotografías digitales de los tejidos, donde el color pardo-rojizo indica la presencia de Pb.

b) Técnica histoquímica para Zn

Se tomaron de 2 a 4 gametofitos, expuestos a las diferentes concentraciones de Zn, y se llevó a cabo la prueba de detección de zinc propuesta por Marczenko y Balcerzak (1998), ajustando el tiempo de exposición al reactivo:

1. Los gametofitos expuestos a diferentes concentraciones de Zn, se retiraron del medio de cultivo y se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de agar y el metal no absorbido.
2. Las muestras se trataron con una solución de ditizona 0.005% en etanol al 50%, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. La localización de Zn se realizó en microscopía de campo claro.
4. Se tomaron fotografías digitales de los tejidos observando una tinción rosa-anaranjado en áreas con Zn.

c) Ubicación de los metales mediante Microscopía Electrónica de Barrido con Espectrómetro de Dispersión de Energía (MEB-EDS)

Para corroborar la presencia de Pb y Zn, y detectar el Cu, en los tejidos de los gametofitos, se llevó a cabo una técnica basada en lo propuesto por Arrú *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Se realizó la ubicación de Pb, Cu y Zn, de acuerdo a lo siguiente:

1. Una muestra de gametofitos expuestos a las concentraciones más altas en el experimento de cada metal (Pb 257 μM , Cu 77 μM y Zn 463 μM), se retiraron

del medio de cultivo y se lavaron con agua destilada para eliminar residuos de agar y el metal no absorbido.

2. Los individuos se fijaron en glutaraldehído 50% durante 24h y, posteriormente, se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (17 mM).
3. Los gametofitos se deshidrataron con una serie gradual de alcoholes y se secaron a punto crítico.
4. Los gametofitos se montaron en una cinta de carbón colocada en placas de aluminio para detectar los metales utilizando un microscopio electrónico de barrido (**MEB**), de alta resolución de emisión de campo (marca Geol modelo 7600F), con espectrómetro de dispersión de energía (**EDS**) (marca Oxford modelo Inca X-Max), con un detector de berilio (Be) con ventana de 20 mm²; la observación se realizó a 15 Kv.

7.3. Datos y estadística

7.3.1. Efecto del Pb, Cu y Zn en los gametofitos

La proporción de sobrevivencia y las etapas de desarrollo de los gametofitos, obtenidas durante el experimento, fueron transformadas ($\arcsen \sqrt{Pi}$) para su análisis. Se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas y pruebas de Bonferroni de comparaciones múltiples, para determinar qué tratamientos con metales difieren significativamente del control. Para evaluar las diferencias en el peso fresco, número de rizoides, largo y ancho de los gametofitos entre tratamientos, se utilizaron análisis de varianza de una vía con los datos transformados a (\log_{10}). Se

utilizaron pruebas de Bonferroni de comparaciones múltiples para identificar los tratamientos que difieren significativamente del control. Cabe mencionar que en los casos donde no se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizaron análisis de varianza no paramétricos de Kruskal-Wallis y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

7.3.2. Índice de tolerancia

Se evaluó la tolerancia de los gametofitos al Pb, Cu y Zn mediante el índice de tolerancia a metales pesados (IT), el cual permite determinar la capacidad de una planta para crecer en sitios contaminados con metales (Yu-Lin *et al.*, 2007). En los gametofitos, el IT se calculó tomando en cuenta el ancho y largo de los gametofitos, largo y número de rizoides, así como el peso fresco, aplicando la siguiente fórmula:

$$IT = \left(\frac{\text{parámetro morfométrico del gametofito con exposición al metal}}{\text{parámetro morfométrico del gametofito sin exposición al metal}} \right) \times 100$$

8. RESULTADOS

8.1. Fase I

8.1.1. Germinación y sobrevivencia

En todos los tratamientos, incluso en el control, la germinación de esporas ocurrió asincrónicamente entre 7 y 14 días después de la siembra. En el control, la cantidad de esporas que germinaron equivale al 4.1% de las sembradas, presentando su valor máximo 14 días después de la siembra. En general, la cantidad de esporas germinadas en los tratamientos con Pb, Cu y Zn, fue del 0.8% al 4.2% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de germinación de esporas expuestas a distintos tratamientos con Pb, Cu y Zn.				
Tratamiento	Esporas sembradas	Esporas germinadas	% germinación	% disminución respecto al control
Control				
Pb 0µM, Cu 1µM, Cu 1 µM	1981	81	4.1	0
Plomo (µM)				
45	2255	83	3.7	9.8
91	2700	78	2.9	29.3
181	2746	22	0.8	80.5
226	2202	18	0.8	80.5
257	3746	41	1.1	73.1
Cobre (µM)				
13	1497	46	3.1	24.4
30	1719	28	1.6	61.0
54	1672	13	0.8	80.5
66	1817	25	1.4	65.9
77	1576	66	4.2	+2.4
Zinc (µM)				
81	6434	103	1.6	61.0
161	2815	28	1.0	75.6
324	2690	35	1.3	68.3
411	2768	36	1.3	68.3
463	2688	46	1.7	58.5

En los tratamientos con Pb, se observó que conforme incrementa la concentración del metal en el medio, el porcentaje de esporas que germinan es cada vez menor, 3.7% en 45 µM hasta 1%, aproximadamente, las 3 concentraciones más altas. A

partir de la concentración de Pb 91 μM y hasta 257 μM , la proporción de esporas germinadas tuvo su valor más alto 1 o 2 semanas después que el control, es decir, entre 21 y 27 días después de la siembra.

En el caso de las esporas expuestas a Cu, el efecto es distinto ya que, al incrementar la concentración de 13 μM a 54 μM la germinación disminuye de 3.1% a 0.8%. Sin embargo, a partir de 66 μM la germinación de esporas incrementa a 1.4% y en 77 μM germinan el 4.2% de las esporas sembradas (valor similar al control), aunque el valor máximo de germinación se obtiene 7 días después que el control.

En los tratamientos con Zn, se observó un porcentaje de germinación menor que en los otros metales, con valores entre 1% y 1.7%, y el valor máximo de germinación se obtuvo 7 días después que el control en 81 μM , 411 μM y 463 μM , 14 días en 161 μM , y hasta 21 días en 324 μM .

El mayor número de gametofitos sobrevivientes se observó, en su mayoría en la semana 5 (35 días después de la siembra). Con base en la cantidad de esporas sembradas, la proporción de gametofitos sobrevivientes expuestos a las concentraciones mayores de Pb (181 μM a 257 μM) durante las 9 semanas que duró el experimento, fue menor que en el control ($F=2.95$, $P=0,0016$, $gl=40$); sin embargo, los sobrevivientes en dichos tratamientos al final del experimento, representan del 70% de las esporas germinadas. En los tratamientos con Cu 54 μM y 66 μM , sobrevivencia también es menor que en el control ($F=3.16$, $P=0,0006$, $gl=40$), equivalente al 75% (en la semana 9) de las esporas que germinaron (Fig. 5 y Cuadro 9). En el caso del Zn, todos los tratamientos presentaron una baja sobrevivencia de

gametofitos respecto al control ($F=4.23$, $P<0,0001$, $gl=40$); sin embargo, en Zn 81 μM y 411 μM la sobrevivencia al final del experimento es mayor al 75% de las esporas germinadas. Los valores estadísticos de sobrevivencia se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 9. Proporción de sobrevivencia de gametofitos expuestos a distintos tratamientos con Pb, Cu y Zn, de acuerdo al promedio de esporas sembradas.

Tratamiento	Sobrevivencia (semanas)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control									
Pb 0 μM – Cu 1 μM – Cu 1 μM	0	0.023	0.030	0.034	0.035	0.034	0.025	0.024	0.022
Plomo (μM)									
45	0	0.019	0.023	0.025	0.029	0.025	0.020	0.019	0.016
91	0	0.009	0.022	0.027	0.030	0.025	0.021	0.020	0.014
181	0	0.000	0.002	0.006	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006
226	0	0.001	0.004	0.008	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006
257	0	0.005	0.008	0.010	0.011	0.011	0.008	0.008	0.008
Cobre (μM)									
13	0	0.014	0.019	0.021	0.022	0.023	0.017	0.017	0.016
30	0	0.010	0.014	0.016	0.017	0.017	0.011	0.013	0.013
54	0	0.003	0.005	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006	0.006
66	0	0.002	0.011	0.013	0.015	0.013	0.012	0.012	0.011
77	0	0.012	0.020	0.025	0.032	0.032	0.026	0.025	0.024
Zinc (μM)									
81	0	0.006	0.013	0.015	0.013	0.016	0.011	0.012	0.012
161	0	0.002	0.008	0.010	0.011	0.011	0.007	0.007	0.006
324	0	0.001	0.004	0.006	0.009	0.009	0.003	0.006	0.004
411	0	0.001	0.004	0.010	0.011	0.012	0.009	0.009	0.010
463	0	0.002	0.006	0.010	0.014	0.014	0.009	0.010	0.010

Cuadro 10. ANOVA para medidas repetidas comparando la sobrevivencia de gametofitos en los diferentes tratamientos con Pb, Cu y Zn, de acuerdo a las esporas sembradas.

Fuente de variación	Plomo			Cobre			Zinc		
	F	P	*P-GG	F	P	*P-GG	F	P	*P-GG
Entre sujetos									
Tratamiento	6.18	0.0003		4.61	0.0023		8.10	<0.0001	
Dentro de sujetos									
Tiempo	6.61	<0.0001	<0.0001	109.34	<0.0001	<0.0001	96.78	<0.0001	<0.0001
Tiempo X Tratamiento	2.95	<0.0001	0.0016	3.16	<0.00001	0.0006	4.23	<0.0001	<0.0001
		ϵ -GG=0.3045			ϵ -GG=0.3264			ϵ -GG=0.4147	

*Nivel de significancia después de ajustar con la epsilon de Greenhouse-Geisser (ϵ -GG)

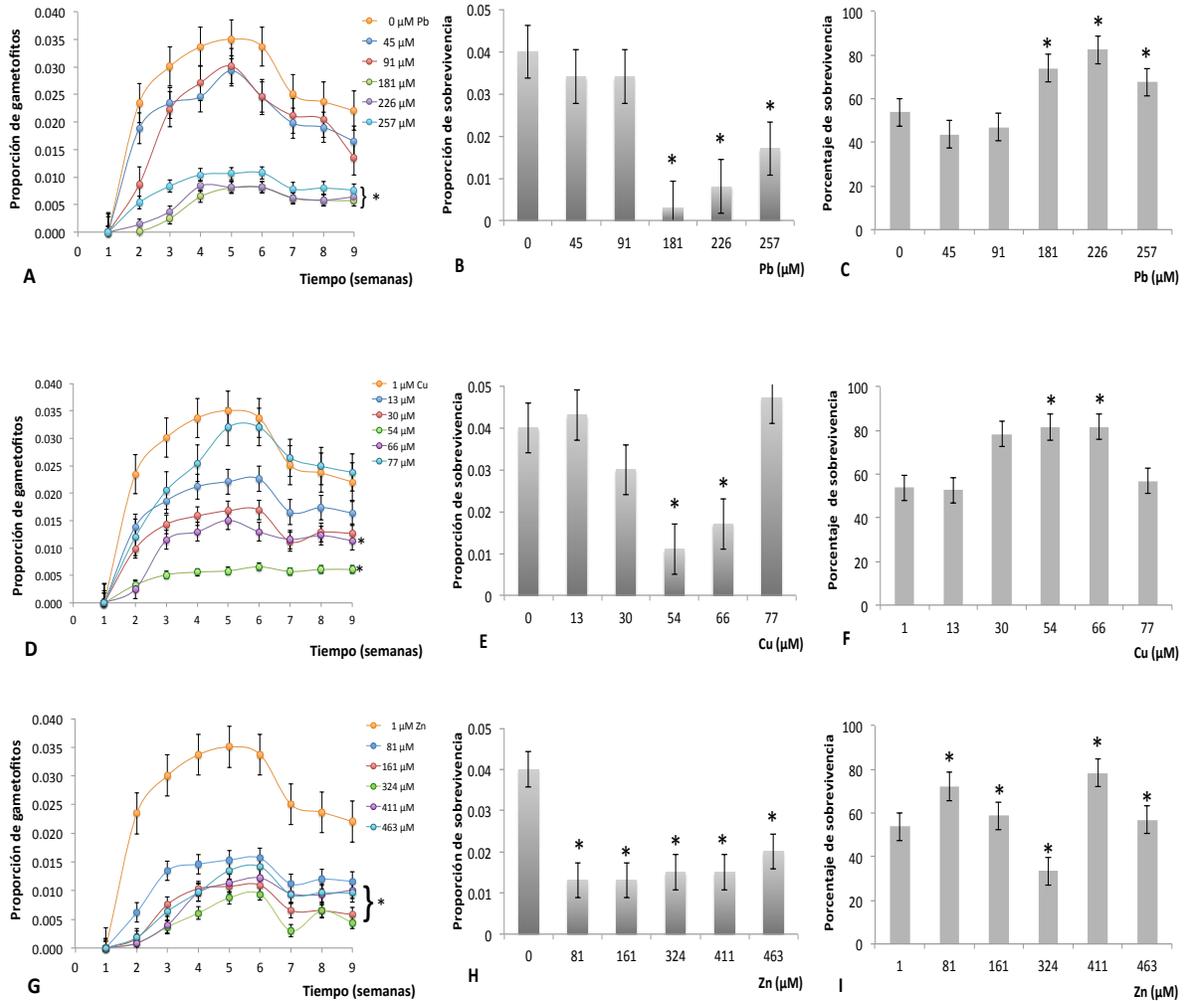


Figura 5. Proporción de supervivencia de gametofitos de *A. capillus-veneris*, a diferentes concentraciones de Pb, Cu y Zn. A,B,C con Pb; D, E, F con Cu y G,H,I con Zn. Proporción de gametofitos sobrevivientes en función del tiempo en estudio A,D,G; proporción de supervivencia por cada tratamiento, en promedio, B,E,H; porcentaje de gametofitos sobrevivientes al término del estudio, con base en la germinación, C,F,I. Los datos se obtuvieron con una $n=41$, y se muestra la media \pm el error estándar. Los * indican significancia con respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas con $p < 0.05$, seguida de una prueba Tukey-Kramer.

