

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPÓLITANA



**Respuesta antioxidante de *Acacia farnesiana* (L.) Willd
bajo condiciones de estrés por arsenato**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Presentada por:

Ilhuice Nemi Alcántara Martínez

Comité tutorial:

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

Co-Directora

Dr. Fernando Rivera Cabrera

Co-Director

Dra. Leticia Buendía González

Asesora

Noviembre 2013

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Residuos sólidos del Departamento de Biotecnología, y en el laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario 290649, en el periodo 2011-2013.

Los miembros del jurado de examen, designado por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis **“Respuesta antioxidante de *Acacia farnesiana* (L.) Willd bajo condiciones de estrés por arsénico”** presentada por Ilhuice Nemi Alcántara Martínez quien realizó la disertación pública el 25 de noviembre de 2013, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Presidenta:

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Secretario:

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

Vocal:

Dra. Leticia Buendía González

Vocal:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

COMITÉ TUTORIAL

Co-Directora:

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda
Departamento de Biotecnología. UAM-I.
tv_s@xanum.uam.mx

Co-Director:

Dr. Fernando Rivera Cabrera
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I.
fr_c@xanum.uam.mx

Asesora:

Dra. Leticia Buendía González
Facultad de Ciencias. UAEM.
lety_sax@yahoo.com.mx

AGRADECIMIENTOS

A la UAM-Iztapalapa, particularmente al posgrado de Maestría en Biología Experimental por haberme permitido continuar con mis estudios, y al CONACYT por el apoyo económico otorgado. Agradezco el apoyo incondicional que me dieron mis directores y asesora para la realización de este trabajo de tesis. A la Dra. Tania Volke Sepúlveda, quien mostró siempre paciencia y dedicación hacia mi formación profesional, su enseñanza y amistad me han permitido desarrollar la disciplina de la investigación. Al Dr. Fernando Rivera Cabrera, con quien conté en todo momento para sacar adelante el trabajo, sus ideas y consejos siempre fueron inspiradores para mi vida profesional. Gracias al apoyo, consejos, ideas y dedicación de la Dra. Tania y el Dr. Fernando fue posible darle forma a esta tesis. A la Dra. Leticia Buendía González, por sus atinados comentarios y aportaciones a este trabajo, así como su apoyo incondicional y el tiempo que se tomó para la revisión de esta tesis.

Agradezco además, a mis profesores de maestría: a la Dra. Laura Pérez por sus enseñanzas, su atención y por mostrarse siempre paciente a mis dudas y al Dr. Fernando Díaz, gracias por el tiempo dedicado a mis preguntas, cuales respuestas siempre mejoraron este proyecto. Agradezco también Al Dr. Mariano Gutiérrez por sus comentarios y preguntas constructivas hacia este proyecto, y por su buen humor.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Residuos Sólidos del departamento de Biotecnología, y del laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: Asmaveth, Blanca, Caliope, Olivia, Areli, César, Néstor, Pepe, Víctor, Denisse, Yoali, Rayn, Juan, Omar y a todos los chicos y chicas de servicio social y diversas estancias: Alma, Rocío, Sandra, Yeny, Briseida, Sheila, Isela, Marco, Román. A todos ellos, por su continuo apoyo siempre que lo necesité. Sobre todo gracias a Blanca, Caliope, Asmaveth, César, Néstor y Pepe por los bonitos y divertidos momentos compartidos, que además hicieron más ligeros los momentos difíciles. Finalmente, a todos mis compañeros del posgrado de Biología Experimental, en especial a Memo y Luis Ángel, por su amistad.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

**Dedico esta tesis a mis padres,
Salvador Alcántara y Juliana Rosario Martínez,
a mis hermanos, Antar, Arendi y Yoalli
y a mi pareja Mario Arias García**

Agradezco y dedico esta tesis con cariño a mis padres: Salvador Alcántara y Juliana Rosario Martínez por apoyarme siempre incondicionalmente e impulsarme en mi formación académica y en mis retos personales, sobre todo les agradezco por respetar, apoyar y compartir en todo momento mis decisiones. A mis hermanos Antar, Arendi y Yoalli, particularmente por estar a mi lado desde el inicio de mi estancia en el D.F, por su apoyo en diversos aspectos, que me permitieron seguir siempre adelante en mis estudios. A mi cuñada Athena y a mi cuñado Abraham que son parte de mi familia y agradezco su tiempo dedicado y apoyo todo este tiempo.

A mi pareja Mario Alberto Arias por su tiempo, su atención, apoyo y cariño en los momentos buenos y en los momentos difíciles, te agradezco por ser mi colega, amigo y pareja, y te dedico con mucho cariño sobre todo la culminación de ésta tesis, de la cual fuiste siempre partícipe. Además a mis suegros Alberto e Irene y a mi cuñada Nancy, quienes me han apoyado de manera importante en el aspecto personal y profesional.

RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide considerado como uno de los elementos más tóxicos para los sistemas biológicos. Este elemento puede alterar la composición química del suelo y causar toxicidad en los organismos que lo absorben. Una alternativa para disminuir la concentración y/o biodisponibilidad del As en un suelo, es la fitorremediación, que implica el uso de plantas y los microorganismos asociados para remediar sitios contaminados, a través de la bioacumulación en tallos y hojas (fitoextracción) o mediante su retención en raíces o la reducción de su forma química (fitoestabilización). Para que esto sea posible, las plantas deben mostrar tolerancia, es decir, poseer mecanismos que les permitan disminuir los efectos tóxicos del As cuando éste es bioacumulado en los tejidos ($>5 \text{ mg} \cdot \text{Kg biomasa}^{-1}$). El objetivo de este trabajo fue evaluar, bajo condiciones *in vitro*, la relación entre la capacidad de bioacumulación de As, la tolerancia a arsenato (AsO_4^{3-}) y la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasas) y destoxificantes (glutación S-transferasas) de *Acacia farnesiana* L. (Willd.). Cuando *A. farnesiana* se expuso a $80 \text{ mg AsO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$, bioacumuló altas concentraciones de As tanto en tallos (hasta $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg PS}^{-1}$) como en raíces (hasta $4378 \text{ mg As} \cdot \text{kg PS}^{-1}$) sin inhibir su crecimiento, lo cual indica una notable tolerancia. Durante 60 días de exposición a esta dosis, se registró una mayor de lipoperoxidación en las raíces con respecto a los tallos. La actividad enzimática CAT y GST, particularmente en las raíces, fue estimulada por efecto de la exposición a AsO_4^{3-} durante 60 días. Se encontró una fuerte correlación (Pearson = 0.898) entre la concentración de As bioacumulado en las raíces y la actividad GST, lo que sugiere su relación con la tolerancia de la especie al As.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a metalloid considered as one of the most toxic elements for biological systems. This element can alter the chemical composition of the soil and cause toxicity in the organisms that absorb it. Phytoremediation is a feasible option to reduce the concentration and/or bioavailability of As in the soil. This technique involves the use of plants and the associated microorganisms to remediate polluted sites through the bioaccumulation of toxic elements in the aboveground tissues (phytoextraction). Another strategy involves the element retention in the roots or a reduction in its chemical form (phytostabilization). Thus, for phytoremediation purposes, plants must be tolerant, which means the activation of intracellular mechanisms that allow them to reduce the toxic effects of the As bioaccumulation ($>5 \text{ mg}\cdot\text{Kg biomass}^{-1}$). The aim of this work was to evaluate, under *in vitro* conditions, the relation between the As bioaccumulation ability, the arsenate (AsO_4^{3-}) tolerance and the activity of antioxidant and detoxificant enzymes of *Acacia farnesiana* L. (Willd.). When *A. farnesiana* was exposed to $80 \text{ mg AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$, bioaccumulated high As concentrations in shoots (up to $1000 \text{ mg As}\cdot\text{kg DW}^{-1}$) and roots (up to $4380 \text{ mg As}\cdot\text{kg DW}^{-1}$) without inhibiting the plant growth, indicating a remarkable tolerance. During 60 days of exposure to $80 \text{ mg AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$, *A. farnesiana* shows a higher level of lipoperoxidation in the roots than that found in shoots. The enzyme activity of both CAT and GST, particularly in the roots, was stimulated by effect of the AsO_4^{3-} exposure for 60 days. A strong correlation (Pearson = 0.898) was found among the concentration of As bioaccumulated in the roots and the GST activity, suggesting the involvement of this enzyme in the tolerance of *A. farnesiana* against the As toxicity.

ABREVIATURAS

As	Arsénico
CAT	Catalasa
EC	Extracto crudo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EPT	Elementos potencialmente tóxicos
GST	Glutación S-transferasa
G-POX	Guayacol peroxidasa
LPO	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdeído
POX	Peroxidasas
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta precisión acoplada a espectrometría de masas
GR	Glutación reductasa
MDAR	Monodehidro-ascorbato reductasa
DHAR	Dehidro-ascorbato reductasa
FT	Factor de translocación
FBA	Factor de bioacumulación
BHT	Hidroxitolueno butilado
GSH	Glutación reducido
PCs	Fitoquelatinas
EAA	Espectrometría de absorción atómica
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 <i>Elementos potencialmente tóxicos</i>	5
2.2 <i>Fitorremediación de suelos contaminados por EPT</i>	5
2.3 <i>Toxicidad por EPT en las plantas</i>	6
2.4 <i>Mecanismos de tolerancia a EPT en plantas</i>	8
2.5 <i>Acacia farnesiana (L.) Willd</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	20
5.1 <i>Objetivo General</i>	21
5.2 <i>Objetivos Particulares</i>	21
6. MATERIALES Y METODOS	22
6.1 <i>Estrategia y diseño experimental</i>	23
6.2 <i>Material biológico</i>	24
6.3 <i>Etapa 1: Obtención in vitro de plántulas de A. farnesiana</i>	24
6.4 <i>Etapa 2: Determinación de la CI₅₀ de arsenato</i>	25
6.5 <i>Etapa 3: Cinética de respuesta a una dosis sub-CI₅₀</i>	26
6.6 <i>Cuantificación del crecimiento de A. farnesiana y obtención de la CI₅₀</i>	26
6.7 <i>Análisis de As</i>	27
6.8 <i>Obtención de extractos crudos</i>	29
6.9 <i>Determinación de lipoperoxidación</i>	30
6.10 <i>Determinación de actividades enzimáticas</i>	30
6.11 <i>Análisis estadístico</i>	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 <i>Caracterización de As en suelo y plantas del sitio de muestreo</i>	34
7.2 <i>Etapa 1: Obtención in vitro de plántulas de A. farnesiana</i>	35
7.3 <i>Etapa 2: Determinación de la CI₅₀ de arsenato</i>	37
7.4 <i>Etapa 3: Cinética de respuesta de A. farnesiana a una dosis sub-CI₅₀</i>	43
8. CONCLUSIONES.....	56
9. PERSPECTIVAS	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de diferentes tratamientos de desinfestación evaluados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>A. farnesiana</i> . Después de la inmersión en detergente comercial, las semillas se trataron bajo condiciones asépticas y se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril después de cada solución.....	25
Tabla 2. Concentración total de As en muestras compuestas superficiales de suelo, y en semillas, tallo y hojas de plantas adultas de <i>A. farnesiana</i> , en Zimapán Hidalgo.....	34
Tabla 3. Longitud de tallos y raíces de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días.....	38
Tabla 4. Bioacumulación de arsénico en tallos y raíces de <i>A. farnesiana</i> expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. Se muestran los valores del Factor de Translocación y del Factor de Bioacumulación.....	42
Tabla 5. Cinética de longitud de tallos y raíces e índice de tolerancia (IT) de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 0 y $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} durante 60 días.....	44
Tabla 6. Factores de translocación (FT) y bioacumulación (FBA) de arsénico en plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a $80 \text{ mg L}^{-1} \text{AsO}_4^{3-}$ durante diferentes tiempos. También se muestran las concentraciones totales de As bioacumulado por planta para cada tiempo.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de destoxificación de As en plantas, que involucra su absorción y secuestro intracelular. El As es absorbido principalmente como As(V) y éste es reducido a As(III) por la arsenato reductasa (AR) utilizando glutatión (GSH) como sustrato. El As(III) se une al grupo -SH del GSH o de PCs en una reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) para formar complejos As-GS3 (As-GSH) o As-PC, respectivamente. Estos complejos son transportados y secuestrados en la vacuola.....	12
Figura 2. Estrategia experimental general. En los cuadros superiores se muestran las actividades realizadas en cada etapa del estudio, los cuadros intermedios indican los tratamientos y, en los cuadros inferiores, se muestran las variables de respuesta determinadas en cada caso.....	23
Figura 3. Plantas de <i>A. farnesiana</i> creciendo en una zona minera contaminadas con As, en Zimapán, Hidalgo.....	24
Figura 4. Criterios considerados para cuantificar la longitud de tallos más hojas (desde el meristemo del eje principal a la separación del tejido) y de raíces (de la separación del tejido al ápice de la raíz principal).....	27
Figura 5. Metodología general para la obtención de extractos crudos (EC). Después de la pulverización en nitrógeno líquido, todas las muestras se trataron a 4°C. El buffer utilizado y la velocidad de la centrifugación se modificaron con base en la determinación bioquímica a realizar. En los EC se determinaron actividades enzimáticas, proteína y la concentración de MDA	29
Figura 6. Efecto del pre-tratamiento de semillas de <i>A. farnesiana</i> sobre la germinación y contaminación después de 15 días de incubación en medio Murashige-Skoog. Pre-tratamientos: (1) EM - D - H ₂ SO ₄ (57%, 20 min); (2) EM - D - H ₂ SO ₄ (57%, 20 min) - NaClO (1.2%, 30 min); (3) EM - D - H ₂ SO ₄ (57%, 60 min); (4) EM - D - EtOH - NaClO (1.6%, 30 min); (5) EM - D - EtOH - NaClO (1.6%, 45 min). EM: escarificación mecánica; D: lavado con detergente comercial (1%, 30 min); EtOH: solución de etanol (70%, 30 seg).....	36
Figura 7. Plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas durante 45 días a diferentes concentraciones de AsO ₄ ³⁻ (mg·L ⁻¹).....	39

Figura 8. Producción de biomasa en tallos y raíces de <i>A. farnesiana</i> expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. Letras diferentes por tejido indican diferencias significativas (promedio \pm DE, n = 9).....	39
Figura 9. Índice de tolerancia de <i>A. farnesiana</i> expuesta a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. La línea punteada indica el valor considerado para la estimación de la Cl_{50} (Promedio \pm DE, n = 9).....	40
Figura 10. Producción de biomasa total (peso seco, PS) en plantas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 0 y 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} durante 60 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (promedios \pm error estándar, n = 9).....	44
Figura 11. Bioacumulación de As en tallos y raíces de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AsO_4^{3-} durante 60 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (promedio \pm DE, n = 3).....	45
Figura 12. Efecto del tiempo de cultivo y de la exposición a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} sobre la producción de malondialdehído en plántulas de <i>A. farnesiana</i> . Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, n =3).....	58
Figura 13. Actividad G-POX en tallos y raíces de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 0 y 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AsO_4^{3-} durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, n =3).....	50
Figura 14. Actividad CAT en tallos y raíces de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 0 y 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AsO_4^{3-} durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, n =3).....	51
Figura 15. Efecto del tiempo de cultivo y de la exposición a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} en la actividad GST de tallos y raíces de <i>A. farnesiana</i> durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, n =3).....	53
Figura 16. Correlación entre la actividad específica GST y la cantidad total de As bioacumulado en raíces de plántulas de <i>A. farnesiana</i> expuestas a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AsO_4^{3-}	54
Figura 17. Actividad específica relativa CAT, G-POX y GST en tejido de tallos y raíces de <i>A. farnesiana</i> expuesta durante 60 días a 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} (promedio \pm DE, n =3).....	55

1. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un metaloide poco abundante en la corteza terrestre (0.0005 %), sin embargo, puede llegar a ser un contaminante inorgánico, ya que puede provocar alteraciones químicas en el suelo y toxicidad en los sistemas biológicos que lo absorben. Debido a lo anterior, la acumulación de As en suelo representa un peligro latente. La exposición crónica a este elemento se relaciona con afecciones de la piel, diabetes, cáncer, alteraciones neurológicas y cardiovasculares (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

La liberación de As al medio ambiente se debe a procesos naturales como la erosión de las rocas y emisiones volcánicas o a actividades antropogénicas. Aunque el As es poco abundante, es un metaloide ampliamente distribuido en la corteza terrestre ya que forma parte de más de 200 minerales (Armienta *et al.*, 2008) y se caracteriza por mostrar propiedades intermedias entre metales y no metales, por ejemplo, es mejor conductor de electricidad y calor que los no metales, pero nunca como los metales. Debido a sus características, actualmente se conocen distintas aplicaciones del As en la industria farmacéutica, química, metalúrgica, minera, electrónica, y además en la producción de herbicidas, insecticidas y pesticidas (Armienta *et al.*, 2008).

En México, la principal fuente que contribuye a la acumulación de As en suelo es la actividad minera. Por más de tres siglos, además de contribuir a la industria del sector primario, la explotación minera también ha contribuido a la contaminación de suelos con elementos tóxicos (Pb, Zn, As, Se, Cd, y Hg). Dichos elementos se derivan de los procesos de extracción (método de flotación o hidrometalurgia) de minerales de interés, no son recuperables y por el contrario, se acumulan en los residuos mineros (o jales). En el caso del As, se le encuentra asociado en minerales de zinc-plomo, cobre, oro y con mayor frecuencia en minerales con azufre (Volke Sepúlveda *et al.*, 2005).