8.1.2. Desarrollo de gametofitos

Debido a que la germinación se retrasó en varios tratamientos con Pb, Cu y Zn, el desarrollo se desfasó también con relación al cultivo control. En la figura 6 podemos observar las gráficas de desarrollo de los gametofitos, en cada etapa y por tratamientos con metales. La etapa de gametofito filamentoso (E1), en todos los tratamientos no dura más de una semana, incluso unos cuantos días en el control. Asimismo, en los tratamientos con mayor cantidad de Pb (181 a 257 μ M) el número de individuos fue menor con respecto al control ($F=4.70$, $P<0.0001$). En Cu, el número de individuos disminuyó conforme al aumento en la concentración, principalmente en 54 μ M ($F=3.21$, $P<0,0001$), concentración media en el experimento. En todos los tratamientos con Zn, fue bajo el número de individuos y se observó que de acuerdo al incremento en la concentración de Zn, el tiempo de desarrollo es más lento y se puede retrasar hasta 3 semanas ($F=5.82$, $P<0.0001$).

La etapa de gametofito espatulado (E2), dura aproximadamente 1 semana en el control, y tarda menos de 7 días en pasar de E1 a E2. A diferencia del control, en los tratamientos con Pb la etapa dura 3 semanas y, hasta 4 en los de Cu y Zn, de acuerdo al incremento en la concentración. Los tratamientos que presentaron menor cantidad de gametofitos en esta etapa, con respecto al control, fueron: Cu 54 μ M ($F=2.52$, $P=0,0011$), Zn 324 μ M ($F=4.11$, $P<0,0001$) y Pb181 μ M ($F=2.61$, $P=0,0009$).

La etapa de gametofito joven (E3) dura aproximadamente 3 semanas, en la cual se observa mortandad en la semana 6 y 7, tanto en el control como en las primeras concentraciones de Pb y Cu y Zn; sin embargo, en los tratamientos con Pb 181-

257 μ M, Cu 54 μ M y en todos los de Zn, la baja proporción de gametofitos jóvenes tuvo un desarrollo más lento y presentó menos individuos muertos ($F=3.66$, $P<0,0001$; $F=2.77$, $P=0,0020$ y $F=4.71$, $P<0,0001$, respectivamente).

Finalmente, se observó que para la semana 9 después de la siembra, los gametofitos que alcanzan la etapa madura (E4), desarrollan órganos reproductores, corresponden a una baja proporción con respecto al control. Los efectos de los metales se observan principalmente en Pb 181 – 257 μ M ($F=3.54$, $P=0,0004$) y Cu 54 μ M – 66 μ M ($F=1,98$, $P=0,0008$), donde se observó una menor proporción de individuos, y en el caso de Zn sólo en la concentración 81 μ M hubo gametofitos maduros ($F= 5.29$ $P<0,0001$) (Figura 6); a diferencia del control, donde los gametofitos maduros aparecen entre la semana 5 y 6 después de la siembra de esporas.

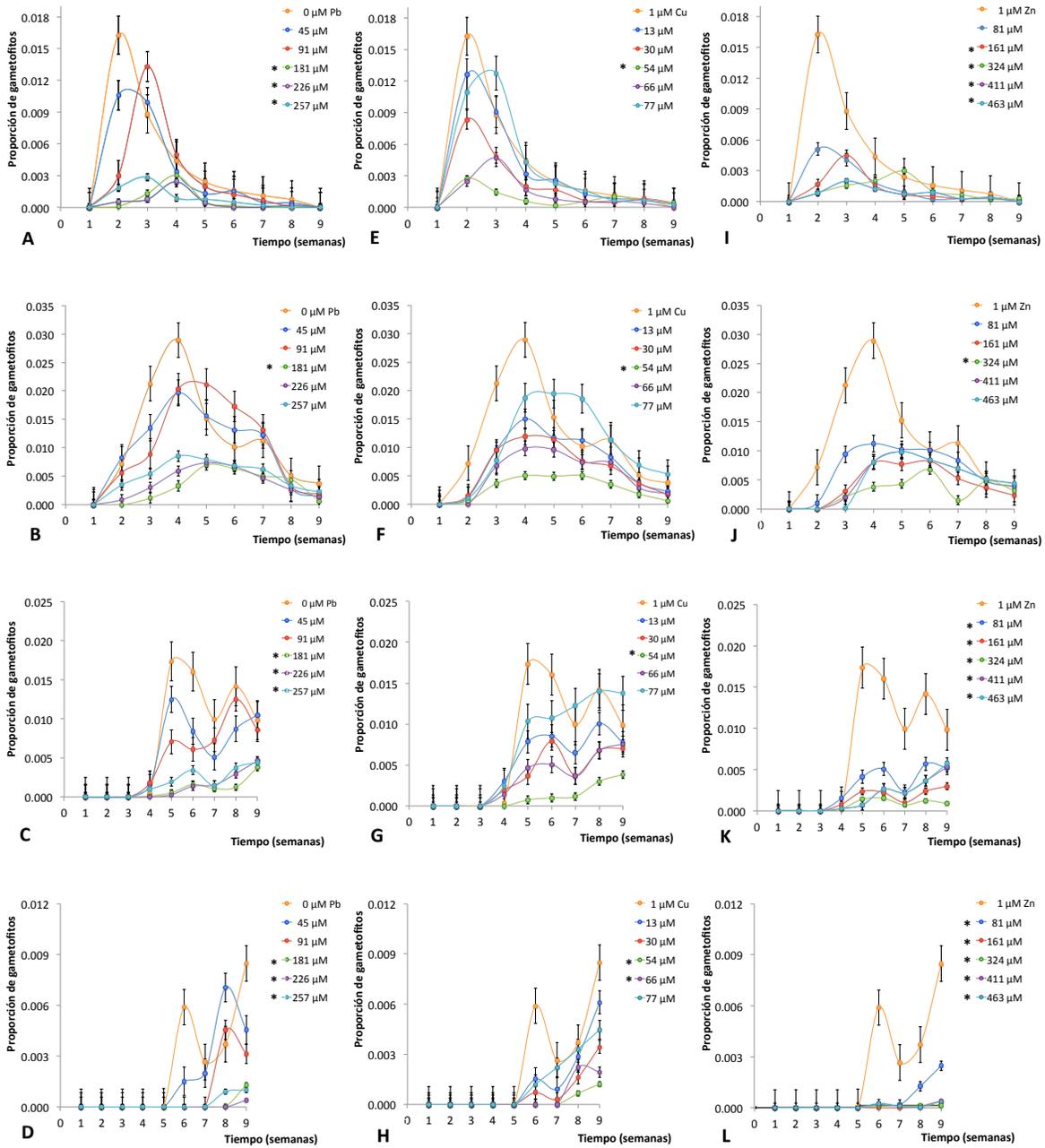


Figura 6. Proporción de gametofitos de *A. capillus-veneris*, en sus diferentes etapas de desarrollo a diferentes concentraciones de Pb, Cu y Zn. A,B,C,D con Pb; E, F, G, H con Cu; I, J, K, L con Zn. Gametofito filamentosos en A, E, I; gametofito espatulado en B, F, J; gametofito joven en C, G, K; y gametofito maduro en D, H, L. Los datos se obtuvieron con una n=379, en que se muestra la media \pm el error estándar. Los * indican significancia con respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas con $p < 0.05$, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (A, C, D, G, H, K, L) y de Tukey-Kramer (B, E, F, I, J).

8.1.3. Caracteres morfométricos

A partir de la semana 6, se observa en el control que algunos gametofitos empiezan a reproducirse vegetativamente y algunos no sobreviven. Asimismo, los individuos en las concentraciones de Cu 54 – 77 μM adquieren una coloración parda; en las concentraciones de 181 a 257 μM de Pb, algunos gametofitos se tornan hialinos y pardos, al igual que los individuos de los tratamientos con Zn 161 – 463 μM , e incluso algunos no sobreviven en dichas concentraciones.

En los tratamientos con Cu, el peso fresco es equivalente al obtenido en los individuos del control ($F=1.08$, $P=0,3698$), sin embargo, en los cultivos que contienen Pb, a excepción de 226 μM , los gametofitos tienen menor peso. En las todas las concentraciones de Zn (81 μM a 463 μM), se observa que el peso también es significativamente menor que el control ($F=6.31$, $P<0,0001$ y $F=7.43$, $P<0,0001$ respectivamente). En 324 μM no hay diferencias significativas, probablemente porque el tamaño de la muestra es menor en comparación con el resto de los tratamientos, no obstante, se observa que el peso es menor que el control (Fig. 7).

Las dimensiones del largo y ancho de los gametofitos, indican que los individuos son más pequeños que en el control cuando se exponen a los tratamientos con Pb 45 y 257 μM (también en 226 μM para el ancho), en Cu 13, 30, y 77 μM , y en Zn 81, 161, 411, 463 μM ($F=16.61$, $P<0.0001$; $H=35.038$, $P<0.0001$; $H=60.98$, $P<0.0001$ para el largo; y $H=46.74$, $P<0.0001$; $F=7.52$, $P<0.0001$; $F=18.04$, $P<0.0001$ para el ancho, respectivamente) (Fig. 8).

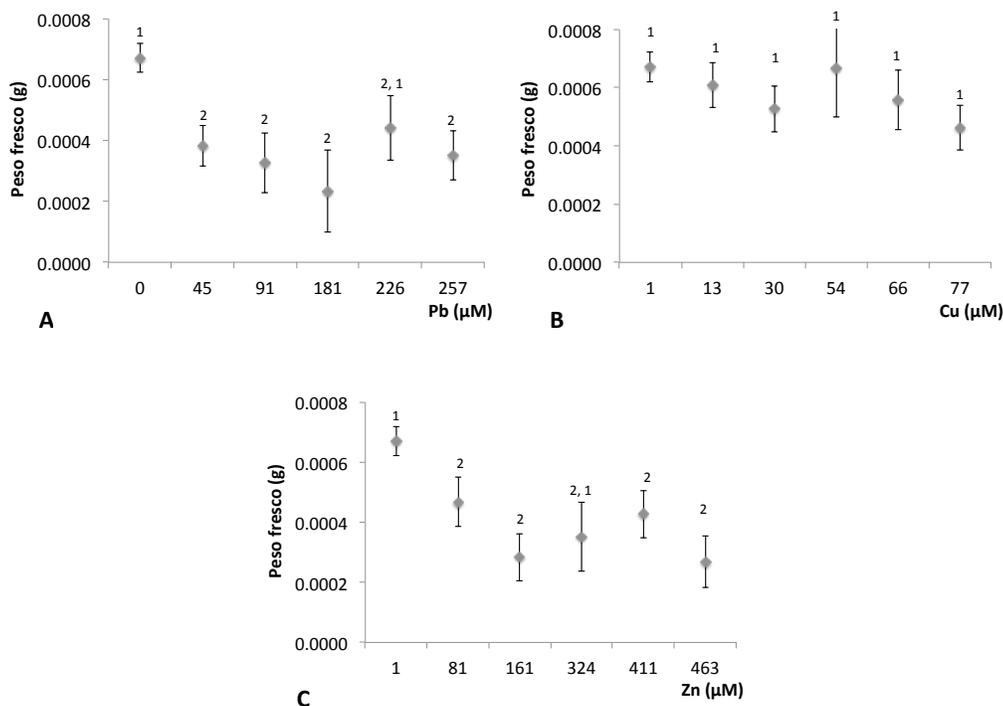


Figura 7. Peso fresco de gametofitos (g) de *A. capillus-veneris*, en diferentes concentraciones de Pb (A), Cu (B) y Zn (C). Los datos se obtuvieron con una n=230 en Pb, n=254 en Cu y n=252 en Zn, se muestra la media \pm el error estándar. La numeración en las gráficas indica la significancia respecto al control y entre los tratamientos, mediante ANOVA de una vía con $p < 0.05$, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (B, C) y de Tukey-Kramer (A).

El número de rizoides que presentan los gametofitos es menor en todos los tratamientos con Pb ($F=10.34$, $P < 0,0001$), a diferencia de los expuestos a Cu, cuya cantidad no difiere del control ($F=1.77$, $P=0,1212$). Los gametofitos expuestos a Zn 81, 161, 324, y 463 μM , el número de rizoides también es menor ($F=6.59$, $P < 0,0001$) (Fig. 9).

De igual manera, el largo de los rizoides en los tratamientos con Cu no hubo diferencias significativas ($H=10.61$, $P=0.0596$), sin embargo los gametofitos

expuestos a Pb 45 y 257 μM tienen rizoides más cortos que el control ($H=53.21$, $P<0.0001$), al igual que en Zn 463 μM ($H=36,57$, $P<0,0001$) (Fig. 9).

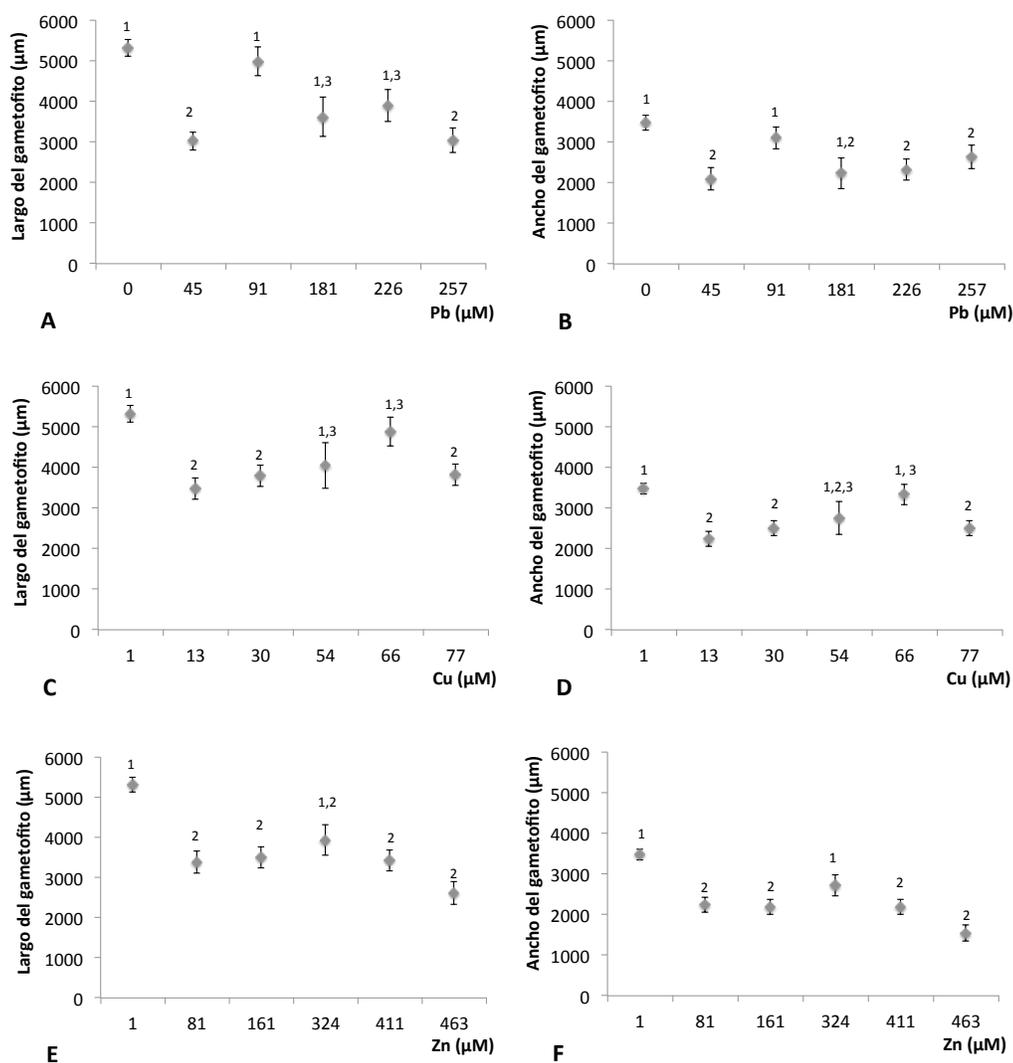


Figura 8. Largo y ancho de gametofitos (μm) de *A. capillus-veneris*, en diferentes concentraciones de Pb, Cu y Zn. A, B con Pb; C, D con Cu y E, F con Zn. Largo en A, C, E y ancho en B, D, F. Los datos se obtuvieron con una $n=213$ en Pb, $n=223$ en Cu y $n=229$ en Zn, se muestra la media \pm el error estándar. La numeración en las gráficas indica la significancia respecto al control y entre los tratamientos, mediante ANOVA de una vía con $p<0.05$, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (D) y de Tukey-Kramer (A, B, C, E, F).