La concentración de As en suelo puede aumentar de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Adriano, 1986) hasta concentraciones que superan los $30000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Garg y Singla, 2011; Hernández, 2009). Aunque se trata de un contaminante inorgánico (no degradable), el As puede ser biotransformado por bacterias, hongos y plantas (Vithanage *et al.*, 2011), entendiendo biotransformación como la adición de grupos químicos que alteran su reactividad con biomoléculas (proteínas, lípidos, DNA). Una tecnología que aprovecha esta capacidad de algunas plantas, es la fitorremediación, la cual se basa en la bioacumulación de elementos tóxicos en los tejidos vegetales (hojas y tallos o raíz). Para que la bioacumulación sea posible, las plantas deben mostrar mecanismos que biotransformen los elementos tóxicos para

estabilizarlos en las vacuolas y mecanismos que contrarresten el daño que puedan causar en la estructura y funcionamiento de la célula (Verbruggen *et al.*, 2009).

El uso de plantas para remediar suelos contaminados con elementos tóxicos se exploró desde los años 50 y en la última década, la fitorremediación comenzó a expandirse, demostrando hasta la fecha ser una alternativa efectiva y económicamente rentable para la limpieza *in situ* de suelos contaminados con metales y metaloides (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

En comparación con los métodos fisicoquímicos tradicionales utilizados para la remediación de suelos contaminados con metales y metaloides, tales como el lavado, la remoción, transporte y confinamiento, la fitorremediación representa una tecnología de aplicación más económica, amigable con el ambiente y factible para grandes terrenos contaminados, particularmente con As (Baker *et al.*, 1994). Otra ventaja del uso de la fitorremediación, es su impacto regenerativo en aquellos lugares donde se aplica, a través de la restauración del paisaje, ya que la capacidad de extracción de las plantas puede mantenerse activa durante muchos años debido a que depende, en gran parte, del crecimiento vegetal en el sitio (Baker *et al.* 1994).

Actualmente, existen estudios enfocados en el mejoramiento de los mecanismos implicados en la tolerancia de las plantas a elementos tóxicos, así como en encontrar nuevas especies con potencial para la fitorremediación. Parte de las características que constituyen este potencial involucra una alta tasa de crecimiento y producción de biomasa (Mendez y Maier, 2008). En este sentido, *A. farnesiana* es un arbusto o árbol que crece y cumple su ciclo de vida en lugares contaminados con altas concentraciones de As (Armienta *et al.*, 2008; Puga *et al.* 2006). Adicionalmente se ha propuesto a *A. farnesiana* como una especie potencialmente fitorremediadora de sitios contaminados con plomo y cadmio (Salas *et al.*, 2007; Solis-Ibarra 2009). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar, bajo condiciones *in vitro*, la tolerancia de *A. farnesiana* a altas concentraciones de As, así como el efecto del tiempo de exposición sobre la actividad de enzimas implicadas en la defensa intracelular de la planta, bajo condiciones de estrés por As. En el contexto de la fitorremediación, en el presente trabajo se muestra una revisión bibliográfica del efecto tóxico que tiene la presencia del As en las células vegetales y de los diferentes mecanismos de defensa que algunas plantas han desarrollado para crecer en lugares contaminados con As.

2. ANTECEDENTES

2.1 Elementos potencialmente tóxicos

Los elementos potencialmente tóxicos (EPT) incluyen metales y metaloides que son tóxicos para los sistemas biológicos debido a sus propiedades y su concentración (Lal, 2010). Uno de ellos es el arsénico (As), que puede formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y acumularse en las células (Volke- Sepúlveda *et al.* 2005).

La acumulación de EPT en el suelo ocasiona contaminación en diferentes niveles tróficos. Estos elementos derivan de diversas fuentes naturales o antropogénicas, principalmente de residuos de la industria minero-metalúrgica, tratamientos de aguas residuales, las guerras y entrenamientos militares, el uso de fertilizantes agrícolas, actividades de navegación, y desechos domésticos. Los EPT pueden encontrarse como contaminantes de suelos agrícolas, industriales y en sitios cercanos a minas. En concentraciones elevadas, los EPT pueden alterar la composición química del suelo y causar toxicidad en los organismos que los absorben (Lal, 2010).

2.2 Fitorremediación de suelos contaminados por EPT

Debido a la elevada toxicidad de varios EPT (Pb, Cd, Cr, Zn, As, Al) para los organismos, particularmente del As, se han propuesto diversas tecnologías que permitan la remoción y/o estabilización de estos elementos en suelos contaminados, ayudando además a prevenir su entrada en la cadena trófica. Es importante señalar que los metales y metaloides no se degradan, pero se pueden estabilizar o concentrar para eliminarlos de un sitio. Entre los métodos empleados para la remediación de suelos contaminados con EPT se encuentran los métodos fisicoquímicos tradicionales (solidificación/estabilización, lavado, excavación y entierro) y los métodos biológicos, particularmente la fitorremediación (Volke *et al.*, 2005).

La fitorremediación implica el uso de plantas y los microorganismos asociados a su rizósfera para remediar matrices contaminadas a través de la remoción, transformación, degradación o estabilización de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Meagher, 2000; Mench *et al.*, 2009). La fitorremediación de suelos contaminados con EPT puede lograrse a través de: (i) la acumulación en los tejidos aéreos de la planta, a través del mecanismo conocido como fitoextracción; y (ii) la inmovilización a través de su precipitación en la zona radicular, su acumulación en raíces o su incorporación a lignina o humus, en un mecanismo conocido como fitoestabilización (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Para que estos fenómenos sean posibles, la planta debe tener mecanismos de defensa que le permitan contrarrestar la

toxicidad que el contaminante puede ocasionar en las células (tolerancia). Por ejemplo, la activación de mecanismos antioxidantes que eliminan el exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas bajo condiciones de estrés, la producción de fitoquelatinas, y la transformación de los metales y metaloides a especies químicas menos tóxicas y/o solubles.

2.3 Toxicidad por EPT en las plantas

Independientemente del proceso de fitorremediación para el cual puede aplicarse una especie vegetal, las plantas y microorganismos involucrados deben ser tolerantes al contaminante en particular (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). La toxicidad de un EPT hacia una planta varía principalmente en función de la especie, el elemento específico, su concentración y forma química, así como de la composición química del suelo, contenido de materia orgánica y pH. También se sabe que la toxicidad de ciertos elementos depende de la sinergia con otros metales, lo cual puede ocurrir en el suelo (Nagajyoti *et al.*, 2010).

Los EPT pueden entrar a las plantas mediante el sistema de absorción de cationes esenciales, que incluye diferentes moléculas transportadoras de metales que sirven como quelantes. Algunos metales esenciales para las células son: Cu, Zn, Fe, Mn y Mo, ya que participan en reacciones redox y como cofactores de enzimas. No obstante, si estos elementos llegan a absorberse en concentraciones altas, pueden producir toxicidad en las células vegetales, de igual forma que la incorporación de elementos que no tienen alguna función biológica, tales como Cd, Pb, Hg, Tl, As, Cr, Sb y Bi (Babula *et al.* 2008). La acumulación de estos elementos en los tejidos genera daños en la estructura celular mediante la inhibición o alteración de funciones enzimáticas (Pilon-Smits, 2005), debido a que interaccionan con las proteínas por su afinidad hacia grupos sulfhidrilo y carboxilo (Sharma y Dietz, 2008), o debido a que incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), conduciendo a estrés oxidante.

2.3.1 Propiedades y fitotoxicidad del As

El As es el metaloide tóxico más ampliamente distribuido en el ambiente, en donde se libera a través de cenizas por combustión de carbón, el uso de pesticidas y herbicidas que lo contienen, y principalmente mediante residuos generados de actividades como la minería y metalurgia (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). En los suelos, el As puede encontrarse desde concentraciones por debajo de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Adriano, 1986) hasta concentraciones de $30000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, en suelos contaminados (Garg y Singla, 2011). Dependiendo de la concentración y, en general, de la composición del suelo, la concentración de As que puede acumularse en

las plantas es variable. Se han reportado valores de 0.01 a 1.5 mg As kg⁻¹ de peso seco (PS) en plantas que crecen en suelos no contaminados (Kabata-Pendias, 2001), mientras que en plantas que crecen en suelos contaminados se han encontrado valores superiores a 6000 mg·kg PS⁻¹ (Visoottiviseth *et al.*, 2002). De acuerdo con Kabata-Pendias (2001), cuando una planta presenta valores de As superiores a 5 mg·kg⁻¹ en las hojas, puede mostrar síntomas de toxicidad por el metaloide, pero la cantidad de As bioacumulado en los tejidos vegetales está en función de la especie vegetal y de su capacidad para tolerarlo.

El As se puede encontrar en su forma orgánica o inorgánica. En su forma inorgánica, el As puede encontrarse con valencia -3, +3 y +5, pero las formas iónicas prevalentes son el As(V) y el As(III) (Vithanage *et al.*, 2011). Aunque la forma iónica del As depende de las condiciones redox del suelo, el arsenato (As(V)) es la forma predominante en condiciones aeróbicas (Vithanage *et al.*, 2011). Estructuralmente, el As(V) tiene similitud con el fósforo, característica que le permite ser absorbido por las raíces mediante transportadores de fosfato y remplazar este elemento esencial en los sistemas enzimáticos que participan en el metabolismo celular de las plantas. Por ejemplo, en reacciones de fosforilación incluyendo la síntesis de ATP, lo que conduce a inhibición del crecimiento y a la interrupción de la fotosíntesis y respiración; no obstante, también puede estimular el metabolismo secundario (Babula *et al.* 2008).

El arsenito (As(III)) se absorbe principalmente a través de acuaporinas relacionadas con el transporte de glicerol. El As(III) puede unirse a los grupos sulfhidrilo de proteínas, causando alteración de la estructura e inhibición de actividades enzimáticas (Verbruggen *et al.* 2009). Aunque esta forma iónica también es tóxica, el As(III) puede ser conjugado con moléculas de bajo peso molecular que faciliten su transporte y compartimentación en la vacuola, reduciendo los efectos tóxicos en las células. Tanto el arsenato como el arsenito pueden translocarse de las raíces a la parte aérea (tallos y hojas), y el grado de transporte dependerá de la respuesta específica de cada planta (Ali *et al.*, 2009).

Otra de las consecuencias de la exposición de una planta a una condición de estrés, como la contaminación por con EPT, es la sobreproducción de ERO. La acumulación de ERO es una condición extremadamente tóxica para las células y, si su concentración no es controlada, conduce a una condición conocida como estrés oxidante (Sharma y Dietz, 2008). Se sabe que tanto el As(V) como el As(III) pueden ocasionar estrés oxidante (Verbruggen *et al.*, 2009).

2.3.2 Sobreproducción de ERO y daño oxidante

El estrés oxidante se define como el efecto tóxico provocado por especies químicas altamente reactivas producidas durante la reducción del oxígeno molecular (O_2) en los organismos aerobios, que se conocen como ERO (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Las ERO son producidas durante la transferencia de electrones al O_2 en procesos celulares, como la fotosíntesis, fotorrespiración y respiración celular. Estas moléculas pueden o no ser radicales libres e incluyen al ión superóxido ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e ion hidroxilo ($\bullet OH$), entre otros. Las ERO tienen una vida media corta y pueden oxidar diversas biomoléculas como lípidos de membranas, proteínas y ADN. Aunque su sobreproducción y acumulación puede tener graves consecuencias en las células, en bajas concentraciones, las ERO actúan en procesos de señalización que regulan procesos biológicos, como el crecimiento y desarrollo, la muerte celular programada, las respuestas a hormonas y a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos. Por lo anterior, la regulación de los niveles de ERO mediante su producción y remoción, es importante porque permiten la señalización celular sin causar estrés oxidante (Konigsberg, 2008).

En condiciones normales de crecimiento, la producción de ERO en los cloroplastos de las células vegetales es baja ($240 \mu M \text{ seg}^{-1}$ de O_2^- , y $0.5 \mu M \text{ seg}^{-1}$ de H_2O_2), pero en respuesta a diversos tipos de estrés que alteran la homeostasis celular, la concentración de ERO aumenta en los cloroplastos a $240-720 \mu M \text{ seg}^{-1}$ de O_2^- , y $5-15 \mu M \text{ seg}^{-1}$ de H_2O_2 (Konigsberg, 2008). Dentro del estrés biótico o abiótico pueden mencionarse condiciones de sequía, salinidad, radiación, temperatura, estrés mecánico, carencia de nutrientes, luminosidad intensa, estrés por patógenos o por contaminantes como los EPT.

Varios estudios indican que el principal mecanismo de fitotoxicidad por EPT, se relaciona con una sobreproducción de ERO, la cual modifica las defensas antioxidantes y provoca daños oxidantes en macromoléculas y cambios en la homeostasis del calcio y sulfhidrilos (Sharma y Dietz, 2008; Verbruggen *et al*, 2009). Uno de los mecanismos a través del cual los organismos toleran la presencia de un contaminante, es justamente la activación de sistemas de defensa que suprimen o eliminan ERO (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012).

2.4 Mecanismos de tolerancia a EPT en plantas

De acuerdo con Baker (1987), las plantas pueden resistir el estrés por metales pesados y metaloides debido a dos estrategias principales: (i) exclusión y (ii) tolerancia. La primera

estrategia se refiere a una protección externa que evita la toxicidad celular por el EPT, esta protección puede deberse a una reducción en la absorción del contaminante, o bien, a la unión del elemento a la pared celular. La tolerancia se refiere a mecanismos intracelulares específicos que se activan cuando un EPT entra a la célula, lo cual reduce la toxicidad por el EPT y permite a la planta crecer normalmente (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). En el caso de EPT, la tolerancia involucra de manera general dos mecanismos. Uno de ellos es el secuestro intracelular, es decir, la compartimentación de EPT en las vacuolas mediante transportadores del tonoplasto. El otro mecanismo se basa en el incremento de la actividad de enzimas y moléculas antioxidantes que, en conjunto, disminuyen o evitan el estrés oxidante generado por la sobreproducción de ERO. Además de los mecanismos mencionados, la tolerancia en las plantas también implica la activación de proteínas de reparación (chaperonas) que reparan el daño ocasionado por la toxicidad de EPT (Verbruggen *et al.*, 2009).

2.4.1 Secuestro intracelular de EPT

El secuestro intracelular de EPT se basa en la formación de complejos entre elementos tóxicos y ligandos de bajo peso molecular. Esta estrategia es importante en la detoxificación de EPT, ya que en forma de complejos, se facilita el transporte de los contaminantes hacia la vacuola, evitando su unión a enzimas y disminuyendo su efecto tóxico (Prasad *et al.*, 2010).

Un grupo de enzimas importante en la detoxificación de EPT son las glutatión S-transferasa (GST). En plantas se han identificado ocho clases de GST (Phi, Tau, Theta, Zeta, Lambda, DHAR, TCHQD y Microsomal), las cuales funcionan como heterodímeros, homodímeros o trímeros de subunidades (Edward y Dixon, 2005). La actividad de las GST está relacionada con la detoxificación de diversos citotóxicos endógenos y exógenos. Además, en plantas también se ha sugerido que las GST permiten el almacenamiento temporal o modulación de actividad de auxinas (Edwards y Dixon, 2005).

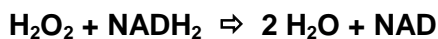
En el metabolismo celular normal, las GST están involucradas en el metabolismo de productos secundarios como antocianinas y ácido cinámico. En condiciones de diversos tipos de estrés, entre ellos, estrés por herbicidas, ataque de patógenos, y estrés por EPT, las GST participan en la detoxificación de elementos o compuestos citotóxicos mediante su conjugación con glutatión (GSH) o con fitoquelatinas (PCs), las cuales son polímeros de GSH (Marrs, 1996).

En el caso de estrés por EPT, las GST catalizan el ataque nucleofílico del átomo de sulfuro del GSH al centro electrofílico de metales o metaloides formando conjugados que son secuestrados en la vacuola o transferidos al apoplasto, pero no excretados como en el caso de los animales. Además de formar conjugados, las GST pueden tener actividad peroxidasa, contribuyendo en la destoxificación de peróxidos de lípidos o productos de la oxidación del ADN (Marrs, 1996).

2.4.2 Sistema antioxidante

La sobreproducción de ERO ocasionada por la toxicidad de los EPT puede disminuir o evitarse debido a un sistema antioxidante. Este sistema consiste en una compleja red de enzimas y moléculas que eliminan o reducen el exceso de ERO y mantienen la homeostasis celular (Lal, 2010). En las plantas, las moléculas antioxidantes más importantes implicadas, son el ascorbato (ASC) y el GSH. El ascorbato es el antioxidante hidrosoluble más abundante y poderoso que protege a las membranas mediante la reducción de la forma oxidada del α -tocoferol y por la eliminación directa de $\bullet\text{O}_2^-$ y $\bullet\text{OH}$; además es sustrato de la ascorbatoperoxidasa (APX), que cataliza la reducción de H_2O_2 . Por otra parte, el glutatión se considera la defensa más importante contra ERO inducidas por EPT, ya que está involucrado en funciones como el transporte y almacenamiento de azufre reducido, es precursor de las fitoquelatinas producidas en presencia de metales tóxicos, y puede unirse a EPT para su compartimentación en la vacuola, siendo un compuesto clave en el balance redox celular (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2011). En conjunto, la acción antioxidante del GSH y el ASC, ocurre a través de una serie de reacciones redox que conforman el ciclo de ascorbato-glutatión (Sharma y Dietz, 2008). El estado redox del GSH y el ASC se mantiene a través de las enzimas glutatión reductasa (GR), monodehidro-ascorbato reductasa (MDAR) y dehidro-ascorbato reductasa (DHAR).

Otras enzimas clave que actúan en la destoxificación de ERO, son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), y diversas peroxidases (POX) como ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxiredoxinas (PRX). Las POX son enzimas óxido-reductasas responsables de eliminar hidroperóxidos (H_2O_2 o peróxidos de ácidos grasos). En una reacción bisustrato, emplean moléculas específicas como agentes reductores para reducir a los peróxidos (Konigsberg, 2008):



El mecanismo catalítico de las peroxidasas, así como las moléculas reductoras pueden ser distintas (Konigsberg, 2008). La actividad de estas enzimas depende del estado redox de la célula, ya que las moléculas reductoras se oxidan durante la reacción de óxido-reducción y necesitan reestablecer continuamente su poder reductor. La actividad POX es frecuentemente analizada en estudios de estrés vegetal, particularmente de tolerancia a metales y metaloides. En tal caso, se ha observado que la actividad POX varía dependiendo de la especie vegetal, del elemento tóxico, de su concentración y del tiempo de exposición (Mishra *et al.*, 2008; Solis-Ibarra, 2009; Garg y Singla, 2011).

La CAT es otra enzima que metaboliza el H₂O₂ pero, a diferencia de las POX, la CAT utiliza como sustrato dos moléculas de H₂O₂, una como agente reductor y otra como agente oxidante en la misma reacción, por ello, su actividad no depende del estado redox celular (Garg y Singla, 2011):



La CAT es una de las enzimas más rápidas que existe, su eficacia (K_{cat}/K_m aproximadamente de 10^6 - $10^8 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$) indica que la enzima está limitada por la velocidad de difusión del sustrato (Konigsberg, 2008). Ya que el H₂O₂ difunde a través de los compartimentos celulares, la CAT está presente en cloroplastos, citosol, mitocondria y principalmente en peroxisomas. Su actividad protege a las plantas de diferentes condiciones de estrés que se generan de manera exógena o endógena, mediante la modulación de los niveles de H₂O₂ (Konigsberg, 2008).

De manera general, las enzimas CAT y POX catabolizan H₂O₂ y otros peróxidos a compuestos menos tóxicos para la planta, mientras que la SOD es la única enzima en las plantas que dismuta el $\cdot\text{O}_2^-$ en H₂O₂ y O₂. Isoformas de SOD (Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) y diversas POX (APX y PRX) se localizan en varios compartimentos celulares, mientras que la CAT está principalmente ubicada en peroxisomas. En una compleja red antioxidante, estas enzimas evitan o reducen una sobreproducción de ERO, que puede conducir a daño oxidante en condiciones de estrés.

2.4.3 Mecanismos de tolerancia al As

El grado de tolerancia de una planta a una condición específica de estrés depende de la especie e, incluso, del genotipo (Huang y Cunningham, 1996; McGrath *et al.*, 2002). Algunas plantas bioacumulan la mayor parte del As en tejidos fotosintéticos, y se les conoce como plantas hiperacumuladoras. Entre ellas, cabe resaltar al helecho *Pteris vittata*, para el cual se

ha reportado una bioacumulación cercana a $13000 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de As en los frondes (Ma *et al.*, 2001). Otras plantas tolerantes al As pueden bioestabilizar este metaloide a través de su inmovilización en las raíces (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Ambos fenómenos de tolerancia, implican la prevención y disminución del efecto tóxico del As, mediante un sistema antioxidante, y un sistema detoxificante.

Contrario a otros EPT, son pocos los estudios sobre la respuesta de las plantas a estrés por As. Actualmente se sabe que, al igual que el Cd, la respuesta celular al estrés puede desencadenarse por el cambio en la homeostasis de elementos esenciales o por el incremento de ERO (Verbruggen *et al.*, 2009). Como se explicó, el sistema antioxidante interactúa directamente con ERO para evitar daño oxidante, y se compone de moléculas (GSH, ASC) y la actividad de enzimas que metabolizan ERO, como SOD, CAT, y diversas peroxidasas.

Complementario al sistema antioxidante que regula los niveles de ERO, la detoxificación de As se relaciona con su secuestro en la vacuola, evitando de esta manera la exposición celular a su toxicidad (Figura 1). El secuestro intracelular de As involucra la participación de las enzimas arsenato reductasa (AR) y GST, cuya actividad se considera uno de los principales mecanismos en la detoxificación de As en plantas (Alí *et al.*, 2009).

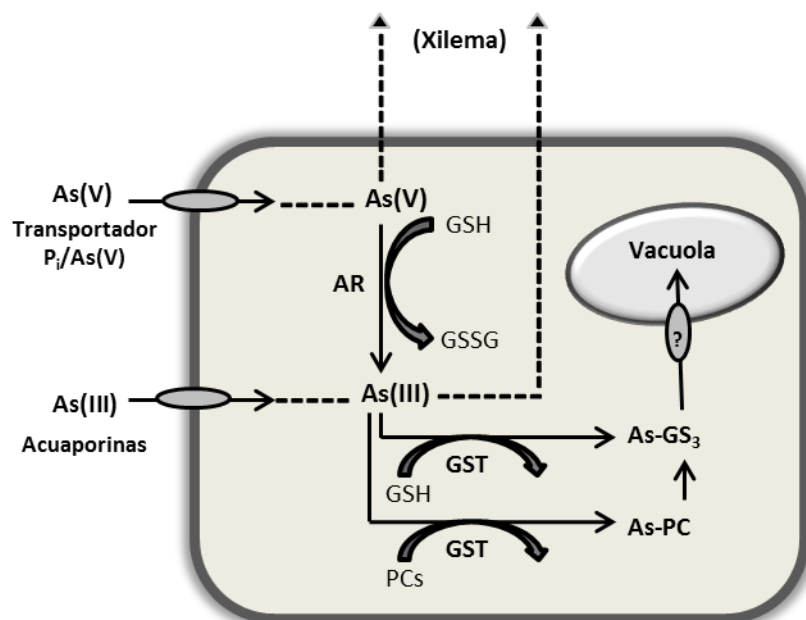


Figura 1. Mecanismo de detoxificación de As en plantas, que involucra su absorción y secuestro intracelular. El As es absorbido principalmente como As(V) y éste es reducido a As(III) por la arsenato reductasa (AR) utilizando glutatión (GSH) como sustrato. El As(III) se une al grupo -SH del GSH o de PCs en una reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) para formar complejos As-GS₃ (As-GSH) o As-PC, respectivamente. Estos complejos son transportados y secuestrados en la vacuola.

El As es absorbido principalmente como As(V) a través de transportadores de fosfato inorgánico (Pi), mientras que la entrada de As(III) ocurre a través de acuaporinas relacionadas con el transporte de glicerol . Una vez que el As(V) entra en las células de la raíz, éste puede reducirse rápidamente a As(III) por la AR. El As(III) puede formar complejos con fitoquelatinas (As-PC) o con glutatión (As-GS₃) en una reacción catalizada por la GST. Estos complejos pueden ser transportados al interior de la vacuola a través de transportadores ABC (proteínas de transporte activo) aún no definidos, o ser sustratos para la fitoquelatina sintasa (Verbruggen *et al.*, 2009), reduciendo de esta manera la liberación de As(III) desde las raíces hacia la rizósfera. La formación de dichos complejos es posible ya que el grupo funcional -SH de la cisteína en el glutatión y las fitoquelatinas tiene una alta afinidad por As(III) (Ali *et al.* 2009).

Como se mencionó, tanto el As(V) como el As(III) pueden translocarse a la parte aérea de una planta. Actualmente el mecanismo de este transporte aún no se comprende del todo, aunque varios estudios demuestran que debe ocurrir la conversión de A(V) a As(III) a través de la AR (Ali *et al.*, 2009; Hokura *et al.*, 2006), no hay un consenso general acerca de la especie iónica de As que se transporta de la raíz hacia el tallo. Por ejemplo, Pickering *et al.* (2006) y Zhao *et al.* (2003) determinaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), que el As es translocado a la parte aérea de *Pteris vittata* en forma de As(V) y es acumulado en los frondes como As(III). Por el contrario, otros autores sugieren que el As se transfiere de las raíces a los tallos en forma de As(III) (Duan *et al.*, 2005; Zhu y Rosen, 2009). Las diferencias en los resultados pueden atribuirse a las condiciones experimentales, como temperatura, humedad, intensidad lumínica y medios de cultivo, entre otras. Dichas condiciones podrían definir la translocación, incluso la conversión iónica del As, ya que se sabe que el transporte del As de las raíces a la parte aérea a través del xilema, depende de la presión y transpiración de las hojas, similar a la translocación de nutrientes y agua (Vithanage *et al.*, 2011).

En el caso particular del As, se ha reportado tolerancia en varias especies como *Holcus lanatus*, *Cystisus striatus* (Mehargy Macnair, 1992; Bleeker *et al.*, 2003), *Prosopis laevigata* (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009), *Acacia farnesiana* (Armieta *et al.*, 2008), así como en el helecho hiperacumulador de As *Pteris vittata* (Wang *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009). En *H. lanatus*, la tolerancia se atribuye a la supresión del sistema de absorción de fosfatos/As, lo que reduce la incorporación de As(V) a niveles que la planta puede detoxificar fácilmente (Meharg y Macnair, 1992). En *P. vittata* no se observaron síntomas de

toxicidad en altas concentraciones de As, presentando bajos niveles de peroxidación de lípidos y altas actividades SOD, CAT y APX (Srivastava *et al.*, 2005).

Estudios previos sobre la tolerancia de *A. farnesiana* a metales, indican que esta especie es tolerante a plomo (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011) y arsénico (Armieta *et al.*, 2008). Maldonado-Magaña *et al.* (2011), sugieren que *A. farnesiana* presenta dos mecanismos de defensa contra los efectos tóxicos del Pb, uno a través de la exclusión mediante la acumulación de más del 80% en las raíces, la cual se relaciona con la unión del Pb a la pared celular. El otro mecanismo se atribuyó a la tolerancia intracelular, ya que la especie creció de forma normal en concentraciones de hasta 500 mg·Pb L⁻¹, sin efectos significativos en la peroxidación de lípidos o en el contenido de glutatión. Este grupo además detectó bioacumulación de Pb en los tejidos aéreos y proponen que la capacidad de *A. farnesiana* para tolerar el estrés oxidativo generado por el Pb podría estar relacionado con el metabolismo del glutatión.

Por otro lado, Armieta *et al.* (2008) encontraron que *A. farnesiana*, tolera altas concentraciones de As (12.5-225 mg As·kg⁻¹). De acuerdo con sus resultados, enfocados al contenido de As en hojas, vainas y ramas, esta especie es tolerante al As pero no es hiperacumuladora, ya que no acumula concentraciones mayores de 1 g As·kg⁻¹ en su parte aérea (Brooks *et al.*, 1977). Para entender mejor el mecanismo de defensa que le permite a *A. farnesiana* crecer en suelos contaminados con altas concentraciones de As, es necesario realizar estudios sobre los efectos de este metaloide en los mecanismos de detoxificación celular.

2.5 *Acacia farnesiana* (L.) Willd

A. farnesiana (L.) Willd, comúnmente llamada huizache, es un arbusto o árbol pequeño caducifolio caracterizado por una copa esparcida y densa, ramas espinosas y flores fragantes. Es una especie de la familia *Fabaceae* que crece en climas cálidos y semicálidos donde las temperaturas anuales promedio varían entre 15 y 28°C. Se caracteriza por ser resistente a la sequía y prospera en una gran variedad de suelos, desde arcillas pesadas hasta arenas, y en un amplio rango de pH. Sus semillas son reniformes, de 6 a 8 mm de largo, de color pardo-amarillentas y pueden conservar su viabilidad durante 30 o más años bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y en recipientes cerrados y secos (Parrotta, 1992). Las semillas de *A. farnesiana* presentan una latencia física debido a una testa impermeable al agua (Rolston, 1978).

Por sus características de crecimiento, *A. farnesiana* se considera una planta útil para la reforestación de tierras secas degradadas, para evitar la erosión de suelos y ayudar a la estabilización de dunas arenosas (Vengadesan *et al.*, 2002). En México, *A. farnesiana* también tiene usos en la medicina tradicional; los extractos de las flores se utilizan en remedios para los dolores de cabeza y en el tratamiento de la indigestión, su fruto se usa para tratar la disentería e inflamaciones en la piel (Parrota, 1992). Cabe resaltar que Lin *et al.* (2009) demostraron la actividad citotóxica de terpenos y falvonoides extraídos de raíces de *A. farnesiana* contra cuatro líneas celulares de cáncer.

Otro aspecto muy importante de *A. farnesiana* es que crece y cumple con su ciclo de vida en lugares contaminados con EPT. En Hidalgo y Chihuahua, Armienta *et al.* (2008) y Puga *et al.* (2006) reportan plantas de *A. farnesiana* creciendo en zonas contaminadas con residuos mineros con diferentes concentraciones de As. Los niveles más altos de contaminación por As ($32000 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) se encontraron en Zimapán, Hidalgo. Los estudios realizados por Salas (2007) y Solis-Ibarra (2009), sugieren que *A. farnesiana* es una especie potencialmente fitorremediadora de sitios contaminados con plomo y cadmio.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del medio ambiente con EPT representa un problema de salud y económico. En el caso del As, la exposición crónica a este metaloide puede causar afecciones de la piel, cáncer, enfermedades cardio-vasculares y disturbios neurológicos. Una alternativa para la remediación de suelos contaminados por EPT es la fitorremediación, la cual presenta diversas ventajas sobre técnicas fisicoquímicas tradicionales. No obstante, para incrementar su efectividad es importante conocer los diversos mecanismos involucrados en dicho proceso, además de la búsqueda de nuevas especies vegetales tolerantes con capacidad para fitorremediar. En este sentido, la tolerancia de *A. farnesiana* a diversos EPT, permite considerarla una especie potencialmente fitorremediadora para suelos contaminados con elementos tóxicos.

Adicionalmente, *A. farnesiana* es una planta que presenta una alta producción de biomasa y un ciclo de vida favorable para dicho propósito. Por ello, en vías del desarrollo y mejoramiento de las técnicas de fitorremediación, en particular para suelos contaminados por As, es importante profundizar en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos implicados en la capacidad de esta especie para tolerar altas concentraciones de As, particularmente en los mecanismos antioxidantes y aquellos relacionados con la destoxificación de As en respuesta al estrés generado por la presencia de dicho EPT.

4. HIPÓTESIS

La tolerancia de *Acacia farnesiana* al estrés por As, así como su capacidad para destoxificarlo, dependen de la inducción de enzimas antioxidantes y destoxificantes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la relación entre la bioacumulación, la tolerancia y la actividad de enzimas antioxidantes y detoxificantes en *Acacia farnesiana* bajo estrés por arsenato (AsO_4^{3-}).

5.2 Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones particulares para la obtención *in vitro* de plántulas de *A. farnesiana*.
- Determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de arsenato para *A. farnesiana*.
- Evaluar el crecimiento, el daño oxidante y la respuesta de enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasa) y detoxificantes (glutación S-transferasa) en plántulas de *A. farnesiana* expuestas a una sub- CI_{50} de arsenato en función del tiempo.
- Relacionar la tolerancia y la capacidad de bioacumulación de As por *A. farnesiana* con el crecimiento vegetal, el daño oxidante y la respuesta de enzimas antioxidantes y detoxificantes.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Estrategia y diseño experimental

Para cumplir los objetivos de este trabajo se llevó a cabo un diseño experimental dividido en tres etapas (Figura 2). Durante la primera etapa, se establecieron las condiciones particulares para la escarificación/desinfestación de semillas de *Acacia farnesiana*, tales que permitieran un alto índice de germinación, bajo índice de contaminación y crecimiento vegetal adecuado. Una vez determinadas las condiciones de germinación, se produjeron plántulas de ~15 días de *A. farnesiana* bajo condiciones *in vitro*, las cuales se utilizaron en las siguientes etapas. En la segunda etapa, las plántulas de 15 días fueron trasplantadas a medio contaminado con diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} (0, 100, 250 y 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con el fin de obtener la concentración media inhibitoria (CI_{50}). Una vez definida la CI_{50} de arsenato para *A. farnesiana*, durante la tercera etapa del proyecto, se seleccionó una concentración por debajo de este valor para evaluar el efecto del tiempo de exposición a arsenato sobre el crecimiento, el daño oxidante (Lipoperoxidación), la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y POX) y detoxificantes (GST), y la bioacumulación de As.

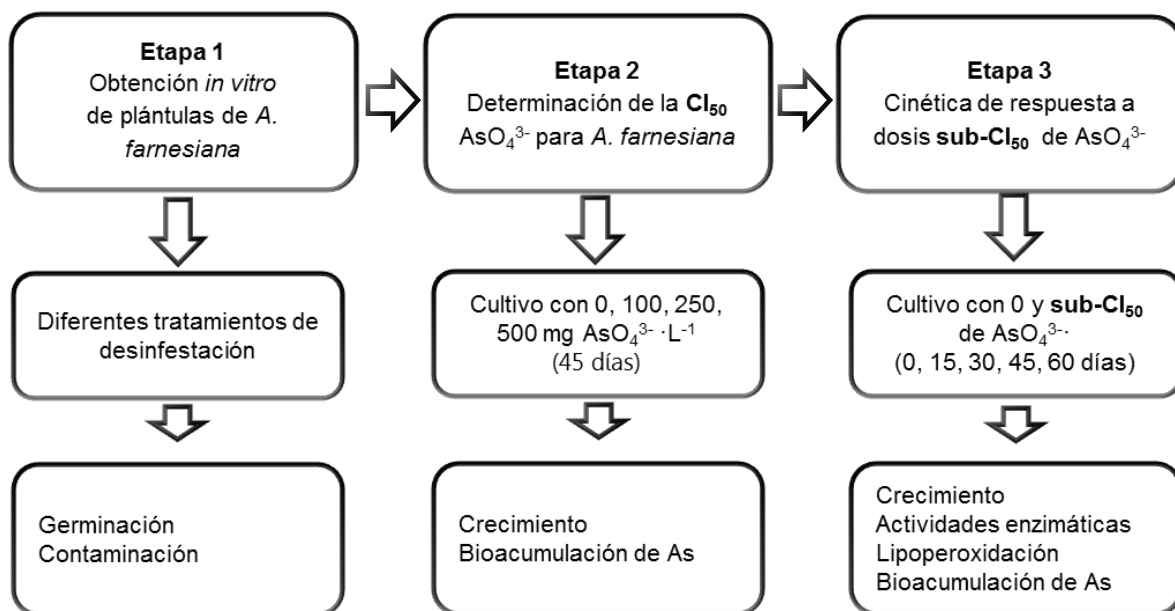


Figura 2. Estrategia experimental general. En los cuadros superiores se muestran las actividades realizadas en cada etapa del estudio, los cuadros intermedios indican los tratamientos y, en los cuadros inferiores, se muestran las variables de respuesta determinadas en cada caso.