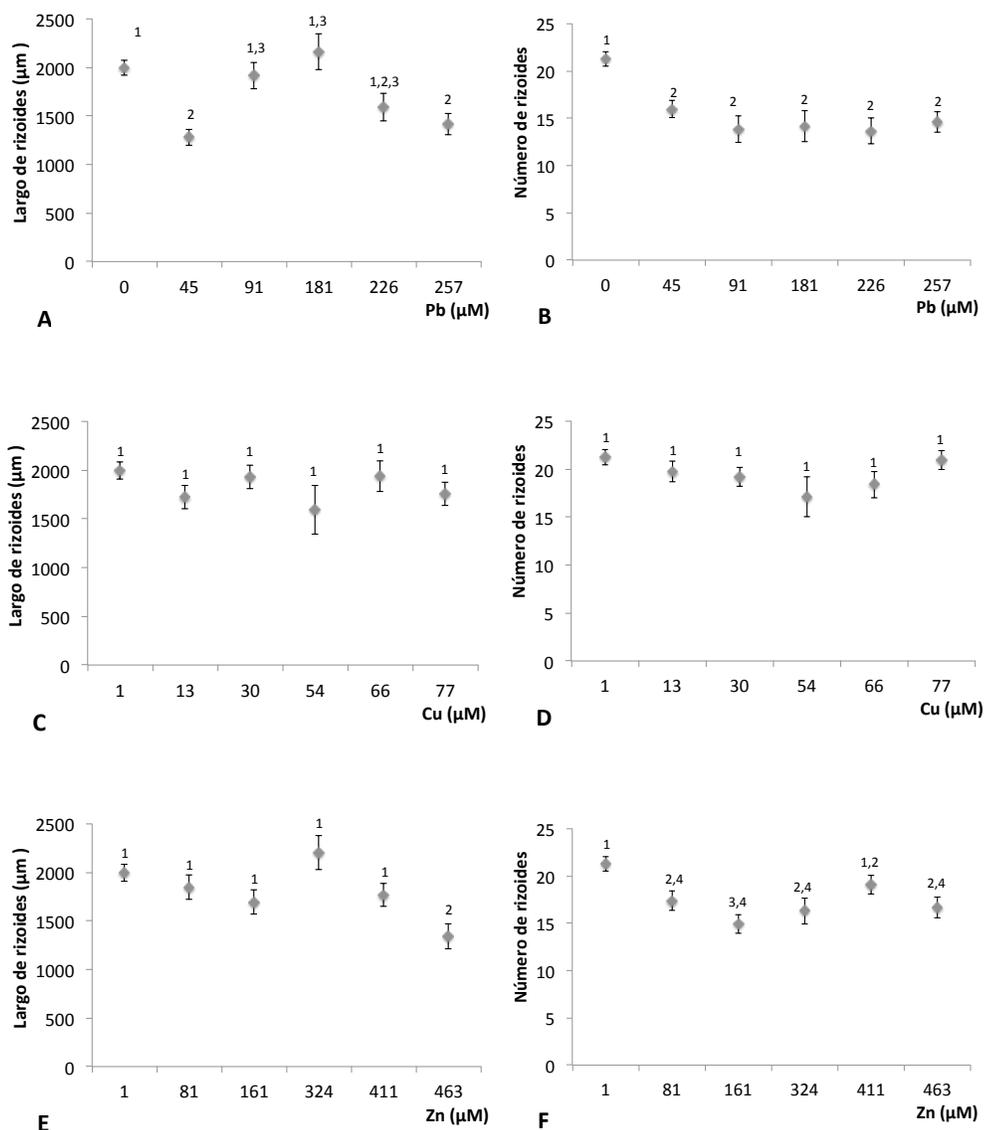


Figura 9. Largo (μm) y número de rizoides de gametofitos de *A. capillus-veneris*, en diferentes concentraciones de Pb, Cu y Zn. A, B con Pb; C, D con Cu y E, F con Zn. Largo de rizoides en A, C, E y número de rizoides en B, D, F. Los datos para el largo de rizoides se obtuvieron con una n=426 en Pb, n=446 en Cu y n=458 en Zn; y para el número de rizoides con una n=184 en Pb, n=207 en Cu y n=204 en Zn. Se muestra la media ± el error estándar. La numeración en las gráficas indica la significancia respecto al control y entre los tratamientos, mediante ANOVA de una vía con p<0.05, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (B, D, F) y de Tukey-Kramer (A, C, E).

8.1.4. Detección de Cu, Zn y Pb en tejidos

a) Ubicación in situ de los metales pesados

Mediante la prueba histoquímica de rodizonato en los gametofitos jóvenes de los tratamientos con Pb 45 a 57 μM , dicho metal se encontró almacenado en estructuras tipo vacuolar y en las paredes de células rizoidales, en el parénquima de la costa y alas del gametofito (Fig. 10). Asimismo, se observó que a medida que se incrementa la concentración de Pb los sitios de acumulación son más evidentes.

Por otro lado, mediante la tinción con ditizona (color rosa), se localizó Zn en los rizoides, principalmente en la zona proximal, así como en parénquima de la costa y alas de los gametofitos, todas ellas en estructuras tipo vacuolar (Fig. 11). Al igual que en el caso del Pb, la tinción es mayor conforme se incrementa la concentración de Zn, lo cual indica una mayor acumulación del metal.

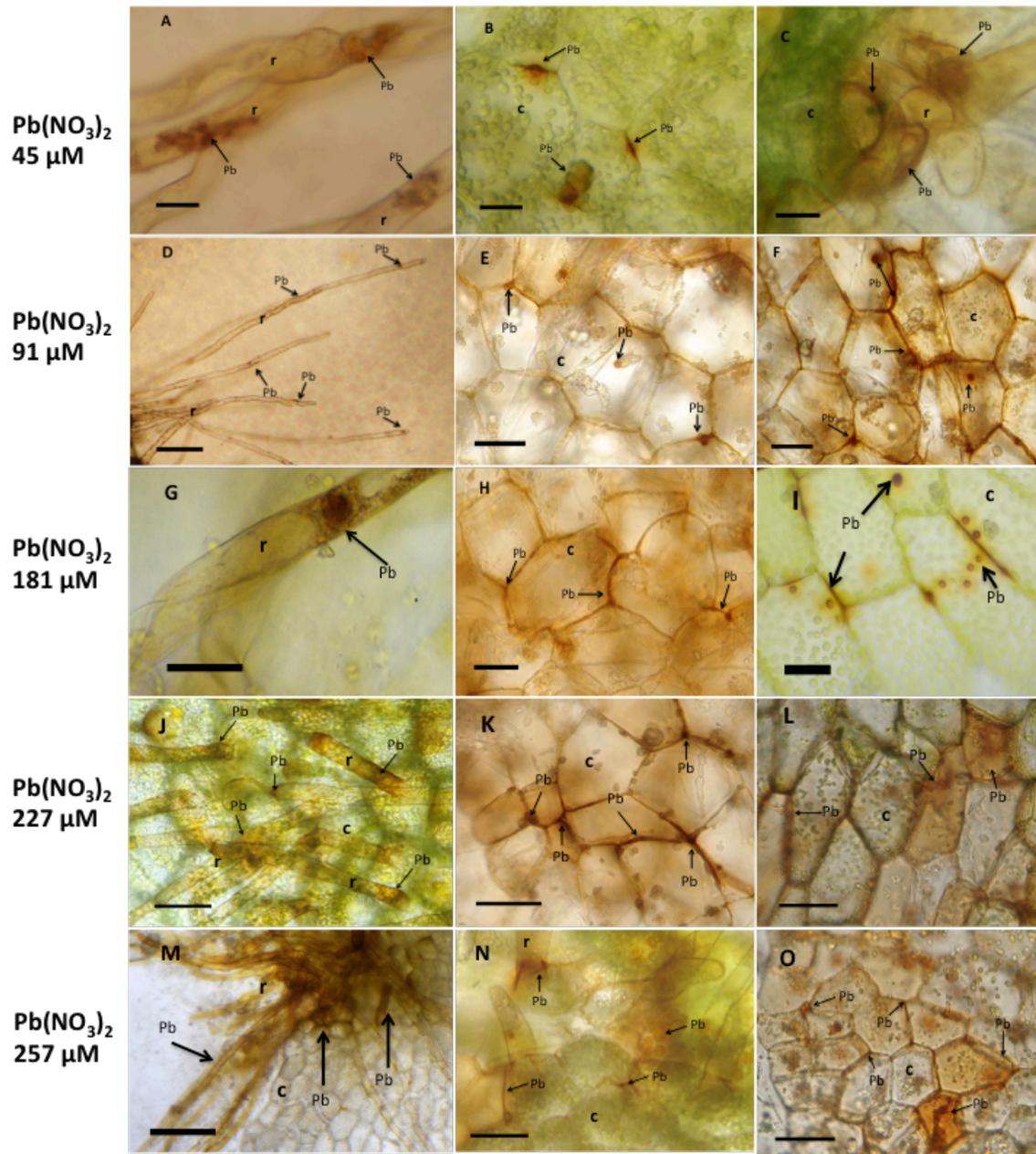


Figura 10. Ubicación de Pb en rizoides (r) y clorénquima (c) de los gametofitos (en color pardo-rojizo), generalmente acumulados en estructuras de tipo vacuolar y paredes, expuestos a $Pb(NO_3)_2$ 45 μ M a 257 μ M. Rizoides en A, D, G, J, M, N y clorénquima en B, C, E, F, H, I, K, L, O. Barra = 0.03mm en A, B,C, D,E, F,G, H, I; 0.05 mm en J, K, L, N, O y 0.2mm en M.

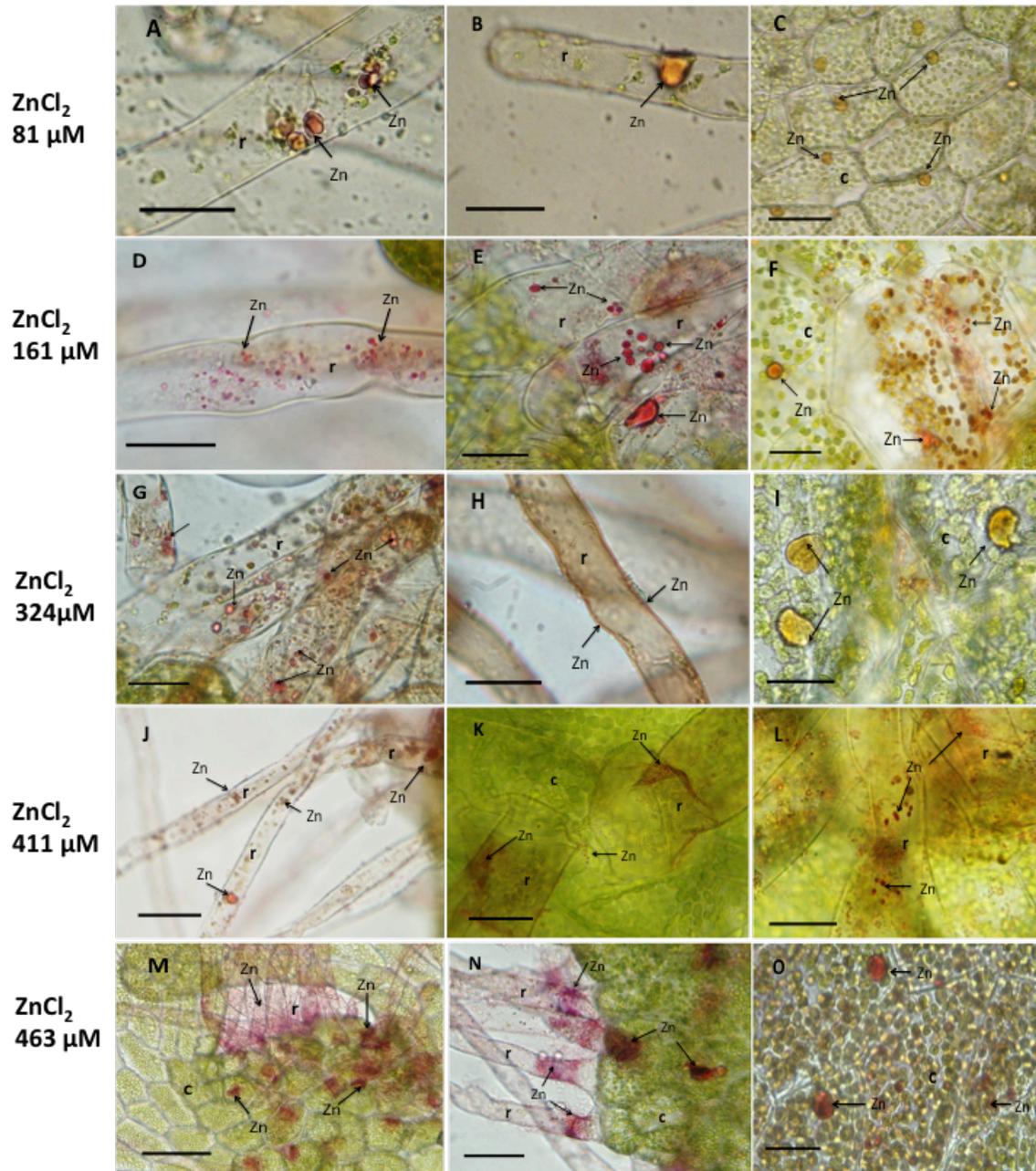


Figura 11. Ubicación de Zn^{+2} en rizoides (r) y clorénquima (c) de gametofitos jóvenes detectados con ditizona (rosa-rojo), acumulado en estructuras vacuolares y paredes celulares, expuestos a $ZnCl_2$ 81 μ M a 463 μ M. Rizoides en A, B, D, E, G, H, J, K, L, M, N y clorénquima en C, F, I, O. Barra =0.02 mm en A,B, D, E, F, G, H, I, K, L,O; 0.05mm en C, J, N y 0.1mm en M.

b) Técnica en Microscopía Electrónica de Barrido con Espectrómetro de Dispersión de Energía (MEB- EDS)

Se encontraron trazas de Cu en el parénquima de la costa del gametofito y en los rizoides; en la figura 12, los puntos rojos indican presencia de Cu^{+2} . En el caso del Pb, se encontró en el clorénquima de las alas del gametofito, así como en las células proximales de los rizoides (Figs. 13 a 15).