Para cuantificar el crecimiento de la planta, cada variable se determinó con 9 repeticiones. La bioacumulación de As, las actividades enzimáticas y la lipoperoxidación, se cuantificó con

3 repeticiones, para lo cual, una unidad experimental se definió como la mezcla homogénea de tejidos de tallos o raíces de 3 plántulas de *A. farnesiana*.

6.2 Material biológico

Todos los ensayos se realizaron con semillas colectadas de árboles maduros de *Acacia farnesiana* (L.) Willd., que crecen en un sitio contaminado con residuos mineros en Zimapán, Hidalgo (Figura 3). Las semillas para los estudios, se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de papel en un lugar seco y oscuro, hasta el momento de su uso.



Figura 3. Plantas de *A. farnesiana* creciendo en una zona minera contaminadas con As, en Zimapán, Hidalgo.

Para conocer las condiciones de contaminación por As en el sitio, se colectaron muestras compuestas de suelo superficial, así como semillas y tejido vegetal (tallos y hojas) de plantas adultas de *A. farnesiana*, en las cuales se determinó la concentración de As total (Sección 6.7). En Zimapán, Hidalgo se han reportado concentraciones de 4000 – 35,600 mg de As por Kg de suelo (Ongley *et al.*, 2007; Hernández, 2009).

6.3 Etapa 1: Obtención *in vitro* de plántulas de *A. farnesiana*

Para la obtención de plántulas de *A. farnesiana* en condiciones *in vitro*, se seleccionaron semillas viables mediante el método de flotación en agua (Camacho *et al.*, 1992). Una vez seleccionadas, las semillas se escarificaron mecánicamente, lijando un costado sin lacerar el embrión, posteriormente se evaluaron diferentes tratamientos para su desinfección (Tabla 1). Como variables de respuesta para seleccionar el mejor tratamiento, se determinó el índice de germinación y de contaminación microbiana, después de 15 días de incubación.

Enseguida de la desinfección, se sembraron 4 semillas por caja Magenta (*Sigma-Aldrich*), conteniendo medio Murashige y Skoog (MS, *Sigma-Aldrich*), adicionado con sacarosa (30 g·L⁻¹, *Sigma-Aldrich*) y Phytigel (1.8 g·L⁻¹, *Sigma-Aldrich*) como agente gelificante. El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH (1N) y las cajas con medio se esterizaron (15 lb·in⁻², 20 min) antes de la siembra. Las semillas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente hasta la germinación, considerada como la emergencia de los puntos de crecimiento radicular y plúmula después de la imbibición de agua (Flores, 2004).

Tabla 1. Secuencia de los tratamientos de desinfección evaluados para la germinación *in vitro* de semillas de *A. farnesiana*. Después de la inmersión en detergente comercial, las semillas se trataron bajo condiciones asépticas y se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril después de cada solución.

Tratamiento	Escarificación	Detergente comercial	Desinfección		
			H ₂ SO ₄	C ₂ H ₆ O	NaClO
1	Mecánica	1%, 30 min	57 % 20 min	-	-
2			57 % 20 min	-	1.2% 30 min
3			57 % 60 min	-	-
4			-	70% 30 seg	1.6% 30 min
5			-	70% 30 seg	1.6% 45 min

Las plántulas obtenidas se mantuvieron en incubación bajo una intensidad lumínica de 50 μmol·m⁻²·s⁻¹ por un fotoperiodo de 16 h a 25 ± 1°C, hasta alcanzar una longitud de raíz de ~3 cm y el desarrollo de 3 hojas verdaderas. Las plántulas que cumplieron estas condiciones se transfirieron a los tratamientos para la determinación de la CI₅₀ y la cinética de respuesta a una dosis sub-CI₅₀ de AsO₄³⁻.

6.4 Etapa 2: Determinación de la CI₅₀ de arsenato

Para definir la CI₅₀ de arsenato (Sección 6.6), las plántulas de *A. farnesiana* obtenidas en condiciones *in vitro* se transfirieron a medio MS adicionado con sacarosa (10 g·L⁻¹, *Sigma-Aldrich*), Phytigel (1.8 g·L⁻¹) y diferentes concentraciones de AsO₄³⁻: 0, 100, 250 y 500 mg·L⁻¹, adicionado como arsenato de sodio (Na₂HAsO₄·7H₂O, *Meyer*). Las plántulas se incubaron bajo un fotoperiodo de 16 h (50 μmol·m⁻²·s⁻¹) a 25 ± 1°C en una cámara de crecimiento (*Binder*) durante 45 días. Después de este periodo, para cada tratamiento se cosecharon 9 plántulas que se separaron en raíz y tallo (más hojas), los tejidos se secaron (60°C, 48 h) para cuantificar el crecimiento (Sección 6.6) y la bioacumulación de As (Sección 6.7).

6.5 Etapa 3: Cinética de respuesta a una dosis sub- CI_{50}

Las plántulas obtenidas en condiciones *in vitro* se transfirieron a cajas Magenta con medio MS, con la misma concentración de sacarosa y Phytigel mencionada en la sección 6.3. En este caso, el medio se adicionó con una concentración sub- CI_{50} de AsO_4^{3-} ($80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Las plántulas fueron expuestas al AsO_4^{3-} durante 0, 15, 30, 45 y 60 días, bajo las mismas condiciones de crecimiento antes descritas (Sección 6.3). En cada tiempo de muestreo se cosecharon 18 plántulas, que se separaron en raíces y tallos para analizarlas de la siguiente manera: (i) 9 plántulas se secaron (60°C , 48 h) para determinar el crecimiento (Sección 6.6) y el As bioacumulado (Sección 6.7) en cada tejido por separado; (ii) las otras 9 plántulas se trataron en fresco para la obtención de extractos crudos (Sección 6.8), los cuales se utilizaron para evaluar el nivel de lipoperoxidación y las actividades específicas y relativas (Sección 6.10.4) para las enzimas estudiadas (CAT, POX y GST).

6.6 Cuantificación del crecimiento de *A. farnesiana* y obtención de la CI_{50}

El crecimiento de *A. farnesiana* se cuantificó mediante la estimación de la longitud y de la biomasa, en base seca, de raíces y tallos por separado. Las medidas de longitud se obtuvieron siguiendo los siguientes criterios: en tallos se consideró la distancia desde la separación del tallo y la raíz hasta el ápice del eje principal. La longitud de raíces se obtuvo midiendo la raíz principal desde la separación de tallo y raíz hasta el ápice radicular (Figura 4).

Para cuantificar la biomasa de raíces y tallos en base seca, las raíces se retiraron cuidadosamente del medio MS y se lavaron con agua destilada con el fin de eliminar el medio restante. Las raíces y los tallos se secaron con papel absorbente para eliminar el exceso de agua sin dañar el tejido y se colocaron por separado en charolas de aluminio a peso constante. Las charolas con el tejido, se pesaron y enseguida se colocaron en una estufa (*Binder*) a 60°C durante 48 h. La biomasa se calculó a través de la diferencia entre el peso final (charola más tejido seco) menos el peso inicial de la charola.

Las mediciones de longitud y biomasa se utilizaron para estimar el índice de tolerancia, IT (Ec. 1) (Audet y Charest, 2007), así como la concentración media inhibitoria (CI_{50}).

$$IT(\%) = \frac{\text{Biomasa con As} \times 100}{\text{Biomasa sin As}} \quad \text{Ecuación 1}$$

La IC_{50} se estimó a partir de una curva dosis-respuesta de la biomasa total *versus* los niveles de AsO_4^{3-} probados. El valor de este parámetro corresponde a la concentración de AsO_4^{3-} en

la cual, el peso seco total de la biomasa vegetal, disminuye 50% con respecto al máximo valor registrado (Naumann *et al.*, 2007).



Figura 4. Criterios considerados para cuantificar la longitud de tallos más hojas (desde el meristemo del eje principal a la separación del tejido) y de raíces (de la separación del tejido al ápice de la raíz principal).

6.7 Análisis de As

Con el fin de determinar la capacidad de bioacumulación de arsénico por *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de arsenato durante 45 días o a una sub- Cl_{50} durante diferentes tiempos, las plántulas se separaron en tejido de raíces y tallos. Con el fin de eliminar el As extracelular adsorbido en las raíces, éstas se lavaron 5 min con una solución de EDTA (10 mM). Este proceso también se realizó con el tejido vegetal de las plantas adultas de *A. farnesiana* (tallos, hojas y semillas) provenientes del sitio de muestreo. Todas las muestras se secaron a 60°C por 48 h, para su digestión ácida y determinación de As por espectrometría de absorción atómica (EAA). Para la cuantificación del contenido total de As en muestras de suelo, éstas se secaron a 60°C, 48 h y se tamizaron para eliminar partículas de más de 1.2 mm de diámetro, antes de su digestión.

6.7.1 Digestión ácida

Para la digestión ácida de muestras vegetales, se pesaron ~100 mg de tallos (peso seco, PS) o ~30 mg de raíces (PS) en un vaso de Teflón (CEM, MARSXpress). Cada vaso con la muestra se adicionó con 4 mL de agua desionizada (18 MΩ cm⁻¹, PureLab-Q Elga) y 5 mL de HNO₃ concentrado (69%) (J.T. Baker, Instra-analyzed) y fue completamente digerida a 200°C (1600 Watts) durante 15 min en un digestor de microondas (CEM, MARSXpress). Las muestras se dejaron enfriar, el volumen de cada vaso se aforó a 10 mL con agua desionizada y se filtró con membranas de nitrato de celulosa (0.45 μm, Whatman). El As total en cada muestra se determinó en los extractos por EAA (EAA).

Para las muestras de suelo, éstas se secaron (60°C, 48 h) y, en cada vaso de Teflón, se colocaron ~0.5 g que se adicionaron con 10 mL de HNO₃ concentrado (J.T. Baker, Instra-analyzed). Las muestras se digirieron por 10 min a 175°C (1600 Watts), se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtraron (0.45 μm, Nylaflo PALL) para su análisis.

6.7.2 Análisis de As por espectrometría de absorción atómica (EAA)

La cuantificación de As por EAA se realizó con los extractos líquidos obtenidos de la digestión ácida. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro de absorción atómica (Shimadzu, AA-6300) mediante el método de flama (EAA-flama), utilizando una longitud de onda de 193.7 nm, con una mezcla de aire-acetileno (3.7 L·min⁻¹) y una abertura del quemador de 0.2 mm. Las curvas patrón para la cuantificación de As se prepararon con agua desionizada, en un rango de 0 a 60 mg·L⁻¹, con una solución estándar de 1000 μg As·mL⁻¹ (J.T. Baker, Instra-analyzed).

6.7.3 Estimación de parámetros indicadores de fitorremediación

Para evaluar el potencial fitorremediador de As de *A. farnesiana*, se estimó el factor de translocación (FT) y el factor de bioacumulación (FBA). Ambos índices se estimaron a partir de los datos de acumulación de As en tejidos vegetales. El FT indica la capacidad de la planta para translocar el As desde las raíces a los tallos (Vithanage *et al.*, 2011), y se calculó como la relación entre la concentración de As acumulado en la parte aérea ([As]_{tallo}) y la concentración en raíces ([As]_{raíz}) (Ec. 2):

$$FT = \frac{[As]_{tallo}}{[As]_{raíz}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para cuantificar la capacidad de bioacumulación de As por *A. farnesiana*, con relación a la concentración del metaloide en el medio, se estimó el FBA (Ec. 3), como la relación entre la concentración de As acumulado en la planta ($[As]_{planta}$) y la concentración total inicial en el medio ($[As]_{medio}$) (Audet y Charest, 2007):

$$FBA = \frac{[As]_{planta}}{[As]_{medio}} \quad \text{Ecuación 3}$$

6.8 Obtención de extractos crudos

Al término del tiempo de cultivo correspondiente, las plántulas se cosecharon y se separaron en raíces y tallos. Las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar el medio sobrante. Cada tejido en fresco, se pulverizó por separado con N₂ líquido durante 5 minutos y el pulverizado se almacenó a -70°C en un ultra congelador (*New Brunswick*, U9270-0000). El tejido pulverizado se resuspendió y homogeneizó con 1 mL de la solución correspondiente por cada 100 mg de tejido fresco. Todas las muestras se trataron a 4°C para la obtención de los extractos crudos (EC) (Figura 5).

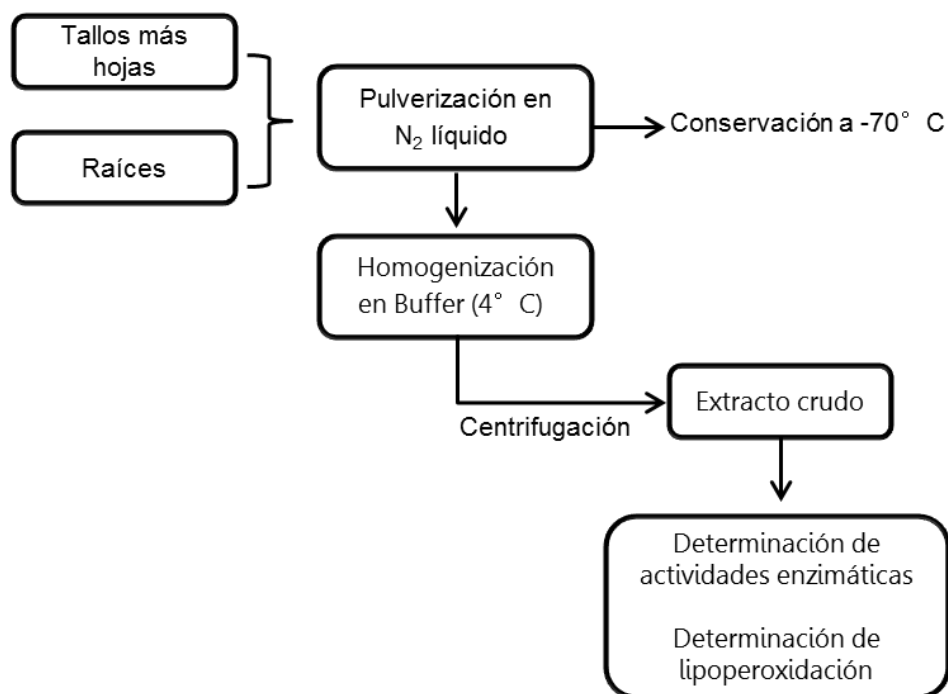


Figura 5. Metodología general para la obtención de extractos crudos (EC). Después de la pulverización con nitrógeno líquido, todas las muestras se trataron a 4°C. El buffer utilizado y la velocidad de la centrifugación se modificaron con base en la determinación bioquímica a realizar. En los EC se determinaron actividades enzimáticas, proteína y la concentración de MDA.

A continuación se indican las soluciones utilizadas para cada determinación: (i) para cuantificar proteína y actividades catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST) y guayacol-peroxidasa (G-POX), se utilizó buffer de fosfatos de sodio 50 mM (pH 7) con inhibidor de proteasas (5 μ L/100 mg de tejido); el homogenizado se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 15 min; (ii) para cuantificar la lipoperoxidación (LPO) a través de la concentración de malondialdehído (MDA), los tejidos pulverizados se homogeneizaron en buffer Tris 20 mM (pH 7.4), con 10 μ L de hidroxitoluenobutilado (BHT). La suspensión se centrifugó a 3000 g a 4°C por 15 min.

El contenido total de proteína en los extractos crudos se determinó mediante el método de Lowry (1951) a 690 nm en un lector de microplacas (*ELx808, BioTek*), utilizando un kit comercial (*Bio-Rad DCTM*) y una curva estándar de 0 a 1 mg·mL⁻¹ de seroalbúmina bovina.

6.9 Determinación de lipoperoxidación

El nivel de lipoperoxidación en tejidos frescos de *A. farnesiana*, se determinó de acuerdo con el método propuesto por Buege y Aust (1978), el cual se basa en la cuantificación del contenido de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados de las membranas. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de extracto crudo más 1 mL de solución de reacción (ácido tricloroacético (TCA) 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.5% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N). La mezcla se incubó 25 minutos en agua a 85-90 °C para favorecer la reacción entre el MDA y el TBA. En la reacción, se forma un cromóforo estable que se leyó a 535 nm en un espectrofotómetro UV-visible (*Varian, 50 Conc.*).

Para descartar la absorbancia que no correspondía a la reacción con el TBA, se utilizó un blanco de muestra donde la solución de reacción se sustituyó por buffer (Tris 20 mM, pH 7.4). Los niveles de lipoperoxidación se obtuvieron utilizando un coeficiente de absortividad molar (ϵ) de 155 mM⁻¹·cm⁻¹ (Buege y Aust, 1978) y los resultados se reportan como nmol de MDA por g de peso fresco (PF).

6.10 Determinación de actividades enzimáticas

6.10.1 Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

La actividad CAT en los extractos crudos se cuantificó de acuerdo con el método propuesto por Aebi (1984). La mezcla de reacción contenía 0.2 mL de extracto crudo y 1mL de H₂O₂ (20 mM preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7). La reacción se inició con la

adición del H₂O₂ y la actividad enzimática se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 240 nm durante 4 min a 26°C en un espectrofotómetro UV-visible (*50 Conc, Varian*). En el control se substituyó el H₂O₂ por H₂O destilada y la actividad se determinó considerando un uncoeficiente de absortividad molar $\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Aebi, 1984).

Una unidad de actividad CAT se definió como cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de H₂O₂ por min a 26°C y pH 7 (Aebi, 1984).

6.10.2 Glutación S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18)

La actividad GST se determinó con un kit comercial para GST (*Sigma-Aldrich*). Este método se basa en la formación del conjugado GS-DNB, en una reacción catalizada por las GST que utilizan CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) y GSH como sustrato. La mezcla de reacción contenía 20 μL de extracto crudo y 180 μL de solución de reacción (buffer de fosfatos Dulbecco, GSH 200 mM y CDNB 100 mM). En el blanco, el volumen de la muestra se substituyó por buffer (fosfatos de sodio 50 mM, pH 7) y el control se leyó con 2 μL de estándar de enzima GST. La actividad se leyó a través del aumento en la absorbancia a 340 nm, durante 4 min en un lector de microplacas y la actividad enzimática se calculó considerando un $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Habig y Jakoby, 1981).

Una unidad GST se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol del conjugado GS-DNB por minuto a 27°C y pH 7.

6.10.3 Peroxidasa total (G-POX, EC 1.11.1.7)

La actividad peroxidasa total se determinó mediante el método descrito por Maehly (1954), usando guayacol como sustrato donador de H⁺. El método cuantifica la tasa de utilización de peróxido para formar un cromóforo (tetra-guayacol) que absorbe a 415 nm (Chance y Maehly, 1955). La mezcla de reacción contenía 200 μL de buffer de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7), 10 μL de guayacol (1% preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7), 20 μL de H₂O₂ (10 mM preparado en buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH 7) y 10 μL de extracto crudo. La reacción se inició con la adición de H₂O₂ y en el blanco éste se substituyó por buffer (50 mM, pH 7). La actividad G-POX se determinó en un lector de microplacas, a través del aumento en la absorbancia a 415 nm, considerando un ϵ de $16.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Maehly, 1954).

Una unidad G-POX se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetra-guayacol por minuto a 26°C y pH 7.

6.10.4 Determinación de la actividad enzimática relativa

La actividad específica de cada enzima se obtuvo relacionando una unidad enzimática por miligramo de proteína por gramo de peso fresco ($U \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$). Como una medida de incremento o disminución de actividad enzimática CAT, G-POX y GST por efecto del arsenato, en cada tejido se obtuvo la actividad relativa por enzima mediante la siguiente relación:

$$\textit{Actividad relativa} = \frac{\textit{Actividad específica con As}}{\textit{Actividad específica sin As}}$$

6.11 Análisis estadístico

Para determinar efectos significativos entre las medias de los tratamientos, los datos se analizaron por ANOVA y una prueba de Duncan ($P < 0.05$) con el paquete estadístico SAS (*SAS Institute Inc. Cary, NC*).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de As en suelo y plantas del sitio de muestreo

Para conocer las condiciones de contaminación en las que crecen arbustos de *A. farnesiana* en el sitio de muestreo, se cuantificó el contenido total de As en muestras de suelo superficial de Zimapán, Hidalgo. Así mismo, se cuantificó el As en semillas, hojas y tallos de una planta adulta de *A. farnesiana* creciendo en dicho sitio. En las muestras de suelo del sitio de muestreo se encontró una concentración promedio de arsénico total de 13,326 mg·kg⁻¹ (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Ongley *et al.* (2007) y por Hernández (2009) para la misma zona, quienes reportan rangos desde 4000 hasta 35,616 mg As·kg⁻¹, con una concentración media de 52 mg·kg⁻¹ (Ongley *et al.*, 2007). En contraste, en suelos no contaminados, las concentraciones promedio de As se encuentran entre 5 y 6 mg·kg⁻¹, con un rango de 0.1 a 40 mg kg⁻¹ (Ongley *et al.*, 2007).

Tabla 2. Concentración total de As en muestras compuestas superficiales de suelo, y en semillas, tallo y hojas de plantas adultas de *A. farnesiana*, en Zimapán Hidalgo*.

Suelo/Tejido	As (mg·kg ⁻¹)*
Suelo	13,326 ± 716
Semillas	508.4 ± 7.0
Tallos	732.9 ± 19.7
Hojas	687.4 ± 44.7

* Los datos corresponden al promedio de tres determinaciones.

La NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, establece concentraciones de referencia totales para arsénico de 22 mg·kg⁻¹ para uso de suelo agrícola/residencial/comercial y de 260 mg·kg⁻¹ para uso de suelo industrial. De acuerdo con lo anterior, es importante resaltar que el sitio de muestreo se encuentra contaminado con concentraciones totales de arsénico que superan en varios órdenes de magnitud los límites establecidos en la NOM que regula la presencia de este elemento en suelos.

En cuanto a los tejidos vegetales, se encontraron altas concentraciones de arsénico en todos los órganos analizados (Tabla 2) con valores que superaron 500 mg·kg⁻¹ de tejido seco. Los valores de As encontrados en tejido vegetal y en semillas de *A. farnesiana* son superiores a los reportados por Armienta *et al.* (2008) para la misma especie, quienes encontraron valores de 67 y 225 mg As·kg⁻¹ en hojas y tallos, respectivamente. La diferencia en la concentración de un EPT en tejidos vegetales depende, entre otras cosas, de su concentración en el suelo. A su vez, en el suelo, la concentración de contaminantes está en función de la distancia desde la fuente que los genera (Puga *et al.*, 2006).

En el caso del presente estudio, el sitio de muestreo pertenece a una minera actualmente dedicada a la explotación de cobre, plomo y zinc. En general, en Zimapán, el uso y explotación del suelo, radica principalmente en la minería¹. En el valle de Zimapán, minerales de Pb, Zn y Ag han sido extensivamente explotados desde cerca de 1576. Muchos minerales de la zona se han encontrado con altos contenidos de arsénico (hasta 16%), provocando que las enormes cantidades de residuos mineros (jales) dispuestos indebidamente en grandes pilas a la intemperie, contengan altas concentraciones del metaloide (Ongley *et al.*, 2007).

En general, las grandes áreas contaminadas por una serie de EPT, permanecen deforestadas por muchos años. Cuando un EPT como el As se encuentra en altas concentraciones en un suelo, puede provocar la inhibición en la elongación y desarrollo de raíces, así como del crecimiento vegetal y, en general interrumpir el ciclo de vida de las plantas (Punshon, 1996 citado por Puga *et al.*, 2006). Sin embargo, hay especies de plantas que pueden tolerar altas concentraciones de estos elementos a través de la activación de diversos mecanismos de defensa. De acuerdo con Kabata-Pendias (2001), concentraciones de arsénico superiores a 5 mg·kg⁻¹ en las hojas de una planta, se consideran tóxicas. Con base en este criterio, la concentración de As encontrada en hojas y tallos de árboles de *A. farnesiana* del sitio contaminado, corroboran que es una especie tolerante a la presencia de este metaloide.

7.2 Etapa 1: Obtención *in vitro* de plántulas de *A. farnesiana*

Desde hace dos décadas la propagación *in vitro* de especies del género *Acacia* ha tomado importancia debido a su potencial como especie restauradora de suelos áridos y/o contaminados. Diversas especies de *Acacia* (*A. bivenosa*, *A. senegal*, *A. saligna*, *A. salicina*, *A. sclerosperma*, *A. holosericea*, *A. nilotica*, *A. auriculiformis*, *A. sinuata* y *A. mangium*) han sido propagadas *in vitro* a través de diferentes técnicas, mediante explantes o semillas (Vengadesan *et al.*, 2002). En el caso de la propagación a través de semillas, es importante optimizar los protocolos que permitan obtener altos porcentajes de germinación y bajos porcentajes de contaminación microbiana.

Una manera para acelerar la germinación de semillas de testa dura, como las de *A. farnesiana*, es a través de su escarificación por tratamientos térmicos, químicos o mecánicos, ya que la causa más común de inhibición de la germinación es el impedimento de la entrada de agua a la semilla. Estudios previos han demostrado que un pretratamiento de escarificación en semillas de *A. farnesiana* es necesario para obtener un índice de germinación mayor a 65%

¹ <http://intranet.e-hidalgo.gob.mx/enciclomuni/municipios/13084a.htm>

(Al-Menaie, 2010). Mientras que en semillas que no se tratan, el porcentaje de germinación se reporta entre 10 y 40% (Gill, 1986).

Como se mencionó, en el presente estudio se evaluó el efecto de 5 tratamientos sobre los índices de germinación y de contaminación de semillas de *A. farnesiana*. De los tratamientos probados, el porcentaje de germinación varió de 15 a 100% cuando las semillas se escarificaron mecánicamente y se desinfestaron con H_2SO_4 o con etanol/hipoclorito de sodio (Figura 6). Parrotta *et al.* (1992) reportan una germinación entre 98 y 100% al tratar las semillas de forma similar. La diferencia en el rango de germinación puede deberse al efecto posterior de los tratamientos de desinfestación. Como se observa en la Figura 6, el uso de H_2SO_4 fue altamente eficiente para disminuir la contaminación de las semillas; sin embargo, el incremento en el tiempo del tratamiento afectó significativamente el porcentaje de germinación, reduciéndolo hasta 15% (tratamiento 3).

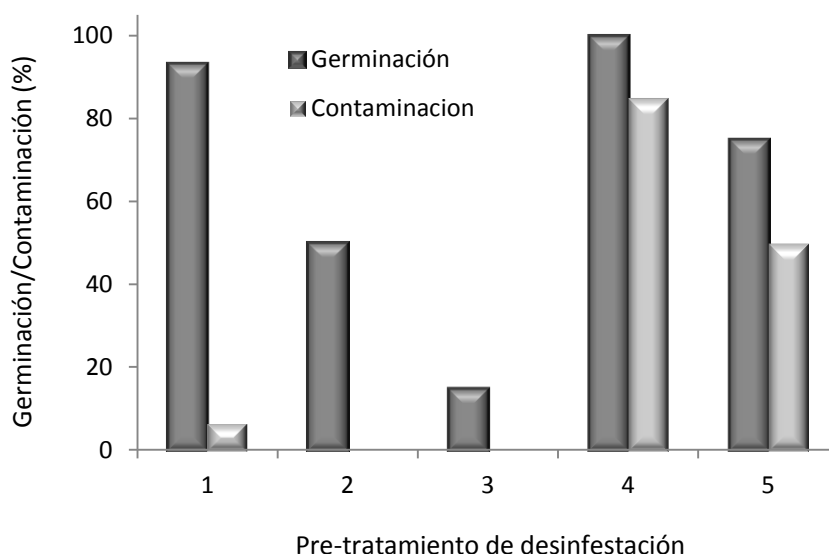


Figura 6. Efecto del pre-tratamiento de semillas de *A. farnesiana* sobre la germinación y contaminación después de 15 días de incubación en medio Murashige-Skoog. Pre-tratamientos: (1) EM - D - H_2SO_4 (57%, 20 min); (2) EM - D - H_2SO_4 (57%, 20 min) - NaClO (1.2%, 30 min); (3) EM - D - H_2SO_4 (57%, 60 min); (4) EM - D - EtOH - NaClO (1.6%, 30 min); (5) EM - D - EtOH - NaClO (1.6%, 45 min). EM: escarificación mecánica; D: lavado con detergente comercial (1%, 30 min); EtOH: solución de etanol (70%, 30 seg).

En el tratamiento 1, la combinación de una escarificación mecánica y química (ácido sulfúrico, 20 min) permitió un 93% de germinación y solo un 6.7% de contaminación. Este índice de germinación puede considerarse alto con respecto a lo reportado en otros estudios, donde indican que el uso de ácido sulfúrico durante 15 a 30 min como pre-tratamiento de semillas

permite una germinación máxima de 60% (Parrotta *et al.*, 1992; Al-Menaie *et al.*, 2010). Es importante mencionar que las semillas que no se pre-trataron, no germinaron durante un periodo de incubación de 15 días.

Aunque se obtuvieron altos porcentajes de germinación (50-100%), excepto en el tratamiento 3 (15%), la eficiencia del pre-tratamiento también fue determinada por el porcentaje de contaminación. Los tratamientos 4 y 5, donde se realizó una secuencia de etanol (70%, 30 seg) e hipoclorito de sodio (1.6%), presentaron los índices más altos de contaminación: 85 y 50%, para tiempos de inmersión en NaClO de 30 y 45 min, respectivamente. En contraste, en los tratamientos donde el H₂SO₄ se utilizó para escarificación y para esterilización superficial (desinfestación), las semillas mostraron un índice de contaminación menor a 6.7% (Figura 6). Este resultado puede atribuirse a que el ácido adelgaza la testa, eliminando la superficie donde pueden permanecer principalmente esporas fúngicas.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el pre-tratamiento 1 (escarificación mecánica – detergente (1%, 30 min) – H₂SO₄ (57%, 20 min)) como el más adecuado para el tratamiento de semillas para la obtención *in vitro* de plántulas de *A. farnesiana*, las cuales se utilizaron en los estudios posteriores.

7.3 Etapa 2: Determinación de la CI₅₀ de arsenato

7.3.1 Crecimiento

Se sabe que, en general, los EPT provocan alteraciones metabólicas que afectan directamente el crecimiento de las plantas causando su inhibición (Seregin e Ivanov, 2001). La biomasa total, la tasa de crecimiento, así como la longitud de raíces y tallos, son variables comúnmente usadas como indicadores del crecimiento de una planta expuesta a EPT, como el arsénico (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011).

Las dosis de arsenato evaluadas en el presente trabajo (100, 250 y 500 mg·L⁻¹), provocaron una disminución significativa (24-26%) en la longitud de raíces (Tabla 3). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de AsO₄³⁻·L⁻¹ probadas. Con respecto a los tallos, solo se registró una disminución significativa (40%) con respecto a las plantas control, en las plantas expuestas a 500 mg AsO₄³⁻·L⁻¹.

El crecimiento de tallos y raíces se debe a la actividad de los meristemos apicales y, al igual que la producción de biomasa, se consideran características del crecimiento primario, susceptibles al efecto de condiciones de estrés biótico o abiótico (Flores, 2004). Se sabe que

bajo condiciones de estrés, la longitud de tallos y raíces puede inhibirse o estimularse, dependiendo del elemento y de su concentración (Calabrese *et al.*, 2007). La inhibición del crecimiento vegetal ocurre cuando la concentración de un contaminante reprime la acción de diversos mecanismos involucrados en la división celular y elongación de las raíces. Estos mecanismos incluyen interacciones directas con el DNA, aberraciones genéticas inducidas por EPT, expansión del ciclo mitótico, inhibición del desarrollo de los microtúbulos, disminución en la plasticidad de la pared celular y reducción de la concentración de GSH (Lal, 2010).

Tabla 3. Longitud de tallos y raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días*.

AsO_4^{3-} (mg L^{-1})	<i>Longitud</i>	
	<i>Raíz (cm)</i>	<i>Tallos (cm)</i>
0	6.3 ± 1.5 ^a	5.1 ± 1.4 ^a
100	4.7 ± 1.0 ^b	5.1 ± 1.0 ^a
250	4.6 ± 0.8 ^b	4.6 ± 1.1 ^a
500	4.8 ± 1.3 ^b	3.1 ± 0.4 ^b

*Letras diferentes indican diferencias significativas (promedio ± DE, n = 9).

También se ha demostrado que bajas concentraciones de ciertos EPT pueden estimular el crecimiento vegetal debido a una respuesta adaptativa conocida como hormesis, la cual consiste en la activación de mecanismos celulares en respuesta a bajos niveles de estrés. Lo anterior conduce a un incremento en la capacidad de las plantas para contrarrestar la toxicidad en caso de un incremento de estrés posterior (Singh *et al.*, 2006). Por ejemplo, estudios previos con *A. farnesiana* (Salas, 2007; Solís-Ibarra, 2009), reportan un aumento en la longitud de raíces y la producción de biomasa por efecto de la exposición a concentraciones de Pb entre 100 y 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, después de 20 días de cultivo. La hormesis por efecto de la exposición a EPT ocurre en concentraciones bajas que dependen de la naturaleza química del elemento tóxico en particular.

El AsO_4^{3-} también tuvo efecto en la producción de biomasa en *A. farnesiana* (Figura 7). En este caso, la biomasa de raíces se redujo significativamente (46%) con respecto a las plantas control, solo cuando fueron expuestas a 500 $\text{mg AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$. En la biomasa total, se registró una reducción significativa desde la menor concentración de AsO_4^{3-} ensayada, encontrando reducciones de 17, 25 y 65%, con respecto al control, para 100, 250 y 500 $\text{mg AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Figura 8). Estos resultados fueron más evidentes en los tallos, en donde la biomasa disminuyó significativamente ($P < 0.05$) hasta 68% en plantas expuestas a 500 mg

$\text{AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 8). Las plantas que crecen en condiciones de estrés por EPT pueden mostrar una disminución en su crecimiento debido a la pérdida de plasticidad celular, resultado de alteraciones en los polisacáridos de la pared celular (Lal, 2010).