El Zn fue detectado en la pared de las células fotosintéticas de la costa y en pelos glandulares situados en esta zona; además, en los rizoides, presentes junto con partículas de Cu (Figs. 16 a 18). Asimismo, en el cuadro 11 se observa el porcentaje del peso de cada metal. Como la cantidad de carbono es la más constante, se puede comparar la cantidad de Pb, Cu y Zn presente en las muestras. Por lo tanto, el metal con menor porcentaje en tejidos es el Cu.

Sin embargo, en el caso de Pb, hay mayor porcentaje en el clorénquima de la costa del gametofito, que en el de las alas y el asociado a rizoides. Por otra parte, el Zn se halla en mayor proporción en los rizoides, seguido de pelo glandular y clorénquima; sin embargo, es el metal que presenta mayor porcentaje de peso en el gametofito.

Cuadro 11. Porcentaje del peso de Pb, Cu y Zn respecto otros elementos asociados, para cada muestra observada en MEB-EDS.

Elementos	Clorénquima y rizoides (Fig. 13)	Clorénquima del ala del gametofito (Fig.14)	Clorénquima asociado a rizoides (Fig.15)	Clorénquima de la costa (Fig. 16)	Pelo glandular (Fig.17)	Clorénquima (Fig.18)	Rizoide (Fig.19)
Carbono (C)	53.5	43.0	57.8	54.8	55.6	52.3	47.1
Oxígeno (O)	24.0	36.1	35.8	36.1	36.5	41.6	26.5
Fósforo (P)	12.1	1.3	1.2	2.1	2.0	1.6	1.3
Plomo (Pb)	--	0.7	0.6	3.0	--	--	--
Cobre (Cu)	0.39	--	--	--	--	--	--
Zinc (Zn)	--	--	--	--	2.6	1.39	8.7
Otros elementos	10.1	18.9	4.6	4.0	3.3	3.1	16.4

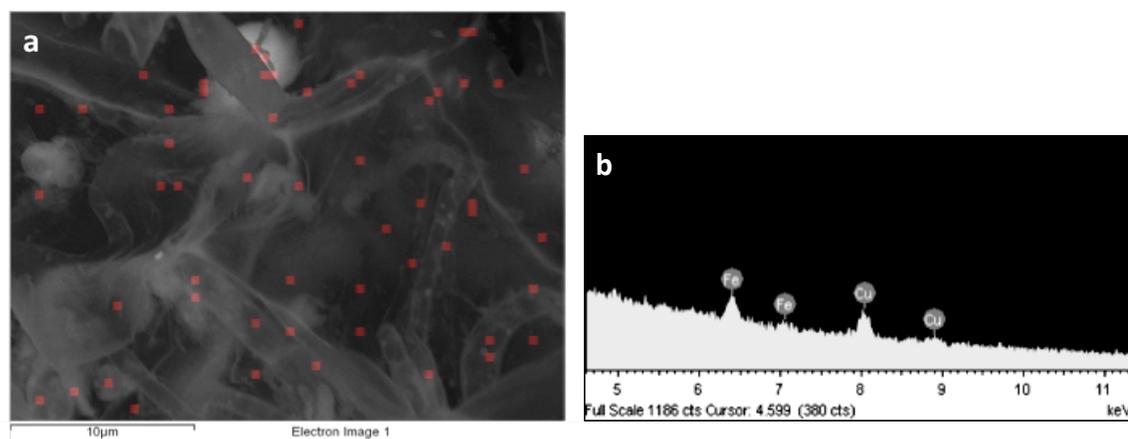


Figura 12. Presencia de Cu en tejidos de los gametofitos expuestos a Cu 463μM, mediante MEB-EDS. a) Costa del gametofito: clorénquima y rizoides, donde los puntos rojos pertenecen a las zonas donde se presenta Cu en el área observada, b) Espectro que muestra la presencia de Cu y Fe en el tejido.

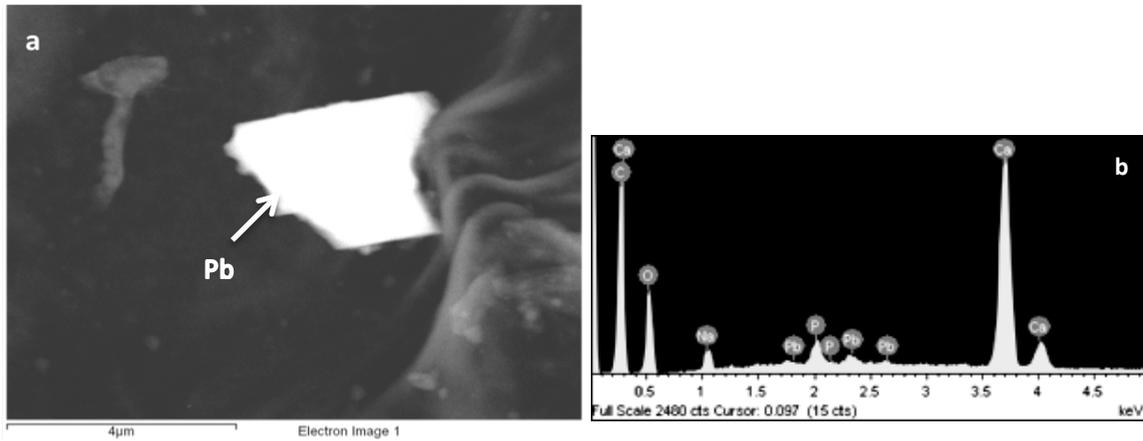


Figura 13. Presencia de Pb en tejidos de los gametofitos expuestos a Pb 257 μ M, mediante MEB-EDS. a) Célula fotosintética del ala del gametofito con restos de Pb, b) Gráfica que muestra la presencia de Pb y Ca en el tejido, así como otros elementos detectados con EDS.

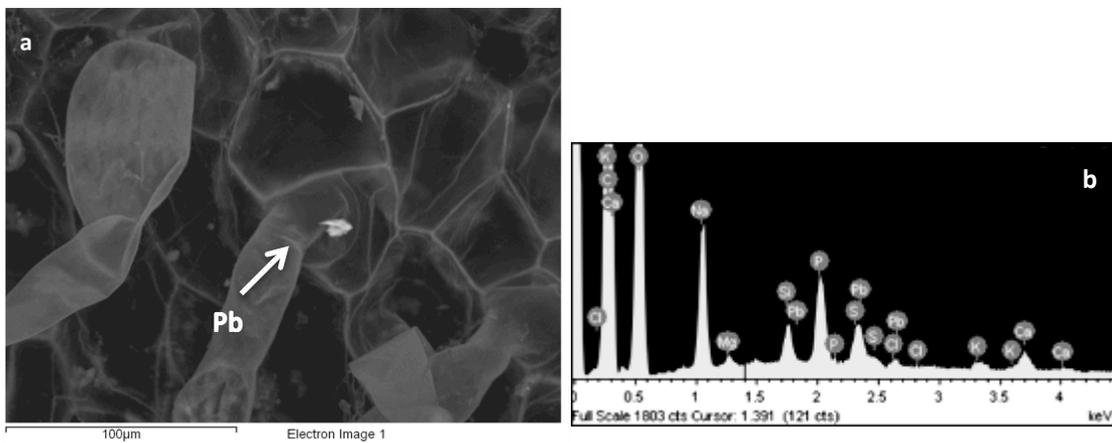


Figura 14. Presencia de Pb en tejidos de los gametofitos expuestos a Pb 257 μ M, mediante MEB-EDS. a) Células cercanas a los rizoides del gametofito con restos de Pb, b) Gráfica que muestra la presencia de Pb y Ca en el tejido.

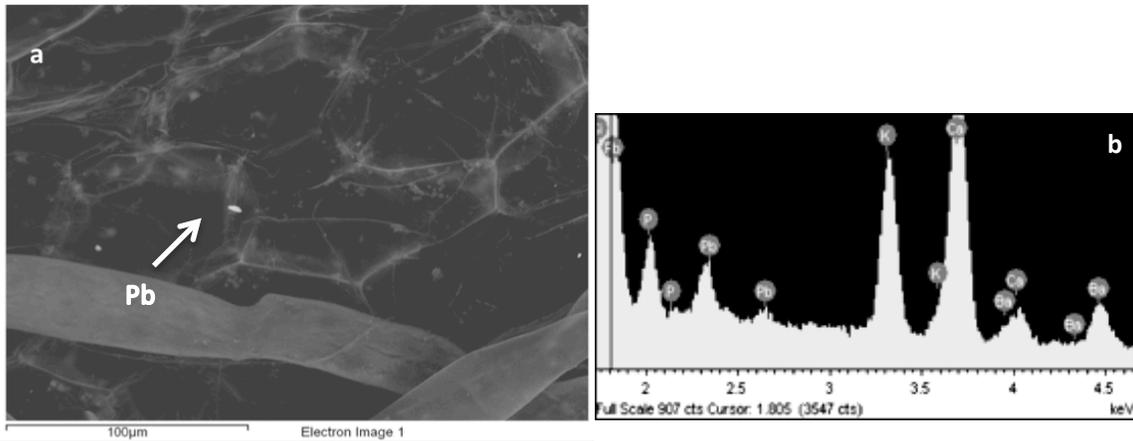


Figura 15. Presencia de Pb en tejidos de los gametofitos expuestos a Pb 257 μ M, mediante MEB-EDS. a) Células fotosintéticas de la costa del gametofito con restos de Pb. b) Gráfica que muestra la presencia de Pb en el tejido, así como otros elementos detectados con EDS.

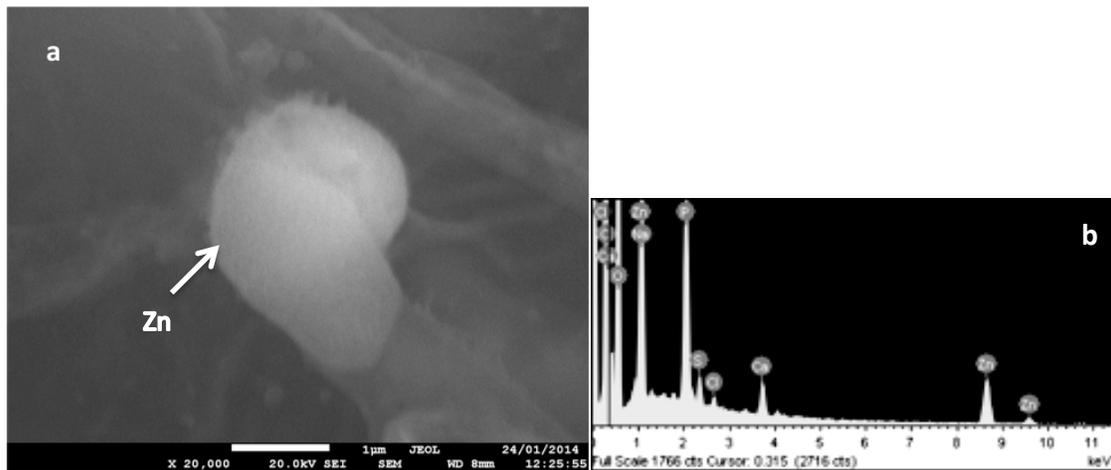


Figura 16. Presencia de Zn en tejido de gametofitos expuestos a Zn 463 μ M, mediante MEB-EDS. a) Pelo glandular del gametofito donde se encontró Zinc, b) Gráfica que muestra la presencia de Zn en el pelo glandular, así como otros elementos detectados con EDS.

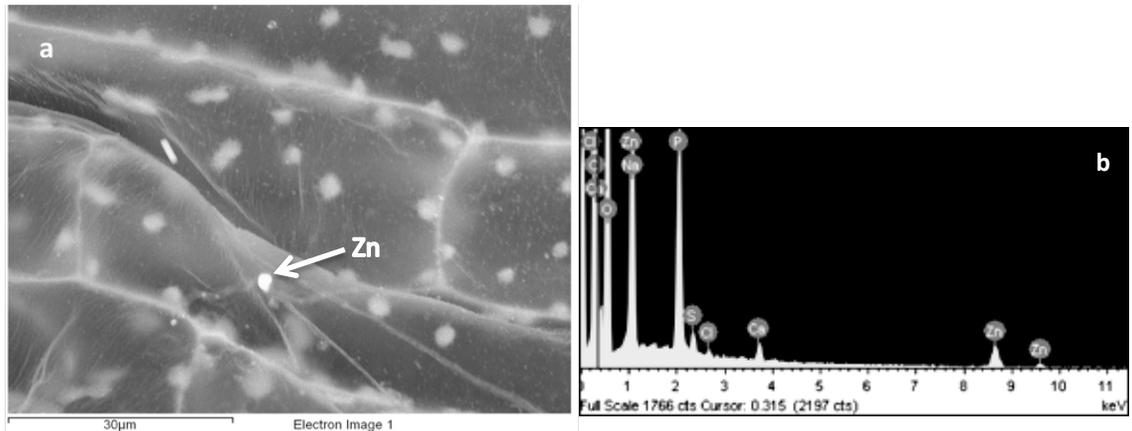


Figura 17. Presencia de Zn en tejidos de los gametofitos expuestos a Zn 463 μ M, mediante MEB-EDS. a) Células fotosintéticas del gametofito donde se encontró Zinc, b) Gráfica que muestra la presencia de Zn en las células, así como otros elementos detectados con EDS.