Figura 7. Plántulas de *A. farnesiana* expuestas durante 45 días a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

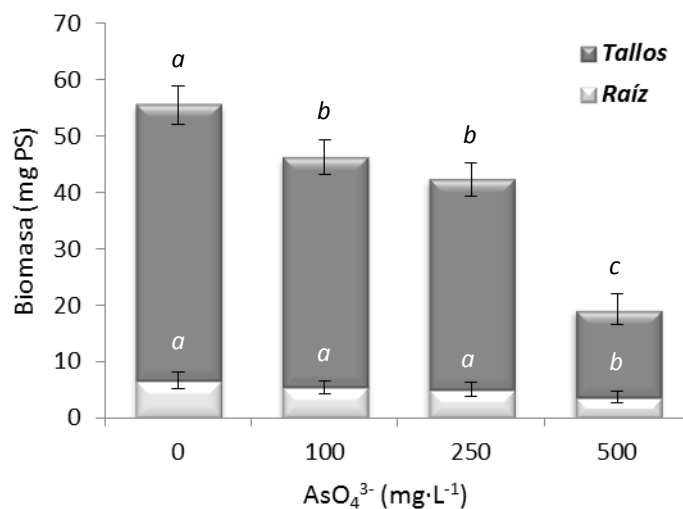


Figura 8. Producción de biomasa en tallos y raíces de *A. farnesiana* expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. Letras diferentes por tejido indican diferencias significativas (promedio \pm DE, n = 7).

A partir de los resultados anteriores, se determinó que la biomasa de tallos y la biomasa total fueron las variables más sensibles al efecto del As. Se utilizó la biomasa total como variable para estimar el índice de tolerancia (IT) que, en este caso, relaciona la biomasa total (PS) de las plantas expuestas a AsO_4^{3-} con la biomasa total producida en las plantas control (Figura 9). El IT mostró una reducción de 1.2 a 2.8 veces con respecto al control, alcanzando un valor mínimo de 35.1% cuando la concentración de AsO_4^{3-} aumentó a 500 mg L^{-1} . Otros estudios han reportado en la misma especie bajo estrés por Pb valores de IT mayores de 100% en respuesta a concentraciones de 100 a 500 mg L^{-1} , sugiriendo una estimulación del crecimiento por efecto del Pb – hormesis – (Solís-Ibarra, 2009; Maldonado-Magaña *et al.*, 2011).

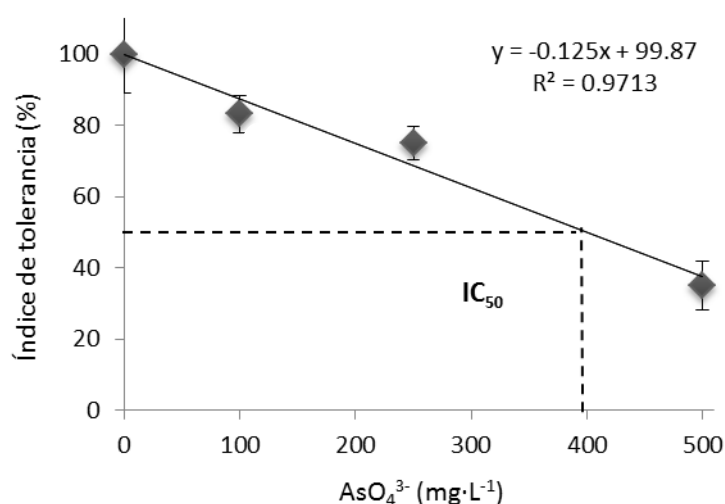


Figura 9. Índice de tolerancia de *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. La línea punteada indica el valor considerado para la estimación de la CI_{50} . (Promedio \pm DE, $n = 9$).

La diferencia en la respuesta a diferentes contaminantes, Pb y As en este caso, puede atribuirse a las características particulares y toxicidad de cada elemento. El As, además de inhibir una serie de actividades enzimáticas e inducir la producción de ERO, interviene directamente en la producción de energía (ATP), debido a que reemplaza al fósforo en el fosfato inorgánico en las reacciones que lo involucran (Babula *et al.*, 2008). Además, es probable que plántulas de *A. farnesiana* bajo estrés por As muestren una reducción en la absorción de fosfato inorgánico, debido a que el As(V) compite con este elemento, causando alteraciones en la homeostasis celular y, en consecuencia, inhibiendo el crecimiento (Meharg y Macnair, 1992; Bleeker *et al.*, 2003).

Con los datos del IT, se encontró una CI_{50} de $400 \text{ mg AsO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ (Figura 9). Este valor se usó como referencia para definir una concentración de AsO_4^{3-} , tal que estimulara los mecanismos

de defensa pero que no inhibiera o alterara el crecimiento (Liu *et al.*, 2009). Entonces, para los estudios cinéticos, se seleccionó una sub- CI_{50} de 80 mg $AsO_4^{3-}L^{-1}$. En otras plantas, como *Ceratophyllum demersum* se ha reportado una CI_{50} alrededor de 81 mg $AsO_4^{3-}L^{-1}$ al cabo de 7 días de exposición al metaloide (Mishra *et al.*, 2008). Particularmente en *A. farnesiana* expuesta a plomo, Maldonado *et al* (2009) reportaron una CI_{50} de 719 mg $Pb \cdot L^{-1}$.

Es importante resaltar que, para la mayoría de las plantas, el rango límite de tolerancia de As en suelo se encuentra entre 40 y 200 $mg \cdot kg^{-1}$ (Vithanage, *et al.*, 2011). Por arriba de esta concentración, las plantas tolerantes presentan adaptaciones para crecer y reproducirse en tales condiciones (Baker, 1987). No obstante, la capacidad de una planta para tolerar y acumular EPT es específica de cada especie vegetal (Seregin e Ivanov, 2001). Así, con base en lo anterior y, considerando que en el sistema utilizado todo el arsenato presente se encuentra en forma soluble, los resultados indican que *A. farnesiana* es una planta con una tolerancia sobresaliente al AsO_4^{3-} .

7.3.2 Bioacumulación de As

En general, se ha encontrado que el contenido de EPT en organismos vegetales que los acumulan decrecen en el siguiente orden: semillas < inflorescencias < tallos < hojas < raíces. Sin embargo, este orden puede variar en función de la especie vegetal, del EPT y de su concentración (Seregin e Ivanov, 2001). Plantas de *A. farnesiana* expuestas durante 45 días adiferentes concentraciones de As(V) en un sistema *in vitro*, acumularon de 2.5 a 3.8 veces más As en las raíces que en los tallos, encontrando concentraciones entre 1.7 y 3.9 $mg \cdot g^{-1}$ en tallos y entre 6.2 y 9.9 $mg \cdot g^{-1}$ en raíces (Tabla 4). Debido a los mayores niveles de As acumulados en raíces con respecto a los tallos, se obtuvieron valores del factor de translocación (FT) menores a 1.

De acuerdo con Vithanage *et al.* (2011), valores de FT menores a 1 indican un transporte limitado de As a los tallos. *A. farnesiana* bioacumula en las raíces alrededor de 70-80% de As y transloca alrededor de 20-30% de As al tejido fotosintético. Es probable que parte de la defensa de *A. farnesiana* sea a través de la exclusión del metaloide, la cual puede ocurrir a través de la unión del EPT a componentes de la pared de células de la raíz (como pectinas). La exclusión como mecanismo de protección externa se ha reportado en plantas bajo estrés por metales como el aluminio (Brunner *et al.*, 2008).

Tabla 4. Bioacumulación de arsénico en tallos y raíces de *A. farnesiana* expuestas a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} durante 45 días. Se muestran los valores del factor de translocación (FT) y del factor de bioacumulación (FBA)*.

AsO_4^{3-} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>As</i> ($\text{mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$)		<i>FT</i>	<i>FBA</i>
	<i>Tallo</i>	<i>Raíz</i>		
100	1.74 ± 0.11 ^a	6.20 ± 0.29 ^a	0.28 ± 0.02 ^a	147.2 ± 2.1 ^a
250	2.15 ± 0.37 ^a	8.08 ± 1.35 ^a	0.25 ± 0.05 ^a	75.1 ± 2.7 ^b
500	3.91 ± 0.80 ^b	9.93 ± 2.65 ^a	0.35 ± 0.12 ^a	50.0 ± 8.2 ^c

*Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (promedio ± DE, n =3). No se detectó As en las plantas testigo.

De acuerdo con Vithanage *et al.* (2011), valores de FT menores a 1 indican un transporte limitado de As a los tallos. *A. farnesiana* bioacumula en las raíces alrededor de 70-80% de As y transloca alrededor de 20-30% de As al tejido fotosintético. Es probable que parte de la defensa de *A. farnesiana* sea a través de la exclusión del metaloide, la cual puede ocurrir a través de la unión del EPT a componentes de la pared de células de la raíz (como pectinas). La exclusión como mecanismo de protección externa se ha reportado en plantas bajo estrés por metales como el aluminio (Brunner *et al.*, 2008).

La alta concentración de As bioacumulado en la planta (tallos más raíces) se reflejó en valores del factor de bioacumulación (FBA) muy superiores a 1 (Tabla 4), alcanzando una concentración total de hasta 13.8 mg As·g PS⁻¹. Lo anterior indica una gran capacidad de bioacumulación y tolerancia ya que, en el caso del As, un rango de 0.5–2.0 mg·g PS⁻¹ se considera crítico para plantas no acumuladoras (Kabata-Pendias, 2001). A diferencia de helechos hiperacumuladores de As como *Pteris vittata* L. y *P. umbrosa* (Srivastava *et al.*, 2005; Koller, 2007), *A. farnesiana* acumula más As en raíces que en la parte fotosintética. Sin embargo, transloca concentraciones superiores a 1 mg As·g PS⁻¹ a la parte aérea, lo cual se considera una característica particular de especies hiperacumuladoras (Mendez y Maier, 2008, Brooks *et al.*, 1977).

Es importante señalar que la concentración de As bioacumulado en cada tejido de *A. farnesiana* depende del tiempo de exposición y de la concentración del contaminante. Por ejemplo, en estudios con *P. vittata*, se encontró un rango de 0.9-27 mg As·g PS⁻¹ en los frondes (Srivastava *et al.*, 2005; Koller, 2007; Ma *et al.*, 2001, Tongbin *et al.*, 2002); este rango de bioacumulación se debe a la concentración inicial de arsenato en los cultivos y a las condiciones del cultivo (tiempo de exposición y tipo de medio) de cada estudio.

Nuestros resultados indican que *A. farnesiana* no solo muestra una sobresaliente capacidad de bioacumulación de As, sino que además cumple con los criterios para considerarla una planta con potencial para la fitoextracción y/o fitoestabilización de este EPT (Mendez y Maier, 2008).

7.4 Etapa 3: Cinética de respuesta de *A. farnesiana* a una dosis sub- CI_{50}

7.4.1 Crecimiento

Con el fin de evaluar la respuesta de *A. farnesiana* al estrés por As durante diferentes tiempos, plántulas de *A. farnesiana* fueron expuestas a 0 y 80 mg·L⁻¹ de AsO₄³⁻ durante 15, 30, 45 y 60 días. Esta concentración permitió determinar el daño oxidante así como la actividad de enzimas antioxidantes y destoxicantes en el tiempo, sin inhibir el crecimiento de *A. farnesiana*.

En general, el estrés por AsO₄³⁻ no causó efectos significativos sobre el crecimiento de *A. farnesiana* durante 60 días de exposición a 80 mg·L⁻¹. Particularmente la longitud de tallos y raíces no se modificó con respecto a las plantas crecidas sin el metaloide, a excepción del día 60, cuando se registró una disminución del 30% en la longitud total por efecto del arsenato (Tabla 5). Como se mencionó, una de las variables más sensibles a la presencia de AsO₄³⁻ en esta planta, fue la biomasa total (PS). Aunque en esta variable se registró una reducción significativa entre los 30 y 45 días (17 y 19%, respectivamente) por efecto del AsO₄³⁻, a los 60 días se encontraron valores similares a las plantas control (Figura 10). Estos resultados se reflejaron en una reducción significativa en el IT (14 y 18%) a los 30 y 45 días con respecto al control (Tabla 5). De acuerdo con Audet y Charest (2006), valores de IT cercanos a 100% indican que no hay efecto por la exposición a un EPT con respecto a plantas control.

Durante el periodo de 0 a 45 días de cultivo, la tasa de crecimiento disminuyó por efecto del arsénico, encontrando un valor promedio de 0.15 mg PS·día⁻¹ (R²=0.87) por planta, en comparación con una tasa de 0.39 mg PS·día⁻¹ (R²=0.93) en las plantas control. Entre los 45 y 60 días, las plantas expuestas a AsO₄³⁻ presentaron una tasa de crecimiento 9 veces mayor (0.65 mg PS·día⁻¹) que las plantas control (0.07 mg PS·día⁻¹), lo que permitió que a los 60 días no se registraran diferencias significativas en la de biomasa total producida (Figura 10).

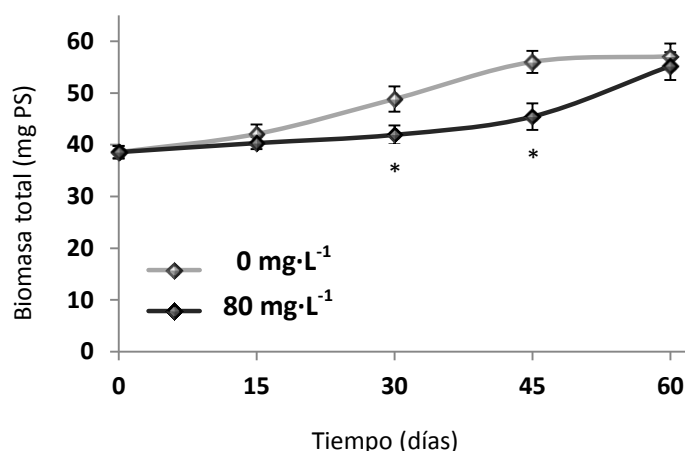


Figura 10. Producción de biomasa total (peso seco, PS) en plantas de *A. farnesiana* expuestas a 0 y 80 mg·L⁻¹ de AsO₄³⁻ durante 60 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (promedios ± error estándar, n = 9).

Con base en lo anterior, a pesar del retraso inicial en el crecimiento de *A. farnesiana*, estos resultados sugieren la activación de mecanismos de resistencia que permitieron a las plantas recuperarse de la toxicidad inicial generada por la exposición a AsO₄³⁻.

Tabla 5. Cinética de longitud de tallos y raíces e índice de tolerancia (IT) de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a 0 y 80 mg·L⁻¹ de AsO₄³⁻ durante 60 días*.

Tiempo (Días)	Longitud (cm)				Índice de tolerancia (%)
	0 mg AsO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹		80 mg AsO ₄ ³⁻ ·L ⁻¹		
	Raíz	Tallos	Raíz	Tallos	
0	4.3 ± 0.6	5.3 ± 1.1	4.3 ± 0.6	5.3 ± 1.1	100.0 ± 7.1 ^a
15	6.8 ± 0.7 ^a	5.5 ± 0.8 ^a	6.5 ± 1.4 ^a	5.0 ± 0.9 ^a	95.8 ± 11.3 ^a
30	8.0 ± 1.6 ^a	7.0 ± 1.6 ^a	6.4 ± 1.2 ^b	6.2 ± 1.3 ^a	85.8 ± 12.8 ^b
45	8.0 ± 3.4 ^a	7.8 ± 3.0 ^a	7.3 ± 1.0 ^a	7.2 ± 1.3 ^a	81.1 ± 14.5 ^b
60	9.9 ± 2.1 ^a	9.1 ± 3.0 ^a	6.7 ± 0.5 ^b	6.6 ± 0.9 ^b	96.7 ± 14.1 ^a

*Letras diferentes por renglón para el mismo tejido, indican diferencias significativas. Los datos corresponden al valor promedio ± DE (n =9).

En estudios con plantas creciendo bajo estrés por Cd y As (Sandalio *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2008), generalmente se reporta una disminución en el crecimiento por efecto de la presencia de estos elementos. Mishra *et al.* (2008), encontraron una disminución de ~27-45 % en el crecimiento de plantas de *Ceratophyllum demersum* expuestas durante 2-7 días a estrés por 250 µM de arsenato (34.8 mg L⁻¹). Cabe resaltar que los

estudios acerca del efecto del arsenato sobre el crecimiento vegetal y capacidad de bioacumulación son escasos para tiempos mayores a 10 días de exposición y en concentraciones superiores a $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.4.2 Bioacumulación de As

En general, la fitotoxicidad de un EPT para una planta depende del tiempo, la dosis y el tejido expuesto, así como de la naturaleza química del elemento (Mishra *et al.*, 2006). La capacidad de una planta para bioacumular As en sus tejidos es diferente entre las especies tolerantes, estas diferencias se observan en la concentración del metaloide bioacumulado en los tejidos y también en la velocidad con la que se absorbe y acumula el EPT (Ma *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos para plantas de *A. farnesiana* expuestas a $80 \text{ mg AsO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 60 días, indican que la bioacumulación de As en las raíces fue dependiente del tiempo de exposición, encontrando concentraciones entre 2414 y 4380 $\text{mg As}\cdot\text{kg PS}^{-1}$ (Figura 11). Sin embargo, la bioacumulación de As en los tallos no varió significativamente con el tiempo de cultivo, permaneciendo alrededor de $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg PS}^{-1}$ desde los 15 días. El comportamiento de *A. farnesiana* con respecto a su capacidad para acumular As es parecido al que muestra la especie hiperacumuladora *P. vittata*, en la cual, el tejido que acumula más As también muestra un incremento en la concentración del metaloide en función del tiempo de cultivo (Ma *et al.*, 2001).

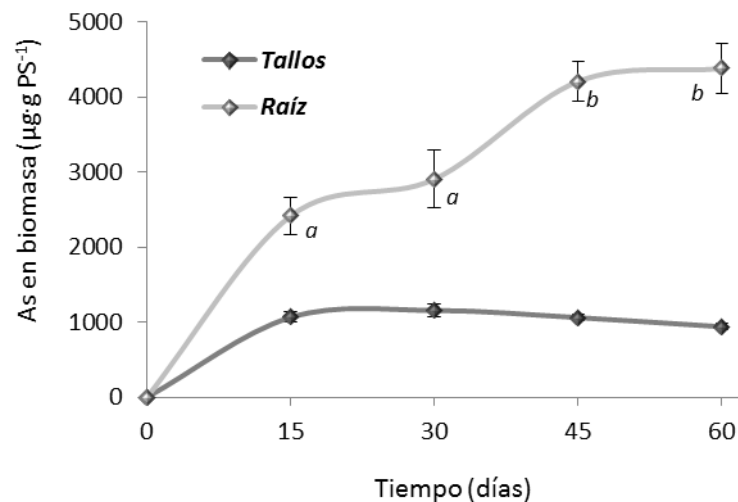


Figura 11. Bioacumulación de As en tallos y raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a $80 \text{ mg L}^{-1}\text{AsO}_4^{3-}$ durante 60 días. Letras diferentes indican diferencias significativas (promedio \pm DE, $n = 3$).

La máxima tasa de absorción de As por planta ($232 \mu\text{g As}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) ocurrió durante los primeros 15 días de exposición, cuando se encontró un 64% del As total acumulado a los 60 días ($5318 \mu\text{g As}\cdot\text{g PS}^{-1}$). Al aumentar el tiempo de exposición, el contenido de As en tejidos de *A. farnesiana* aumentó gradualmente y la tasa promedio de bioacumulación disminuyó. Entre los 15 y 45 días, el As fue acumulado a una tasa de $60 \mu\text{g As}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ($R^2=0.961$) y alcanzó el 99% de la cantidad total encontrada a los 60 días de exposición. Entre los 45 y 60 días, la tasa de acumulación disminuyó a $3.3 \mu\text{g As}\cdot\text{g PS}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$. Estos resultados indican que *A. farnesiana* absorbe el As del medio en una etapa rápida durante los primeros 15 días, y una más lenta a partir de los 45 días de exposición.

La sobresaliente capacidad de *A. farnesiana* para acumular As tanto en tallos como en raíces, condujo a valores del factor de bioacumulación (FBA) alrededor de 65 desde los 45 días de exposición (Tabla 6). Estos resultados indican una notable capacidad de bioacumulación y, por lo tanto, tolerancia al metaloide (Audet y Charest, 2007).

Asimismo, la mayor concentración de As encontrada en las raíces (2.3 a 4.7 veces) con respecto a los tallos, se reflejó en valores del factor de translocación (FT) que disminuyeron con el tiempo de exposición y oscilaron entre 0.22 y 0.40 (Tabla 6). La disminución significativa en el FT a partir de los 30 días, puede atribuirse al aumento en la bioacumulación de As en raíces y no en los tallos, en donde no se registraron cambios significativos en la concentración de As durante 60 días.

Tabla 6. Factores de translocación (FT) y bioacumulación (FBA) de arsénico en plántulas de *A. farnesiana* expuestas a $80 \text{ mg L}^{-1}\text{AsO}_4^{3-}$ durante diferentes tiempos. También se muestran las concentraciones totales de As bioacumulado por planta para cada tiempo*.

<i>Tiempo</i> (días)	<i>FT</i>	<i>FBA</i>	<i>As bioacumulado</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$)
15	0.39 ± 0.08^a	43.1 ± 2.4^a	54.7 ± 6.6^a
30	0.40 ± 0.07^a	50.8 ± 4.7^a	60.9 ± 3.7^{ab}
45	0.25 ± 0.01^b	65.9 ± 3.8^b	73.3 ± 3.7^{bc}
60	0.22 ± 0.03^c	65.4 ± 4.1^b	80.5 ± 7.2^c

*Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (promedios \pm DE, n = 3).

Los resultados obtenidos en los FT indican una baja translocación de As a los tallos, lo cual podría estar relacionado con la formación de complejos As-GS₃ o As-PC en las raíces. En éstas también se observó un aumento de alrededor de 10 veces (con respecto a las plantas control) en la actividad enzimática GST (Figura 15), implicada en la conjugación de As con

GSH y PCs. Liu *et al.* (2013) reportaron que la formación de dichos complejos en raíces de *Arabidopsis* determina la movilidad del As hacia los tallos; este grupo demostró que el incremento de complejos As-PC en raíces se relaciona a un aumento de la bioacumulación en este tejido, disminuyendo la bioacumulación del metaloide en la parte aérea.

7.4.3 Lipoperoxidación

Para evaluar el daño oxidante por la exposición de plántulas de *A. farnesiana* a $80 \text{ mg AsO}_4^{3-} \cdot \text{Kg}^{-1}$ en función del tiempo de exposición, se cuantificó la concentración de malondialdehído (MDA) en tallos y raíces. El MDA se considera un indicador de daño oxidante en lípidos de membrana, ya que es uno de los 20 productos finales de la oxidación de lípidos insaturados (peroxidación o lipoperoxidación). La lipoperoxidación (LPO) comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado para formar un radical lipídico en presencia de ERO, como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) o el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Konigsberg, 2008). La formación y propagación de peróxidos de lípidos implica a un rearrreglo de los dobles enlaces en los lípidos insaturados y puede desencadenar la eventual destrucción de membrana celular (Buege y Aust, 1978). Debido a que los lípidos son las principales moléculas objetivo durante la oxidación por ERO, la LPO es una medida ampliamente utilizada para evaluar el daño oxidante (Diwan *et al.*, 2010). Para determinar el grado de LPO en una muestra, se ha identificado al MDA como una molécula relativamente fácil de cuantificar, a través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico y la formación de un cromóforo que puede cuantificarse espectrofotométricamente (Buege y Aust, 1978).

De manera general, se encontró un mayor contenido de MDA y, por consiguiente de LPO, en tallos que en raíces de *A. farnesiana*, independientemente de la exposición a AsO_4^{3-} (Figura 12). Esto puede atribuirse a la condición fisiológica del tejido, ya que en tejidos fotosintéticos, la fotosíntesis conduce a la producción de ERO, lo cual a su vez puede contribuir a una mayor oxidación basal de lípidos. En las plántulas crecidas con AsO_4^{3-} , los tallos mostraron 2.6 veces más cantidad de MDA que las raíces, mientras que en las plantas control la diferencia fue de hasta 7.9 veces. Estos resultados concuerdan con los reportados por Maldonado *et al.* (2011), quienes reportan alrededor de 2 veces más contenido de MDA en tallos que en raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a estrés por Pb durante 60 días.

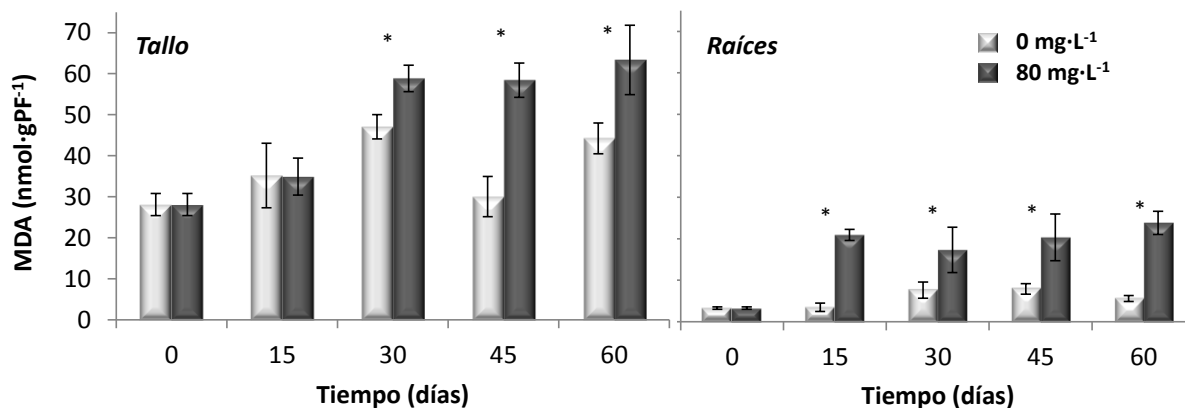


Figura 12. Efecto del tiempo de cultivo y de la exposición a 80 mg $\text{AsO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$ sobre la producción de malondialdehído en plantas de *A. farnesiana*. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, $n = 3$).

Tanto en tallos como en raíces, la exposición a arsenato provocó un aumento significativo en los niveles de MDA (Figura 12). En los tallos, a partir de los 30 días de exposición, los niveles de MDA fueron significativamente mayores con respecto al control y se mantuvieron sin cambios significativos ($\sim 60 \text{ nmol MDA} \cdot \text{g PF}^{-1}$) hasta los 60 días. Las raíces mostraron un incremento de hasta 6 veces en la LPO con respecto al control desde los 15 de exposición, en tiempos posteriores, la concentración de MDA se mantuvo alrededor de $20 \text{ nmol MDA} \cdot \text{g PF}^{-1}$. Particularmente en las raíces, el aumento en la concentración de MDA fue significativo ($P < 0.05$), alcanzando valores entre 2.3 y 6 veces más que la concentración observada en las plantas control.

En los tallos, el contenido de MDA incrementó hasta 1.4 veces por efecto de la exposición al As. Un mayor incremento del contenido de MDA en raíces con respecto al encontrado en tallos, puede estar relacionado con la mayor bioacumulación de As en tejido de raíz, es decir, una condición de estrés que puede generar la sobreproducción de ERO y, por consiguiente, un mayor nivel de LPO.

Por otra parte, aunque la biomasa de tallos y raíces no mostró cambios significativos a los 60 días con respecto a las plantas control, el incremento de MDA por efecto del arsenato puede estar relacionado con la disminución en la longitud (Tabla X) de ambos órganos ($\sim 8\%$) a los 60 días de exposición. Lo anterior puede ser atribuido a que los EPT como el As pueden afectar la plasticidad celular y, por lo tanto afectar en general el crecimiento de la planta (Lane y Martín, 1997).

Diversos grupos han reportado un incremento en la oxidación de lípidos por efecto del arsenato, encontrando diferencias entre tejido fotosintético y tejido de raíz. En este sentido, Srivastava *et al.* (2005) observaron un incremento en la LPO en la parte aérea, pero no en raíces de los helechos *Pteris vittata*, *P. ensiformis* y *Nefrolepis exaltata* bajo estrés por 20.8 y 41.7 mg AsO₄³⁻ L⁻¹ (150 y 300 μM, respectivamente) durante 10 días, observando en las tres especies mayor bioacumulación de As en la parte aérea. En ese mismo estudio, el incremento de LPO en los tallos de las tres especies evaluadas, fue alrededor de 1.6 veces con respecto a las plantas control. A pesar de que *A. farnesiana* bioacumula la mayor parte del As en tejido de raíz, el incremento de LPO encontrado en tallos de plantas bajo estrés por arsenato durante 60 días fue similar al reportado por Srivastva *et al.* (2005) en la parte aérea de *P. vittata*, *P. ensiformis*, y *Nefrolepis exaltata*. Este resultado puede atribuirse al efecto del tiempo de exposición al contaminante, así como a la concentración del As en el medio, lo cual define entre otros factores, la respuesta particular de la planta al estrés por As. En el caso particular de plantas de *A. farnesiana* expuestas a 250-1000 mg Pb L⁻¹, los niveles de MDA solo aumentaron en las raíces crecidas con 1000 mg L⁻¹, en donde se encontró 53 veces más Pb que en los tallos (Maldonado-Magaña *et al.*, 2011).

7.4.4 Respuesta antioxidante y destoxicante

7.4.4.1 Guayacol-peroxidasa (G-POX)

Las peroxidasas son enzimas antioxidantes responsables de eliminar hidroperóxidos, orgánicos e inorgánicos (H₂O₂), que son resultado del metabolismo celular basal o de una sobreproducción de ERO bajo condiciones de estrés. Por ello, diversos estudios consideran la actividad peroxidasa como un método útil para evaluar la respuesta antioxidante de una planta a la presencia de EPT (Liu *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2005).

En el presente estudio no se observaron diferencias significativas en los tallos de *A. farnesiana* por efecto de exposición a 80 mg AsO₄³⁻·L⁻¹, con excepción del día 60, cuando se registró una disminución del 11% en la actividad G-POX de plantas crecidas con As (Figura 13). En el caso de las raíces, la actividad G-POX disminuyó (1.6-2.7 veces con respecto al control) entre los 15 y 45 días de cultivo por efecto del As, a tiempos posteriores no se observaron diferencias significativas entre las plantas crecidas con As y las plantas control.

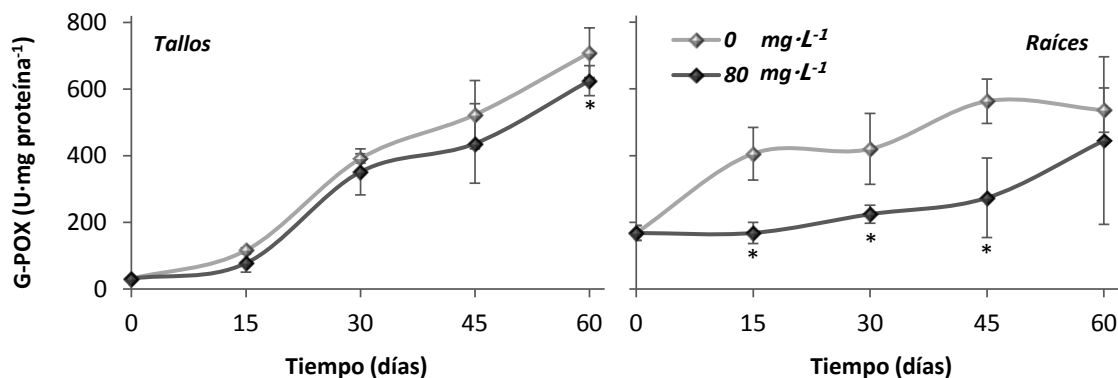


Figura 13. Actividad G-POX en tallos y raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a 0 y 80 mg·L⁻¹AsO₄³⁻ durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio ± DE, n=3).

Se sabe que la presencia de EPT puede inducir o reducir la actividad de una enzima dependiendo de la naturaleza tóxica del elemento (Van Asseche y Clijsters, 1990). La inducción de la producción y actividad de peroxidasa por efecto de EPT se relaciona con el mantenimiento de niveles normales de H₂O₂, para evitar daño oxidante (Mishra *et al.*, 2008). En *A. farnesiana*, Solis-Ibarra (2009) reportó un estímulo de la actividad G-POX, tanto en raíces como en brotes, bajo condiciones de estrés por Pb (100 mg·Pb·L⁻¹). En el presente trabajo, la reducción de la actividad G-POX en raíces de *A. farnesiana* crecidas bajo estrés por As, puede atribuirse al daño oxidante por la bioacumulación de As en este tejido, además es probable que el As(III) reduzca la actividad de muchas enzimas, entre ellas las peroxidasa, ya que en esta forma iónica el As puede reemplazar el grupo -SH de las proteínas, inhibiendo la actividad enzimática o alterando la estructura proteica (Garg y Singla, 2011).

Los niveles de actividad G-POX similares en los tallos de plantas crecidas con As y las plantas control, sugiere que los niveles de H₂O₂ pueden no haberse incrementado por efecto del As, o bien, que el sustrato reductor de estas enzimas (p.ej. glutatión, ascorbato) no fue suficiente, probablemente debido a un bajo potencial redox, ocasionado por la toxicidad del As (Konigsberg, 2008).

Estudios anteriores en los helechos *P. vittata*, *P. ensiformis*, y *N. exaltata* demuestran un incremento de actividad POX antes de 15 días de exposición a AsO₄³⁻, indicando que durante este periodo de estrés, los mecanismos de defensa de la planta involucran la actividad de enzimas que metabolizan peróxidos (Srivastava *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las peroxidasa podrían no estar participando de manera

importante en la defensa antioxidante de *A. farnesiana* contra el estrés generado por la presencia de arsenato, durante el periodo evaluado.

7.4.4.2 Catalasa (CAT)

Otras enzimas implicadas en el metabolismo del H_2O_2 son las catalasas. Estas enzimas, a diferencia de las peroxidasas, no dependen del estado redox de la célula, ya que únicamente utilizan H_2O_2 como sustrato. En la reacción, las CAT utilizan dos moléculas de H_2O_2 , una como molécula reductora y otra como molécula oxidante. Así, las CAT regulan los niveles de H_2O_2 para evitar daño oxidante y, al mismo tiempo, para permitir la transducción celular en la respuesta de la planta a condiciones de estrés (Konigsberg, 2008).

En el presente trabajo, no se encontró un efecto claro en la actividad CAT por efecto de la exposición a $80 \text{ mg AsO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ durante 60 días (Figura 14). Sin embargo, la concentración de arsenato y el tiempo de exposición (15-60 días) fueron mayores que en la mayoría de los estudios. En los tallos no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en actividad CAT entre las plantas crecidas con As y las plantas control, excepto a los 60 días, en donde se observó una disminución de 2.8 veces por efecto del As. Este resultado concuerda con lo reportado por Solís (2009), quien después de 40 días de exposición a 80 mg Pb L^{-1} observó una disminución en la actividad de esta enzima en tallos de *A. farnesiana*.