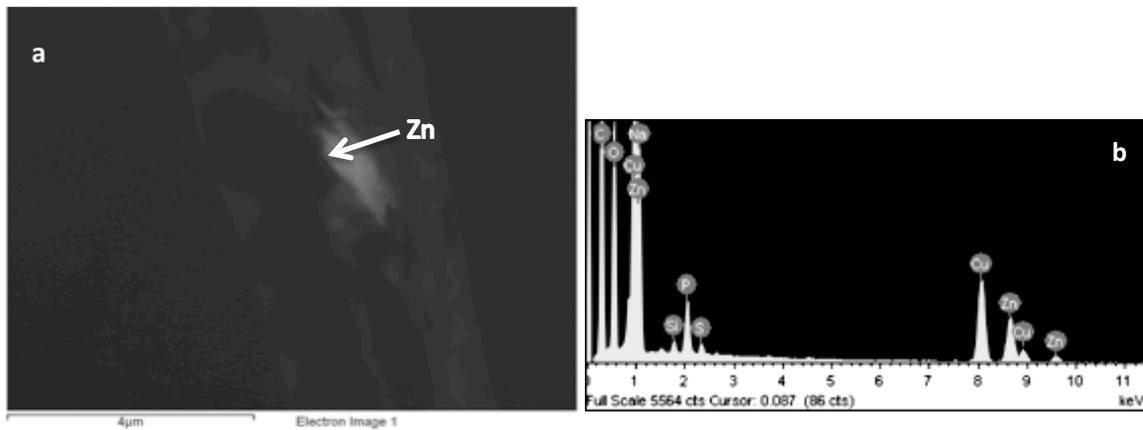


Figura 18. Presencia de Zn en rizoides de los gametofitos expuestos a Zn 463 μ M, mediante MEB-EDS. a) Rizoides del gametofito que contienen Zinc, b) Gráfica que muestra la presencia de Zn en los rizoides, así como otros elementos detectados con EDS.

8.2. Fase II

8.2.1. Germinación y sobrevivencia

La germinación de esporas, al igual que en la Fase I, inició entre 7 y 14 días después de la siembra, y los porcentajes de esporas germinadas en los tratamientos fue menor al control, incluso en algunos casos fue casi nula (Cuadro 12). Los tratamientos de metales combinados tuvieron una proporción de germinación menor a 6%, entre las cuales Zn-Cu y Zn-Pb-Cu son las de menor valor (0.4% y 0.5%) indicando que la germinación de esporas disminuyó más del 90% respecto al control. Por el contrario, en Pb-Cu y Zn-Pb la germinación fue mayor que los tratamientos anteriores, 5.8% y 4.8% respectivamente.

La sobrevivencia de gametofitos en el control fue de 66% y en el tratamiento con Pb 60%, en Cu, sobrevivieron el 46% y con Zn el 49% de los gametofitos desarrollados. Por otra parte, en los tratamientos con metales combinados, Pb-Cu y Zn-Cu presentaron menor sobrevivencia de gametofitos (43% y 49% respectivamente); sin embargo, la sobrevivencia en Zn-Cu y Zn-Pb-Cu fue de 78% y 83%, respectivamente (Cuadro 13).

Se observó que hubo diferencias significativas en la sobrevivencia, con respecto al control, en el tratamiento donde se combinó Zn y Cu (Zn-Cu), y en el que estuvieron presentes los tres metales (Zn-Cu-Pb) (Cuadro 14 y Fig. 19).

Cuadro 12. Proporción de Germinación (PG) de esporas expuestas a distintos tratamientos con Pb, Cu y Zn.

Tratamiento	Esporas sembradas	Esporas germinadas	% esporas germinadas	% disminución con respecto al control
Control				
Pb 0 μ M – Cu 1 μ M – Cu 1 μ M	996	87	8.7	0
Pb (91 μ M)	1558	80	5.1	41.4
Cu (54 μ M)	1054	101	9.5	+9.2
Zn (324 μ M)	1832	139	7.6	12.6
Pb-Cu	1518	88	5.8	33.3
Zn-Cu	1510	6	0.4	95.4
Zn-Pb	1390	66	4.8	44.8
Zn-Pb-Cu	1464	7	0.5	94.3

Cuadro 13. Proporción de sobrevivencia de gametofitos de *A. capillus-veneris* en tratamientos de Cu, Pb y Zn y sus combinaciones, durante 9 semanas

Tratamiento (μ M)	Semanas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	0.000	0.006	0.035	0.054	0.049	0.062	0.053	0.055	0.057
Cu	0.000	0.009	0.039	0.058	0.049	0.060	0.044	0.045	0.044
Zn	0.000	0.004	0.028	0.050	0.037	0.040	0.037	0.040	0.037
Pb	0.000	0.002	0.018	0.035	0.032	0.036	0.031	0.031	0.031
Pb-Cu	0.000	0.003	0.023	0.034	0.035	0.032	0.022	0.027	0.025
Zn-Cu	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002	0.002
Zn-Pb	0.000	0.000	0.017	0.037	0.028	0.040	0.037	0.037	0.037
Zn-Pb-Cu	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.003	0.005	0.005

Cuadro 14. ANOVA para medidas repetidas en la sobrevivencia de gametofitos en los tratamientos de Pb, Cu, Zn y sus combinaciones.

Fuente de variación	F	P	*P-GG
Entre sujetos			
Tratamiento	9.44	0.0001	
Dentro de sujetos			
Tiempo	99.16	<0.0001	<0.0001
Tiempo X Tratamiento	5.73	<0.0001	<0.0001

ϵ -GG=0.2721

* Nivel de significancia después de ajustar con la ϵ de Greenhouse-Geisser (ϵ -GG).

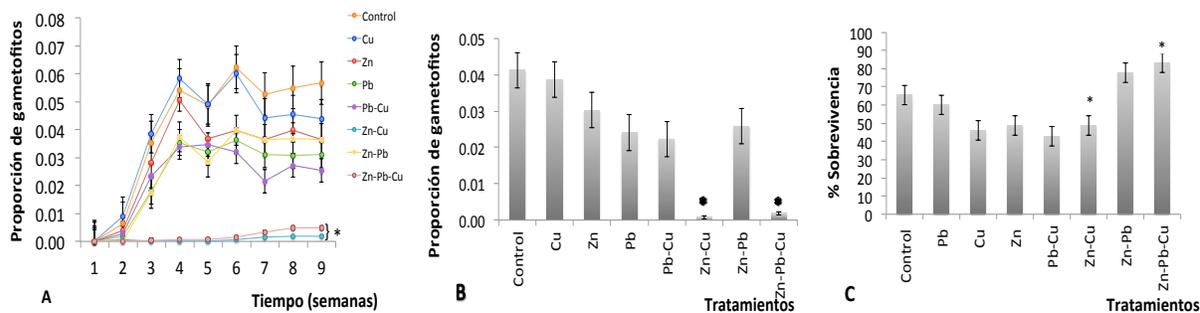


Figura 19. Proporción de supervivencia de gametofitos de *A. capillus-veneris*, expuestos a concentraciones de Pb, Cu y Zn, del jale Santa María, y sus combinaciones. Proporción de gametofitos sobrevivientes en función del tiempo en estudio (A), proporción de supervivencia por cada tratamiento, en promedio (B) y porcentaje de gametofitos sobrevivientes al término del estudio, con base en la germinación (C). Los datos se obtuvieron con una $n=56$, y se muestra la media \pm el error estándar. Los * indican significancia con respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas con $p < 0.05$, seguida de una prueba Tukey-Kramer.

8.2.2. Desarrollo de gametofitos

En esta segunda fase, el desarrollo de los gametofitos en esta segunda fase, se puede observar en la figura 20. En la etapa unidimensional (E1), sólo los tratamientos con metales en combinación Zn-Cu y Zn-Cu-Pb, presentaron diferencias significativas con respecto al control, pues el número de individuos resultó menor ($F=7.60$, $P < 0.0001$); además, su desarrollo se retrasó dos semanas y se registró el mayor número de individuos hasta la semana 7, a diferencia del control y demás tratamientos que lo obtuvieron en la semana 3 y 4.

La proporción de gametofitos de la etapa bidimensional (E2), al igual en la etapa anterior, los tratamientos Zn-Cu y Zn-Cu-Pb son los que difieren del control ($F=10.53$, $P < 0.0001$). Además, la proporción de gametofitos que llegaron a ser cordiformes (E3)

fue significativamente menor que el control en el tratamiento con Pb y en las combinaciones Pb-Cu, Zn-Cu, Zn-Pb y Zn-Pb-Cu ($F=9.77$, $P<0.0001$). Finalmente, en la semana 9 no se registraron individuos maduros (E4) en los tratamientos con Zn-Cu y Zn-Pb-Cu y en el resto de los lotes, pocos gametofitos lograron desarrollar estructuras reproductoras ($F=15.29$, $P<0.0001$).

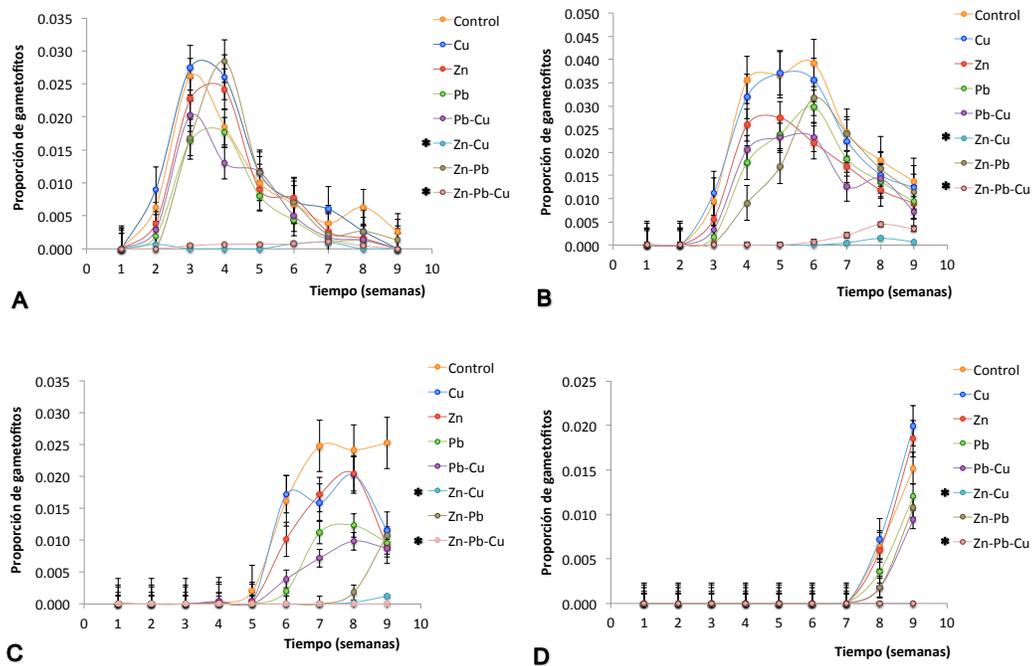


Figura 20. Proporción de gametofitos de *A. capillus-veneris*, en sus diferentes etapas de desarrollo a diferentes concentraciones combinadas de Pb, Cu y Zn, equivalentes a las del jale Santa María. Gametofito filamentosos en A, gametofito espátulados en B, gametofito joven en C y gametofito maduro en D. Los datos se obtuvieron con una $n=216$, y se muestra la media \pm el error estándar. Los * indican significancia con respecto al control, mediante ANOVA de medidas repetidas con $p<0.05$, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (B, D) y de Tukey-Kramer (A, C).

8.2.3. Caracteres morfométricos

Como se mencionó, el número de individuos registrados en los tratamientos Zn-Cu y Zn-Cu-Pb fue muy bajo y no se obtuvieron muestras suficientes para evaluar el efecto en todos los caracteres morfométricos, por lo que, en algunos casos, estos tratamientos no se incluyen. El peso fresco en los gametofitos de *A. capillus-veneris* fue notablemente menor en los tratamientos Pb, Zn y Zn-Cu, con respecto al control ($H=14.62$, $P=0.0121$); los individuos que presentaron menor peso son los que se desarrollaron en el medio de cultivo con Zn-Pb (Fig. 21). El tamaño, largo y ancho, de los gametofitos resultaron significativamente menores en todos los tratamientos con respecto al control, siendo los lotes de Cu-Zn, Zn-Pb-Cu y Zn-Pb los más afectados, en ese orden, tanto en largo ($F=38.82$, $P<0.0001$) como en ancho ($F=19.27$, $P<0.0001$) (Fig. 21).

Por otra parte, el número de rizoides de los gametofitos sólo fue significativamente menor en el tratamiento de Zn-Pb con respecto al control, el resto presenta aproximadamente el mismo número de rizoides ($F=6.73$, $P<0.0001$); en Zn-Cu se tuvo una n menor que el resto de los tratamientos y no presenta diferencias significativas, a pesar de que tiende a ser similar a Zn-Pb. Sin embargo, el largo de los rizoides es menor para la mayoría de gametofitos, excepto en los individuos expuestos a Cu-Zn y Zn-Pb-Cu ($H=27.53$, $P=0.0003$) (Fig. 21).

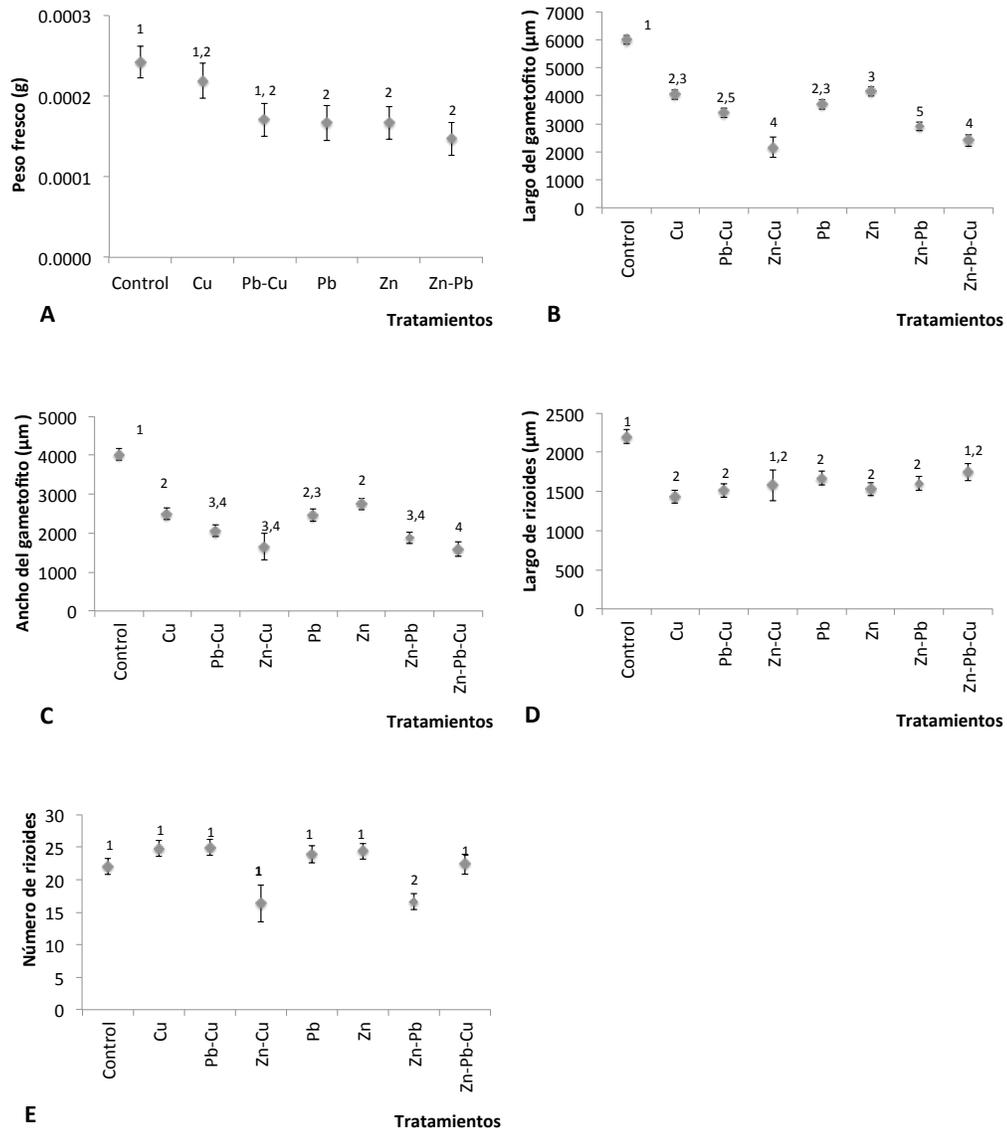


Figura 21. Parámetros morfométricos de gametofitos de *A. capillus-veneris*, en diferentes concentraciones combinadas de Pb, Cu y Zn, equivalentes al jale Santa María. Peso fresco (g) en A; largo y ancho del gametofito (μm) en B, C; largo (μm) y número de rizoides en D, E. Los datos para el largo de rizoides se obtuvieron con una $n=102$ en A, $n=108$ en B y C, $n=216$ en D y $n=107$ en E. Se muestra la media \pm el error estándar. La numeración en las gráficas indica la significancia respecto al control y entre los tratamientos, mediante ANOVA de una vía con $p<0.05$, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.

8.2.4. Detección de Zn y Pb en tejidos

a) Ubicación in situ de los metales pesados

Por medio de la tinción con rodizonato se detectó la presencia de Pb^{+2} en pocas células rizoidales y de clorénquima, generalmente en áreas cercanas a la costa del gametofito. Como en el caso del Zn, al combinar el Pb con los otros metales la tinción fue cada vez menor que cuando el gametofito fue expuesto únicamente a Pb. (Fig. 22).

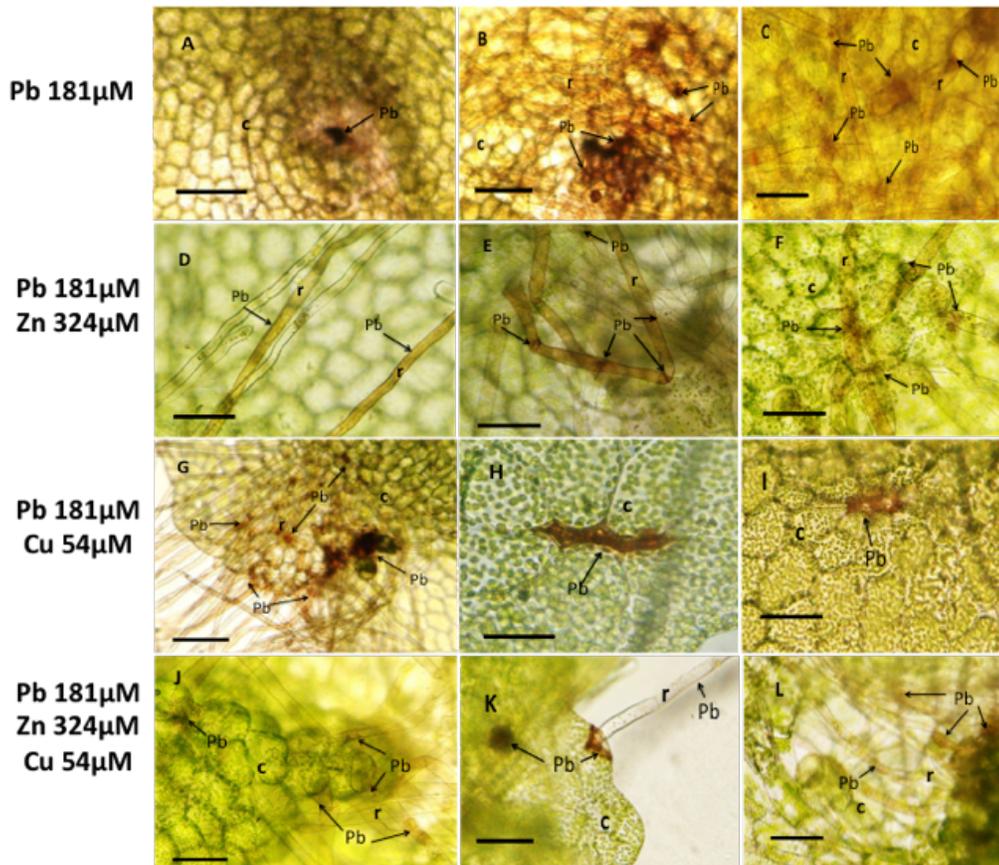


Figura 22. Ubicación de Pb en rizoides (r) y clorénquima (c) de los gametofitos (en color pardo-rojizo), generalmente acumulados en estructuras de tipo vacuolar y paredes, expuestos a $Pb(NO_3)_2$ 181 μM . Rizoides en B, C, D, E, F, G, J, K, L y clorénquima en A, B, H, I, J. Barra = 0.2 en A, B, G; =0.1 en C, D, E, F, J, K, L; =0.05 en H, I.

La detección de Zn^{+2} , a través de la solución de ditizona, reveló que el elemento se deposita principalmente en los rizoides de los gametofitos y, en menor cantidad, en el tejido fotosintético. Al combinar el Zn con Pb o Cu, los gametofitos almacenaron menor cantidad de Zn, y en el tratamiento con los tres elementos, hubo mínima tinción, es decir, poco Zn (Fig. 23).

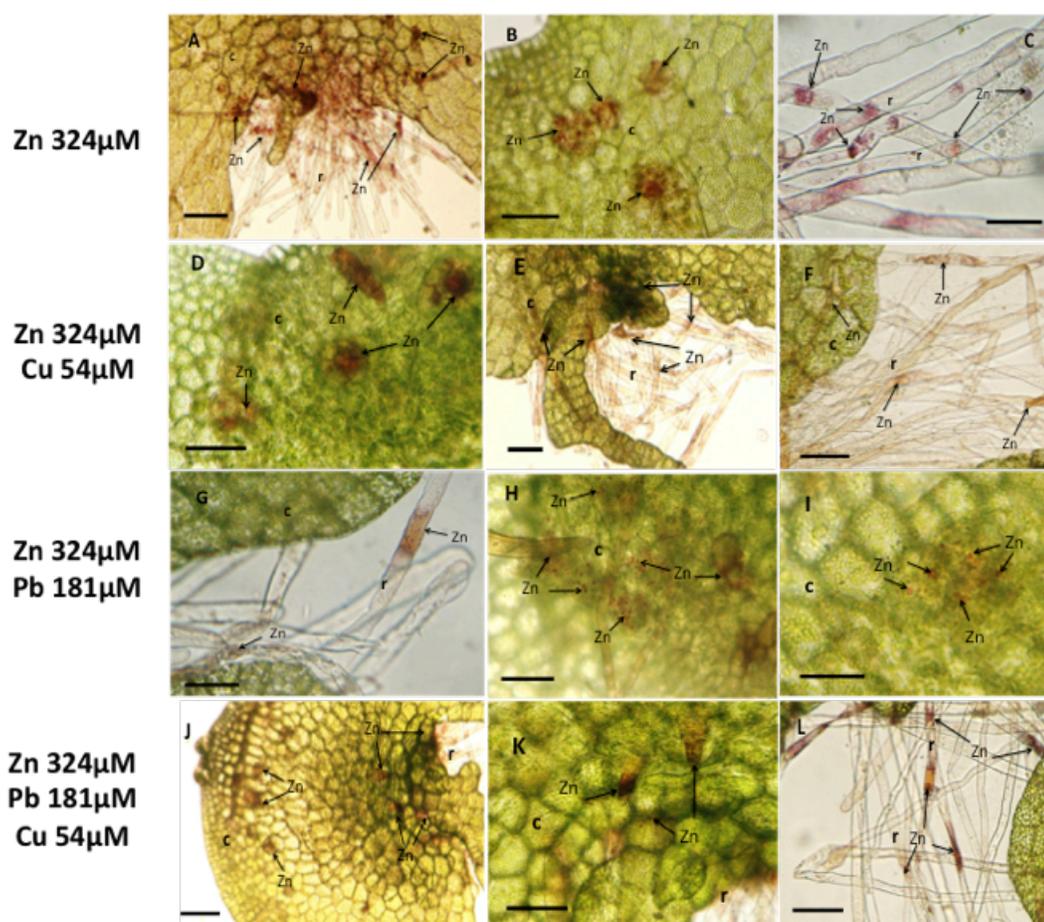


Figura 23. Ubicación de Zn^{+2} en rizoides (r) y clorénquima (c) de gametofitos detectados con ditizona (rosa-rojo), acumulado en estructuras vacuolares y paredes celulares, expuestos a $ZnCl_2$ en combinación con Pb y Cu. Rizoides en A, C, E, F, G, L y clorénquima en A, B, D, H, I, J, K. Barra =0.3mm en A,J; =0.1 en B,D,E,F,H,K, L; =0.05 en C, G, I.

8.3. Índice de tolerancia

El índice de tolerancia, muestra que no hay una relación directa entre los parámetros morfométricos y el incremento en la concentración de Cu, Pb y Zn; de manera que en las concentraciones bajas, generalmente disminuye la tolerancia con respecto al control, pero conforme se incrementa la cantidad de metal, aumenta dicho valor e incluso, en algunos casos, supera al control (Cuadro 15).

Cuadro 15. Índice de tolerancia (IT) a metales pesados con base en parámetros morfológicos (medias) de los gametofitos de <i>Adiantum capillus-veneris</i> L.											
Tratamiento (μ M)		Peso fresco		Largo gametofito		Ancho gametofito		Número rizoides		Largo rizoides	
		(g)	IT (%)	μ m	IT (%)	μ m	IT (%)	n	IT(%)	μ m	IT (%)
CONTROL		0.00070	100	5313	100	3474	100	21.3	100	1993	100
COBRE	13	0.00061	90.9	3479	65.5	2247	64.7	19.7	92.9	1630	81.8
	30	0.00053	78.6	3787	71.3	2502	72.0	19.2	90.3	1835	92.1
	54	0.00086	99.4	4047	76.2	2750	79.2	17.1	80.5	1593	80.0
	66	0.00056	83.2	4869	91.6	3332	95.9	18.4	86.5	1937	97.2
	77	0.00046	69.0	3813	71.8	2495	71.8	20.9	98.4	1753	88.0
ZINC	81	0.00047	69.7	3372	63.5	2233	64.3	17.4	81.8	1843	92.5
	161	0.00028	42.3	3503	65.9	2186	62.9	14.9	70.2	1693	85.0
	324	0.00035	52.6	4464	84.0	2720	78.3	16.3	76.7	2199	110.4
	411	0.00043	63.7	3427	64.5	2180	62.8	19.0	89.6	1710	85.8
	463	0.00027	39.9	2619	49.3	1534	44.2	16.6	78.3	1343	67.4
PLOMO	45	0.00038	57.1	3025	56.9	2096	60.3	16.0	75.1	1281	64.3
	91	0.00033	48.8	4982	93.8	3102	89.3	13.8	65.1	1914	96.0
	181	0.00023	34.8	3618	68.1	2194	63.2	14.2	66.6	2158	108.3
	226	0.00044	65.9	38845	73.1	2263	65.1	13.6	64.1	1590	79.8
	257	0.00035	52.4	3034	57.1	1988	57.2	14.6	68.7	1414	70.9
ZINC COBRE	54	---	---	2159	36.0	1653	41.1	16.3	74.2	1582	71.8
	324										
PLOMO COBRE	54	0.00017	70.3	3387	56.5	2058	51.2	25.1	114.2	1513	68.7
	91										
ZINC PLOMO	324	0.00015	60.7	2914	48.6	1886	46.9	16.9	76.7	1601	72.6
	91										
ZINC COBRE PLOMO	324	---	---	2401	40.0	1595	39.6	22.4	101.8	1749	79.3
	54										
	91										

(---) valor no registrado

9. DISCUSIÓN

La presencia de altas concentraciones de metales pesados en el suelo, a causa de la actividad minera, trae consigo cambios en sus características físicas y químicas, evitando así el establecimiento de especies vegetales. Se sabe que la zona de estudio presenta suelo de tipo calcisol (pH alcalino), pero el suelo tomado a 50 m del jale Santa María, donde se establece *A. capillus-veneris*, indica que su pH es de 7.18. Debido a los procesos de oxidación causado por la presencia de metales, este suelo tiene poca cantidad de materia orgánica y arcilla, baja capacidad de campo y retención de agua; asimismo, la acidificación del suelo puede favorecer la movilidad de elementos tóxicos, su biodisponibilidad y acumulación en plantas establecidas en la zona contaminada (Ortiz-Bernad *et al.*, 2007; INEGI, 2009; Shah *et al.*, 2010).

Ante condiciones de estrés por metales pesados, las plantas generan respuestas para aminorar los efectos negativos a diferentes niveles de organización; sin embargo, procesos fisiológicos como la germinación, el crecimiento y la reproducción, pueden ser alterados (Manara, 2012). En *A. capillus-veneris*, observamos que la germinación de esporas en los tratamientos con Pb es menor que el control a partir de 181 μ M hasta 257 μ M, pero su sobrevivencia se incrementa; esto indica que los pocos gametofitos que se desarrollaron toleran a concentraciones mayores a Pb 181 μ M.

Las esporas expuestas a Cu, tienen menor proporción de germinación conforme se incrementa la concentración del metal, a excepción del medio con Cu 77 μ M; no obstante, la sobrevivencia es mayor conforme se incrementa la concentración de Cu.

Al igual que en Pb, una baja proporción de gametofitos puede desarrollarse exitosamente en concentraciones mayores a 30 μM . En el caso del Zn, a partir de 81 μM , el porcentaje de germinación disminuye gradualmente, pero la sobrevivencia es mayor, incluso que el control, a excepción de los gametofitos expuestos a Zn 324 μM que muestran baja sobrevivencia.

En Zimapán, Hgo., el suelo está contaminado por los tres metales (Pb 54 μM , Cu 91 μM y Zn 324 μM), por lo que la germinación de esporas y la sobrevivencia de gametofitos son afectadas. En *A. capillus-veneris* se determinó que cuando el Pb y Cu se encuentran presentes en el medio, la germinación disminuye 33.3% con respecto al control, pero del total de gametofitos obtenidos sobreviven cerca del 50%. Por otro lado, al tener Pb y Zn en el medio, la germinación decrece 44.8% respecto al control, pero la sobrevivencia de gametofitos desarrollados es mayor al 75%. Asimismo, cuando el Cu y Zn están en el medio, la germinación es sólo de 5%, pero con una sobrevivencia del 50 % de los gametofitos registrados. Es probable que este evento se deba a que las concentraciones altas de Zn inhiben la captación de Cu (Shah *et al.*, 2010), metal que, en concentraciones mínimas, es necesario para procesos fisiológicos como la germinación y desarrollo.

Lo anterior también ocurre cuando, en el medio, están presentes los tres metales, pues las condiciones de estrés se incrementan y sólo el 0.5% de las esporas sembradas logra germinar; no obstante, la sobrevivencia equivale al 100% del total de gametofitos registrados, cifra mayor que el control. De acuerdo con Peralta *et al.* (2001), la germinación es el primer proceso que muestra los efectos de elementos

tóxicos en el suelo, por lo que es un parámetro para delimitar la tolerancia a metales pesados, al igual que la sobrevivencia.

La presencia de metales pesados en el suelo también puede retardar el crecimiento global de las plantas o en parte de ellas (Shanker *et al.*, 2005). Metales como el plomo, cobre, zinc, entre otros, tienen tal efecto a través de la generación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, las cuales por su constante oxidación dañan o degradan componentes celulares (Pandey *et al.*, 2005). Al observar el desarrollo de los gametofitos de *A. capillus-veneris* expuestos en el intervalo Cu 54 μ M a 77 μ M, se nota el retraso temporal en las etapas de desarrollo. Además, la proporción de gametofitos que logran pasar de una etapa a otra es cada vez menor, sobre todo para desarrollar estructuras reproductoras. Sin embargo, en el tratamiento de Cu 77 μ M, donde la proporción de gametofitos maduros es similar al control.

Por otro lado, en los tratamientos con Zn, el desarrollo de los gametofitos se retrasa de 1 semana más que en Cu conforme se incrementa la concentración, y pocos individuos expuestos a Zn, incluso a la concentración más baja (81 μ M), logran madurar. Asimismo, en los tratamientos de Pb 181 μ M a 217 μ M, el crecimiento se retrasa de 1 a 3 semanas, y la proporción de gametofitos maduros es muy baja respecto al control.

En general, la combinación de Zn-Pb y Zn-Pb-Cu en las concentraciones equivalentes a las reportadas en la zona de estudio, son las que más afectan el desarrollo de los gametofitos, pues se retrasa de tres o cuatro semanas, por tanto,

hasta la semana 9, los individuos se encontraban aún en crecimiento cordiforme. Pese a la baja cantidad de gametofitos maduros, es importante considerar que la mayoría de los gametofitos homospóricos pueden ser bisexuales y autofertilizarse, lo que puede permitir ser especies colonizadoras y pioneras; aún cuando la densidad poblacional sea baja, la producción de esporofitos puede ser exitosa (Ranker *et al.*, 1996). Además, las poblaciones tolerantes a metales pesados, normalmente, son capaces de tolerar factores edafo-climáticos adversos (Becerril *et al.*, 2007), incrementando así su capacidad de establecimiento en zonas contaminadas.

De acuerdo con Shanker *et al.* (2005), la presencia de metales pesados en el suelo también puede retardar el crecimiento global de las plantas o en parte de ellas, y metales como el Pb, Cu y Zn, entre otros, tienen tal efecto a través de la generación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, las cuales, por su constante oxidación, dañan o degradan componentes celulares (Pandey *et al.*, 2005). En algunas plantas, el Cu puede limitar la captura de potasio (K) en las hojas e inhibir la fotosíntesis a través de la acumulación de carbohidratos que retardan el crecimiento celular (Alaoui-Sosse *et al.*, 2004). El peso fresco tiende a disminuir conforme se incrementa la concentración de Pb desde 45 μM , al igual que en Zn, a partir de 81 μM ; al exponerse a Cu no es afectado el peso, puesto que los gametofitos sobrevivieron a Cu 77 μM y mantuvieron su biomasa. En los tratamientos de Cu-Pb y Zn-Pb, la biomasa de los gametofitos es menor que en el resto de los tratamientos, mostrando que la presencia de los metales en combinación, tiene mayor efecto negativo en el peso de los individuos.

Asimismo, el tamaño (largo y ancho) de los gametofitos en los tratamientos con baja concentración de Cu (13 μM), Pb (81 μM) y Zn (45 μM), es menor que en el control. Sin embargo, al incrementar las concentraciones de estos metales, los gametofitos alcanzan un tamaño similar al control; pero, a partir de Cu 77 μM , Zn 411 μM y Pb 257 μM , los individuos nuevamente tienden a ser más pequeños. La combinación de metales, también afectan el tamaño de los gametofitos, por lo que en todos los tratamientos combinados sobreviven individuos de menor tamaño que el control. Por lo anterior, cabe mencionar que el sistema fotosintético es muy sensible a la toxicidad de los metales pesados, afectándolos directa o indirectamente mediante la inhibición de la actividad enzimática del ciclo de Calvin (Linger *et al.*, 2005). Al bajar los niveles de fotosíntesis, la producción de biomasa también es afectada (Bishnoi *et al.*, 1993). Un síntoma de toxicidad por metales pesados en *A. capillus-veneris*, fue el cambio en la coloración de los gametofitos, de verdes a hialinos, igual a lo observado en *Azolla*, aunado a la baja productividad de biomasa (Arora *et al.*, 2006) como en lo obtenido en *A. capillus-veneris* en el presente estudio.

En angiospermas, los órganos de la planta que se encuentran en contacto directo con los contaminantes del suelo son las raíces, y pueden mostrar cambios en su patrón de crecimiento (Baker y Walker, 1989). En el caso de los helechos, los rizoides presentes en la fase gametofítica son la estructura análoga, debido a que cumplen con funciones similares a la raíz; además de que el cuerpo del gametofito también se encuentra en contacto directo con el sustrato. En *A. capillus-veneris*, el número de rizoides en los tratamientos con Cu no fue afectado, a diferencia del

tratamiento con Zn que reduce el número de dichos órganos en 81 μM y hasta 324 μM , pero en Zn 441 μM no hubo alteración en los rizoides, aunque no toleran concentraciones mayores. Por otro lado, en todos los tratamientos con Pb, los gametofitos presentaron una menor cantidad de rizoides, así como al combinar Zn 324 μM y Pb 91 μM (Zn-Pb). El decremento en el número de rizoides es a causa del efecto tóxico de los metales (Shah *et al.*, 2010). Cuando se combinan los tres metales, el número de rizoides es similar al control, lo que indica que es un mecanismo de respuesta que le permite inmovilizar (estabilizar) y acumular los metales, principalmente en los rizoides, evitando daños en el resto de la planta (Núñez *et al.*, 2004).

El largo de los rizoides es de gran importancia para contrarrestar los efectos de los metales y también es afectado por la toxicidad de dichos elementos (Shah *et al.*, 2010). Los efectos negativos en este parámetro, se pueden observar en los gametofitos expuestos a Pb 45 μM y 257 μM , pues en el rango intermedio (91-226 μM), los rizoides se muestran tolerantes debido a que su longitud no es afectada. En presencia de Zn, el largo de los rizoides se mantiene similar al control cuando la concentración es menor a 463 μM , y en los tratamientos con Cu, no hay efectos negativos en dicho parámetro morfológico, mostrándose tolerante a Cu 77 μM . Sin embargo, en las condiciones de campo con los tres metales (Zn-Pb-Cu) y en la combinación Cu-Zn, la longitud de los rizoides no es afectada. La alteración en el crecimiento de los rizoides, puede estar relacionar con la inhibición de la división celular causada por los metales como menciona Fiskesjo (1997), de manera que el

número de rizoides y su longitud pueden considerarse como un indicador importante de tolerancia a metales pesados (Han *et al.*, 2007).

Los cambios en las características morfológicas y patrones de desarrollo se deben, principalmente, a la absorción de metales en las plantas (Oliver, 1997), ya que la actividad fisiológica se centra en contrarrestar los efectos de los metales, ya sea excluyéndolos o acumulándolos en formas menos nocivas (Kabata-Pendias, 2000). En los gametofitos de *A. capillus-veneris*, se ubicó al Cu, Pb y Zn, principalmente, al interior de las células rizoidales y quelado en componentes de las paredes celulares. Esto se debe a que los metales pueden incorporarse en los rizoides, generalmente, por intercambio catiónico, facilitado por la propiedad hidrofílica de la pared celular, la cual influye en el transporte de metales vía apoplasto o simplasto. Algunos metales, como el Pb, pueden quedar en la pared celular al interactuar con la lignina o la celulosa (Navarro Aviñó *et al.*, 2007).

En la costa y alas del gametofito, el Pb y Zn se encontraron en las paredes celulares de clorénquima y en estructuras de tipo vacuolar. De acuerdo a Navarro Aviñó *et al.*, (2007), los metales son estabilizados dentro de la célula a través de ligandos tales como aminoácidos, ácidos orgánicos y péptidos (fitoquelatinas), que permiten reducir su toxicidad y concentración en el citoplasma, aún sin ser eliminados. Lo anterior, sugiere que los gametofitos de *A. capillus-veneris* responden de esta forma ante los metales (Pb y Zn), mediante la estrategia de acumulación que Baker (1981) lo señala para las plantas en general. Además, la tolerancia implica la inmovilización de los

metales en los rizoides y paredes celulares de sus tejidos; es decir, la captura interna del elemento tóxico (Clemens, 2006).

Por otra parte, al incrementarse la concentración tanto de Pb como de Zn, el área de tinción (técnica con rodizonato de sodio y ditizona) en clorénquima y en rizoides, fue más evidente, lo que implica que, la captura de metales se incrementa con el aumento en la concentración en el medio externo. Greger (1997), encontró que tal relación se debe a que los metales encontrados en el tejido causan saturación y ésta depende de la velocidad con la que se captura el metal, esto en una dicotiledónea. Sin embargo, al combinar los metales, los gametofitos de *A. capillus-veneris* presentaron una menor acumulación en sus tejidos (cualitativamente), y la mayor parte restringida a los rizoides, principalmente en el tratamiento Zn-Cu-Pb. Por lo tanto, es posible inferir que, en este caso, el mecanismo de tolerancia es por exclusión, pues evita el paso de los metales a la parte aérea y, como consecuencia, mantiene baja biomasa (Baker, 1981), lo cual concuerda con los datos obtenidos para Zn-Cu-Pb.

El Índice de Tolerancia (IT), nos permite comparar la respuesta a los metales en cada uno de los parámetros morfométricos con respecto al control y el comportamiento de dichos valores depende de la concentración de Cu, Zn y Pb. El IT muestra que los metales pueden afectar ciertos caracteres, pero se compensa con otros que no son alterados; es decir, el daño no es total. La respuesta de los gametofitos al estrés por metales pesados se basa en una complicada red de transducción de señales que es activada al detectar la presencia de metales pesados

y los efectos pueden variar en torno a las concentraciones de los mismos (Manara, 2012). Sin embargo, si nos enfocamos en los efectos de todos los parámetros analizados bajo concentraciones equiparables de los metales, Pb 91µM, Cu77µM y 81µM, podemos sugerir que el Zn y Pb son los metales que mayor efecto tienen con respecto al control, siendo el primero más agresivo.

A manera de síntesis, la tolerancia de los gametofitos a los metales y sus combinaciones, la podemos observar en el cuadro 15, donde se observa que los gametofitos toleran mayores concentraciones de Pb que Zn, pues es mayor el efecto en procesos como la germinación, el desarrollo, el tamaño y el número de rizoides. Al parecer, Cu es el metal que menos toleran los gametofitos, sin embargo, en condiciones naturales es un micronutriente, lo que indica que pueden tolerar más veces que la cantidad que necesitan fisiológicamente. Los estudios realizados sobre metales en gametofitos son pocos, Kamachi *et al.* (2005) documentan la capacidad que tienen los gametofitos de *Athyrium yokoscence* para tolerar Pb 10µM, mientras que *A. capillus-veneris* tolera, en general, hasta 257 µM.

Cuadro 15. Tolerancia de los gametofitos de *A. capillus-veneris* con base en los caracteres fisiológicos y morfológicos evaluados.

Caracteres evaluados	Pb (µM)	Cu (µM)	Zn(µM)	Combinaciones
Germinación	<181	77	<81	Pb-Zn > Pb-Cu > Zn-Cu > Zn-Pb-Cu
Sobrevivencia	257	<77	463	Pb-Cu y Zn-Pb > Zn-Cu > Zn-Pb-Cu
Desarrollo	<181	77	<81	Pb-Cu y Zn-Pb > Zu-Cu ≈ Zn-Pb-Cu
Peso fresco	<45	77	<463	Zu-Cu ≈ Zn-Pb-Cu
Tamaño	<257	<77	<81	Pb-Cu > Zn-Pb > Zn-Cu ≈ Zn-Pb-Cu
Largo de rizoides	<257	77	<463	Zn-Cu ≈ Zn-Pb-Cu > Pb-Cu y Zn-Pb
Número de rizoides	<45	77	<81	Zn-Cu, Pb-Cu y Zn-Pb-Cu > Zn Pb

Las adaptaciones fisiológicas de las plantas metalófitas pueden originarse directamente por la exposición a suelos contaminados, pero dependen, en primer término, de la variabilidad genética disponible en las poblaciones vegetales. Cuando los ajustes fisiológicos y morfológicos de las plantas son graduales y reversibles ante cambios en el ambiente, se dice que la población se está aclimatando (Punshon y Dickinson, 1997).

Es posible que, como consecuencia de las presiones selectivas ejercidas por las altas concentraciones de metales pesados, los mecanismos fisiológicos de tolerancia, estén evolucionando al interior de la población estudiada de *A. capillus-veneris*, probablemente, esté presentando cambios morfofisiológicos que le permitan adaptarse, a largo plazo, a las condiciones dadas por la presencia de estos metales pesados.

10. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo, permiten inferir que:

- La baja proporción de germinación y el desarrollo de los gametofitos de *A. capillus-veneris*, disminuyen conforme se incrementa las concentraciones de los metales; sin embargo, la sobrevivencia muestra un efecto contrario.
- El peso y el tamaño (largo y ancho) de los gametofitos son más afectados por los metales que la longitud y número de rizoides.
- Los gametofitos tienen la capacidad de acumular Pb, Cu y Zn en sus tejidos y estructuras, principalmente en rizoides.
- Los gametofitos son más tolerantes a Pb que a Cu y Zn, en concentraciones equiparables; sin embargo, al estar Cu y Zn en el medio provocan efectos negativos mayores al Pb.
- *Adiantum capillus-veneris*, puede tolerar hasta concentraciones de Pb 257 μM , Cu 77 μM y Zn 463 81 μM por separado, con menos gametofitos y más desarrollo lento que el control, pero con alto porcentaje de sobrevivencia y caracteres morfológicos adecuados.

Adiantum capillus-veneris, probablemente, está pasando por el proceso de aclimatación-tolerancia a zonas contaminadas con Pb, Cu y Zn (como en el jale Santa María) y este estudio permite un conocimiento más amplio de la respuesta de los gametofitos ante dichos metales pesados. Asimismo, es importante considerar, a futuro, estudios similares al presente para *A. capillus-veneris* establecido en una

zona sin contaminantes, para contrastar lo obtenido en este trabajo; así como estudios sobre el efecto de los metales pesados en esporofitos de esta especie.

11. LITERATURA CITADA

- Alaoui-Sosse B., P. Genet, F. Vinit-Dunand, M. L. Toussaint, D. Epron y P.M. Badot. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166: 1213–1218.
- Armienta M.A., L. K. Ongley, R. Rodríguez, O. Cruz, H. Mango y G. Villaseñor. 2008. Arsenic distribution in mesquite (*Prosopis laevigata*) and huizache (*Acacia farnesiana*) in the Zimapán mining area, México. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*, 8: 1–7.
- Arora A. S., S. Saxena y D. K. Sharma. 2006. Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22: 97–100.
- Arrú, L., S. Rognoni, M. Baroncini, P. Medeghini Bonatti y P. Perata. 2004. Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica*, 140: 33 - 38.
- Baker A. J. M. y P. L. Walker. 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1: 7–17.

- Baker, A. J. M. 1981. Accumulators and Excluders-Strategies in the Response of Plants to Heavy-Metals. *Journal Plant Nutrition*, 3: 643-654.
- Becerril J. M., O. Barrutia, J. I. García Plazuala, A. Hernández, J. M. Olano y C. Garbisu. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, 16: 50-55.
- Bishnoi N. R., L. K. Chugh y S. K. Sawhney. 1993. Effect of chromium on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Journal Plant Physiology*, 142: 25–30.
- Castro, N. A. y R. Moreno. 2004. Biosíntesis del grupo hemo. *Revista de Educación Bioquímica*, 23: 9-106.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707–1719.
- Díaz-Garduño M., A. Díaz–Osornio, R. Carrillo–González y M. C. González–Chávez. 2005. Plantas que se desarrollan en áreas contaminadas con residuos mineros. En: González–Chávez M.C., Pérez–Moreno J. y Carrillo–González R. Eds. *El Sistema Planta–Microorganismo–Suelo en Áreas Contaminadas con Residuos de Minas*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp. 9–33.
- Disponible en <http://www.upp.edu.mx/simci/memorias/BIO/BTA03.pdf>
- Duarte Zaragoza, V. M. 2013. Origen y distribución espacial de metales pesados en suelos de Zimapán, Hidalgo. Tesis de Doctorado. Postgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

- Evanko, C.R. y D. A. Dzombak. 1997. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater. *Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC) "E" Series Report*. 53 pp.
- Fiskesjo G. 1997. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wang, W., Gorsuch, J. W., y Hughes, J. S. *Plants for environmental studies*. Lewis Publisher. Boca Raton, Florida, USA. pp. 307–333.
- Gentry, A. H. 1982. Patterns of neotropical plant species diversity. *Evolutionary Biology*, 15: 1–84.
- Gómez-Bernal, J. M., J. Santana-Carrillo, F. Romero-Martín, M. A. Armienta-Hernández, O. Morton-Bermea, E. A. Ruiz-Huerta. 2010. Plantas de sitios contaminados con desechos mineros En Taxco, Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87:131-133.
- Gómez-López, C. C., J. I. Guerrero-Gutiérrez, L. Pacheco, M. González-Ávila y J. L. Blasco. 2011. Asimilación y acumulación de manganeso por *Equisetum hyemale* var. *affine* en condiciones hidropónicas. Simposio Iberoamericano Multidisciplinario de Ciencias e Ingenierías.
- González, S. 1997. Respuesta vegetal al estrés metálico. *Agricultura Técnica*, 57: 42-49.
- Greger M. 1997. Willow as phytoremediator of heavy metal contaminated soil. Proceedings of the 2nd International conference on element cycling in the environment. Warsaw. pp 167–172.
- Guala S. D., F. A. Vega, E. F. Covelo. 2010. The dynamics of heavy metals in plant-soil interactions. *Ecological Modelling*, 221:1148-1152.

- Han Y. L., H. Y. Yuan, S. Z. Huang, Z. Guo, B. Xia y J. Gu. 2007. Cadmium tolerance and accumulation by two species of *Iris*. *Ecotoxicology*, 16: 557–563.
- Hernández-Acosta, E., E. Mondragón-Romero, D. Cristóbal-Acevedo, J. E. Rubiños-Panta y E. Robledo-Santoyo. 2009. Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un Jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 15: 109-114.
- Hernández, M. 2009. Estudio de la acumulación de plomo y cadmio por *Asphodelus fistulosus* L. y *Brassica juncea* L. para fitorremediar jales. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología UAM-I. Disponible en:
<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=14781&docs=UAMI14781.pdf> 24/03/2012.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2005. Información geográfica del estado de Hidalgo. Disponible en:
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.aspx?e=13&c=124&s=geo>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2009. Zimapán, Hidalgo. Clave geoestadística 13084. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. 9 pp.
- Kabata-Pendias, A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 432 pp.
- Kamachi, H., I. Komori, H. Tamura, Y. Sawa, I. Karahara, Y. Honma, N. Wada, T. Kawabata, K. Matsuda, S. Ikeno, M. Noguchi, y H. Inoue. 2005. Lead tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*. *Journal of Plant Research*, 118:137-145.

- Klekowski, E. J. Jr. 1969a. Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 62: 347-359.
- Klekowski, E. J. Jr. 1969b. Reproductive biology of the Pteridophyta. III. A study of Blechnaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 62: 361-377.
- Linger P., A. Ostwald y J. Haensler. 2005. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biology Plant*, 49: 567–576.
- Lorea, F. y R. Riba. 1990. Guía para la recolección y preparación de ejemplares para herbario de Pteridofitas. Consejo Nacional de la Flora de México, A. C. 12 pp.
- Manara, A. 2012. Plant responses to heavy metal toxicity. Capítulo 2. *In: Furini, A. Plants and heavy metals*. Springer Briefs in Biometals. pp. 27-53.
- Marczenko, Z., M. Balcerzak. 1998. Spectrophotometric Methods for Inorganic Analysis. Wydawnictwo Naukowe PWN, Varsovia, Polonia. pp. 526.
- McIntyre, T. 2003. Phytoremediation of heavy metals form soils. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 78: 97-123.
- Mejía, J., I. Carrizales, V. M. Rodríguez, M. E. Jiménez-Capdeville y F. Díaz-Barriga. 1999. Un método para la evaluación de riesgos para la salud en zonas mineras. *Salud Pública de México* 41, supl 2: S132-S140.
- Mickel, J. T. y A. R. Smith. 2004. The pteridophytes of México. *Memories of the New York Botanical Garden*, 88:1-1044.
- Moreno Tovar, R., J. Téllez Hernández y M. G. Monroy Fernández. 2012. Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, zinc y

- cadmio en el distrito minero de Zimapán, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28: 203-218.
- Moreno-Sánchez, R. y S. Devars 1999. Abundancia de los metales pesados en la biósfera. In: Cervantes, C. y Moreno, R. *Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos*. A. G. T. Editor, S. A. México. 1-10.
- Navarrete, H., B. León, J. González, D. K. Avilés, J. S. Lecaro, F. Mellado, J. Alban y B. Øllgaard. 2006. Helechos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. pp. 385-411.
- Navarro Aviñó, J. P., I. Aguilar Alonso y J. R. López-Moya, 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 2: 1-17.
- Nayar B. K. Y S. Kahur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *The Botanical Review*, 3: 295-396.
- Núñez, R.L., Y. Meas, R. Ortega y E. J. Olgúin. 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 70-82.
- Oliver, M.A. 1997. Soil and human health. *European Journal Soil Science*, 48: 573–592.
- Ortega-Larrocea, M. P., B, Xoconóstle-Cázares, I. E. Maldonado-Mendoza, R. Carrillo-González, J. Hernández-Hernández, M. Díaz Garduño, M. López-Meyer, L. Gómez-Flores y M.C.A. González-Chávez. 2010. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, Hidalgo México. *Environmental Pollution*, 158:1922-1931.

- Ortiz-Bernad, I., J. Sanz García, M. Dorado Valiño y S. Villar Fernández. 2007. Informe de vigilancia tecnológica. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Universidad de Alcalá. Dirección General de Universidades e Investigación pp. 108.
- Pandey V., V. Dixit y R. Shyam. 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*, 61:40–47.
- Peralta J.R., J. L. G. Torresdey, K. J. Tiemann, E. Gomez, S. Arteaga y E. Rascon. 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66: 727–734
- Prieto Méndez, J., C. A. González Ramírez, A. D. Román Gutiérrez y F. Prieto García. 2009. Contaminación y toxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 1: 29-44.
- Prieto–García F., H.J. Callejas, M. A. Lechuga, J. C. Gaytán y E. E. Barrado. 2005. Acumulación en tejidos vegetales de Arsénico provenientes de aguas y suelos de Zimapán estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, 17:129–135.
- Punshon T. y N. M. Dickinson 1997. Acclimatation of *Salix* to metal stress. *New Phytologist*, 37: 303-314.
- Ranker, T. A., C. E. C. Gemmill, P. G. Trap, A. Hambleton y K. Ha. 1996. Populations genetics and reproductive biology of lava-flow colonizing species of Hawaiian

- Sadleria* (Blechnaceae). In: Camus, J., Gibby, M. y R. J. Johns. *Pteridology in Perspective*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 581-598.
- Sahuquillo, A., Rigol, A., & Rauret, G. 2003. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 152-159.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2007. Norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial. Segunda sección. 7-8.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2008. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales.
- SGM-CGMINERÍA. 2011. Panorama minero del Estado de Hidalgo. <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf> 26/03/2012.
- SGM-CGMINERÍA. 2013. Anuario estadístico de la minería mexicana 2012. Edición 2013. 552 pp.
- SGM. 2014. Panorama minero del Estado de Hidalgo. <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf>
- Shah, F. R., N. Ahmad, K. R. Masood, J. R. Petalta-Videa y F.D. Ahmad. 2010. Heavy metal toxicity in plants. In: Ashraf, M., Ozturk, M. y Ahmad, M. S. A. *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer Science Business Media B.V, pp. 71-97.
- Shanker, A. K., C. Cervantes, H. Loza-Tavera y S. Avudainayagam. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31:739–751.

- Smith, A., K. M. Pryer, E. Schuettpelz, P. Korall, H. Schneider and P. G. Wolf. 2006. *Taxon*, 55:705-731.
- Srivastava, M., J., Santos, P., Srivastava, y L.Q. Ma, 2010. Comparison of arsenic accumulation in 18 fern species and four *Pteris vittata* accessions. *Bioresource Technology*, 101: 2691–2699.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Tercera edición. Pub. Sinauer. 623 pp.
- Tung, G. y P. Temple. 1996. Uptake and Localization of Lead in Corn (*Zea mays* L.) Seedlings, a Study by Histochemical and Electron Microscopy. *Science of the Total Environment*, 188: 71–85.
- Velasco, J., A. de la Rosa, G. Solórzano y T. L. Volke-Sepúlveda. 2004. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. SEMARNAT-INE. 43 pp.
- Vidal Álvarez, M. 2009. Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Plomo (Pb^{2+}), en sistemas continuos de Fitorremediación con *Salvinia minima*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología A.C.
- Volke-Sepúlveda, T., J. A. Velasco y A. de la Rosa Pérez. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT) 144 pp.
- Yu-Lin, H., Y., Hai-Yan, H., Su-Zhen, G. Zhi, X. Bing y G. Jiguang 2007. Cadmium tolerance and accumulation by two species of *Iris*. *Ecotoxicology*, 16: 557-563.
- Zhao, F. J., S.J. Dunham and S.P. McGrath. 2002. Rapid report. Arsenic hyperaccumulation by different ferns species. *New Phytologist*, 156: 27-31.