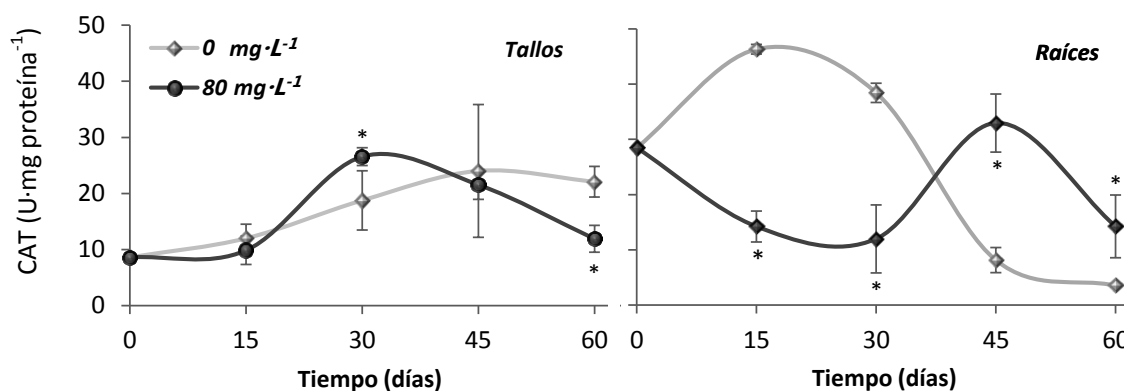


Figura 14. Actividad CAT en tallos y raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a 0 y $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{AsO}_4^{3-}$ durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, $n = 3$).

En las raíces, aunque se registraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad CAT entre las plantas crecidas con As y las plantas control durante todo el tiempo de cultivo, no se encontró una tendencia clara. A los 15 y 30 días en las plantas crecidas con 80 mg AsO_4^{3-}

L⁻¹ la actividad de la CAT disminuyó de 2.7 a 3.2 veces con respecto al control, no obstante, entre los 45 y los 60 días la actividad registró un aumento de 3.6 a 4.3 veces (Figura 14).

En estudios previos se ha demostrado que, bajo condiciones de estrés por Cd y Pb, la actividad CAT en raíces y tallos puede disminuir o aumentar (Schützendübel *et al.*, 2002; Solis-Ibarra, 2009), es decir, no se ha encontrado una correlación clara entre la actividad de esta enzima en respuesta al estrés por EPT. Esto se debe a que la respuesta de las CAT es específica hacia el contaminante, ya que cada elemento tóxico presenta una toxicidad diferente y, por ende, desencadena una respuesta celular distinta. En el caso del arsénico, Srivastava *et al.* (2005), reportan un incremento en la actividad CAT en raíces y tallos de *P. vittata* y *P. ensiformis* crecidas bajo estrés por arsenato (41 mg·L⁻¹) durante 10 días.

Aunque se encontraron diferencias en la actividad CAT en tallos y raíces de *A. farnesiana*, la tendencia de esta enzima no fue clara. Estos resultados sugieren que, al igual que la actividad G-POX, la actividad CAT podría no participar de manera importante en el sistema antioxidante de *A. farnesiana* en respuesta a estrés por As durante un periodo de 15-60 días.

7.4.4.3 Glutación S-transferasa (GST)

Además de evaluar enzimas involucradas en el metabolismo del H₂O₂, se determinó la actividad GST, debido a que varios estudios reportan la participación de esta enzima durante la detoxificación de As. Bajo condiciones de estrés por EPT, las GST pueden formar conjugados de estos elementos con glutatión reducido, facilitando así su transporte hacia la vacuola y estabilizando a los contaminantes (Edward y Dixon, 2005). La actividad de esta familia de enzimas se ha reportado en plantas crecidas con diferentes EPT como Pb, Cu, Cd, Zn, Co, Hg y As. La respuesta en la actividad GST es diferente en cada caso, dependiendo de la concentración del EPT, del tejido vegetal y del tiempo de exposición. Sin embargo, su actividad en conjunto con otras enzimas y moléculas antioxidantes, determinan la tolerancia de una planta a un elemento tóxico en particular (Marrs, 1996).

En plántulas control de *A. farnesiana*, se encontraron actividades GST entre 1.1 y 3.0 veces mayores en raíces que en tallos (Figura 15). En ambos tejidos, las plantas control mostraron una actividad GST basal que se mantuvo durante 60 días en valores alrededor de 0.2 y 0.3 U·mg⁻¹ de proteína, en tallos y raíces respectivamente. La exposición a AsO₄³⁻ estimuló significativamente (P<0.05) la actividad de esta enzima, encontrando un aumento en función del tiempo, y valores de 3.6 a 9.3 veces mayores en tallos y de 1.5 a 9.7 veces en raíces, con respecto a las plantas control. Una respuesta comúnmente observada en la actividad

GST de plantas expuestas a arsenato, es un incremento en tiempos cortos (7 días) y una reducción a tiempos más prolongados (15 días) (Mishra *et al.*, 2008).

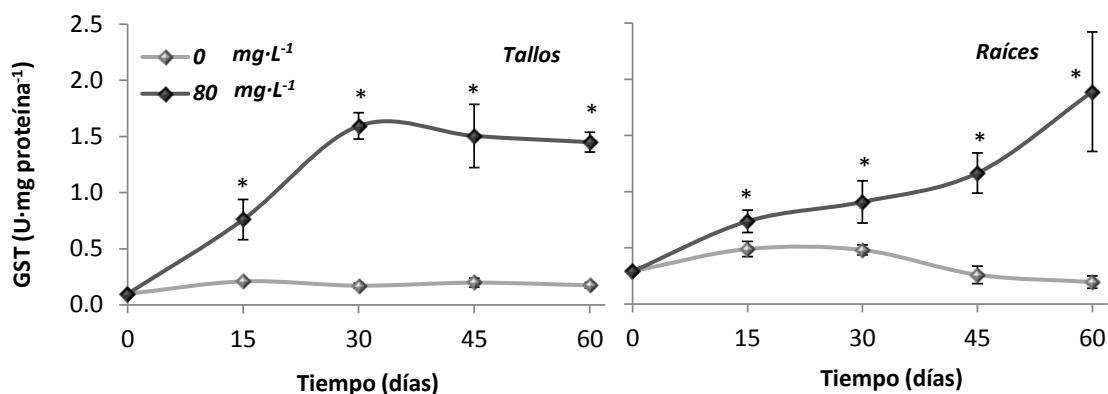


Figura 15. Efecto del tiempo de cultivo y de la exposición a $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} en la actividad GST de tallos y raíces de *A. farnesiana* durante 60 días. Las diferencias significativas con respecto al control correspondiente se señalan con * (promedio \pm DE, $n=3$).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Mokgalaka-Matlala *et al.* (2009), quienes observaron un aumento en la actividad GST en tallos y raíces de *Prosopis* sp. expuestas durante 5 días a diferentes concentraciones ($5 - 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de arsenato. En este mismo estudio se observa un incremento inicial de actividad GST a bajas concentraciones iniciales ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, con altas concentraciones ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) o tiempos de exposición más prolongados (7 días), generalmente se han encontrado reducciones en la actividad de esta enzima (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que, en el caso de *A. farnesiana*, se encontró que la actividad GST fue estimulada tanto por la exposición a AsO_4^{3-} como por el tiempo de cultivo, registrando a los 60 días de cultivo 8.4 y 10 veces mayor actividad en tallos y raíces respectivamente. En la raíz, este resultado puede estar relacionado con el incremento en la bioacumulación de As en función del tiempo de exposición, ya que se encontró una correlación significativa entre ambas variables ($r=0.898$) (Figura 16). Estos resultados sugieren que esta enzima participa de manera importante en la detoxificación de As en *A. farnesiana*.

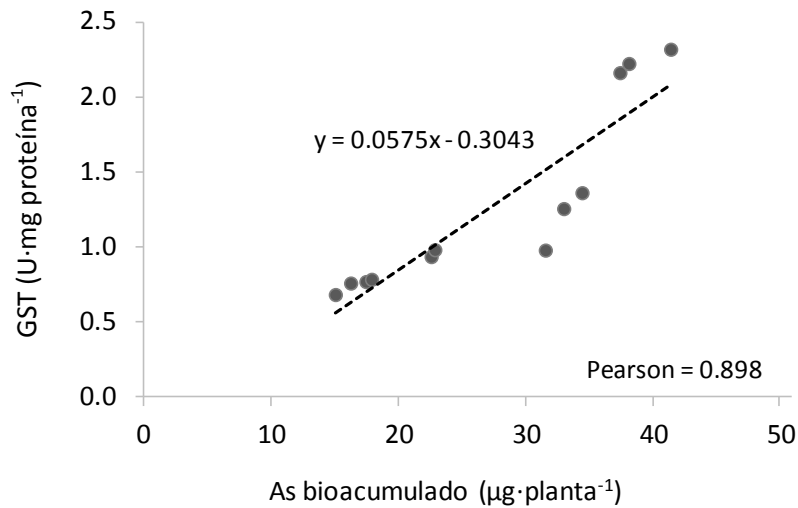


Figura 16. Correlación entre la actividad específica GST y la cantidad total de As bioacumulado en raíces de plántulas de *A. farnesiana* expuestas a 80 mg $\text{AsO}_4^{3-} \cdot \text{L}^{-1}$.

7.4.4.4 Actividades específicas relativas

Se evaluaron tres enzimas involucradas en el sistema de defensa a EPT, dos de ellas (CAT y POX) participan en el metabolismo de H_2O_2 , evitando o reduciendo el daño oxidante por la sobreproducción de ERO. La otra enzima estudiada, GST, participa en la detoxificación de EPT, en este caso As, catalizando su conjugación con glutatión o fitoquelatinas. La actividad de cada enzima se determinó en tejido de tallos y raíces por separado, ya que cada tejido muestra un metabolismo celular diferente definido por la condición fisiológica que desempeña y, por lo tanto, la defensa contra la toxicidad de cada EPT también difiere entre tejidos. Otro factor importante en la respuesta de la planta a estrés por metales y metaloides, es el grado de translocación del elemento tóxico de las raíces a los tallos (Ali *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad relativa G-POX, CAT y GST muestran, de manera general, que la raíz fue el tejido con mayor variación en la actividad de las enzimas en estudio por efecto del AsO_4^{3-} , lo que a su vez, también dependió del tiempo de cultivo (Figura 17). Este resultado puede atribuirse a la condición fisiológica del tejido, ya que por ser el órgano responsable de la absorción de agua y nutrientes, la raíz es el primer contacto con cualquier tipo de estrés abiótico en el suelo, y es susceptible de daño inmediato (Flores, 2004).

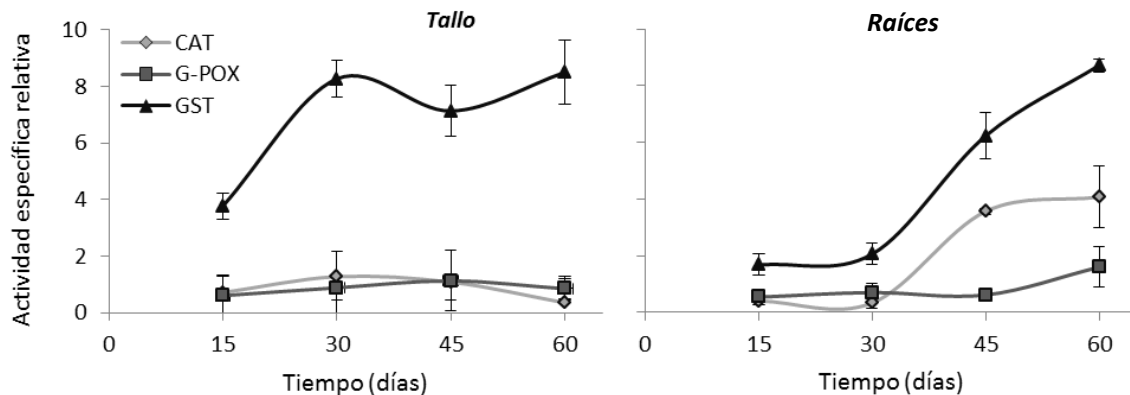


Figura 17. Actividad específica relativa CAT, G-POX y GST en tejido de tallos y raíces de *A. farnesiana* expuesta durante 60 días a $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AsO_4^{3-} (promedio \pm DE, $n=3$).

La disminución en la actividad relativa de las enzimas antioxidantes (CAT y POX), especialmente en la raíz, sugiere un efecto tóxico del As relacionado con el incremento de la LPO, el cual fue mayor en raíces que en tallos. No obstante, aunque la actividad específica CAT en raíz no mostró una tendencia clara, la actividad relativa muestra un claro aumento a los 45 y 60 días de exposición a As (Figura 17). Esto podría atribuirse a la activación en la expresión de CAT en respuesta al estrés oxidante, considerando que es una de las enzimas más eficientes para metabolizar el H_2O_2 (Königsberg, 2008). Sin embargo, con el fin de dilucidar la participación de esta enzima en *A. farnesiana* bajo estrés por arsenato es necesario cuantificar la posible activación en la expresión de CAT.

Los resultados obtenidos indican que es probable que uno de los principales mecanismos implicados en la tolerancia a As de *A. farnesiana* sea la destoxificación del elemento a través de la actividad GST. La actividad relativa de esta enzima, tanto en tallos como en raíces de *A. farnesiana*, demuestra que ésta es inducida por efecto del tiempo de exposición a arsenato lo cual, a su vez, incide en la bioacumulación del EPT en los tejidos.

Hasta donde sabemos, este estudio evalúa por primera vez la actividad de algunas enzimas involucradas en la defensa contra estrés por arsenato en *A. farnesiana*, que ha mostrado ser una especie altamente tolerante a dicho EPT. De lo anterior, los resultados demuestran que la actividad GST está claramente involucrada en la defensa de *A. farnesiana* contra la toxicidad del As que es bioacumulado en los tejidos. Nuestros resultados contribuyen a un mejor entendimiento de la tolerancia vegetal al As, uno de los elementos más tóxicos que se conocen para los seres vivos.

8. CONCLUSIONES

- Las semillas de *A. farnesiana* tratadas con H_2SO_4 por 20 min, mostraron un alto índice (93 %) de germinación y un bajo índice (6.7 %) de contaminación.
- El IT de plántulas de *A. farnesiana* disminuyó con el aumento en la concentración inicial de AsO_4^{3-} en un periodo de exposición de 45 días, encontrando una CI_{50} de $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
- El crecimiento (IT) de *A. farnesiana* se redujo significativamente por efecto de la exposición durante 30 y 45 días a una sub- CI_{50} de AsO_4^{3-} .
- *A. farnesiana* mostró una notable tolerancia y una alta capacidad de bioacumulación de As que depende del tiempo de exposición y de la concentración inicial de arsenato.
- La lipoperoxidación y las actividades CAT y GST, particularmente en raíces de *A. farnesiana*, fueron estimuladas por efecto de la exposición a AsO_4^{3-} durante 60 días.
- Se encontró una fuerte correlación entre la concentración de As bioacumulado en raíces y la actividad GST, lo que sugiere su relación con la tolerancia de la especie al As.

9. PERSPECTIVAS

Con base en el trabajo realizado y los resultados obtenidos, se recomienda el estudio de los siguientes aspectos con *A. farnesiana*:

- Más y diferentes variables, tales como la producción de ERO (H_2O_2) y moléculas antioxidantes (GSH y ASC), así como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (SOD) y destoxicantes (AR). La relación entre estas variables puede contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos de tolerancia al As.
- Respuesta antioxidante y destoxicante en *A. farnesiana* bajo estrés por arsenato en tiempos cortos (0-10 días). La actividad de enzimas y presencia de moléculas implicadas en la tolerancia al As, puede variar en función del tiempo de exposición al metaloide.
- Evaluar la influencia de una asociación endófito *A. farnesiana*-hongo en la tolerancia de la planta, así como la tolerancia y bioacumulación de arsénico por *A. farnesiana* y por una asociación endófito (*A. farnesiana*-hongo) en un suelo modelo y/o en residuos mineros. Actualmente se sabe, que la asociación endófito Planta-Hongo puede mejorar la tolerancia y fitorremediación por la planta de elementos tóxicos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. 1984. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Adriano D.C. Trace elements in the terrestrial environment Springer. New York, U.S.A. 1986.
- Al-Menaie H. S., Al-Ragam O., Al-Shatti A., Mathew M., Suresh N. 2010. The effects of different treatments on seed germination of the *Cassia fistula* L. and *Cassia nodosa* Buch.-Ham. ex Roxb. in Kuwait. *African Journal of Agricultural Research*. 5 (3): 230-235.
- Ali W., Isayenkov S. V., Zhao F., Maathuis M. J. F. 2009. Arsenite transport in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66: 2329–2339.
- Armienta M.A., Ongley L.K., Rodríguez R., Cruz O., Mango H., Villaseñor G. 2008. Arsenic distribution in mesquite (*Prosopis laevigata*) and huizache (*Acacia farnesiana*) in the Zimapán mining area, México. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*. 8:191–197.
- Audet, P. y C. Charest. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*. 147: 231-237.
- Babula P., Vojtech A., Opatrilova R., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 6:189–213.
- Baker A.J.M. 1987. Metal tolerance. *New Phytologist*, 106(1):93–111.
- Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Sidoli, C. M. D. y Reeves, R. D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plant. *Resources, Conversation and Recycling*. 11: 41-49.
- Bleeker P.M., Schat H., Vooijs R., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. 2003. Mechanisms of arsenate tolerances in *Cystisus striatus*. *New Phytologist*. 157:33–38.
- Brooks R.R., Lee J., Reeves R.D., Jaffre T. 1977. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Geochemical Journal*. 7:49–57.
- Brunner I, Luster J, Günthardt-Goerg MS, Frey B. 2008. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environmental Pollution*. 152:559–568.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. p. 302-310. En: Fleisher, S. y Packer, L. (Ed): *Methods in Enzymology*, Vol. 52. Academic Press. New York.
- Calabrese E.J., Bachmann K.A., Bailer A.J., Bolger P.M., Borak J., Cai L., Cedergreen N., Cherian M.G., Chiueh C.C., Clarkson T.W. 2007. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 122–128 pp.
- Camacho, F., Gonzáles V., Olivera A. Germinación y Manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonea viscosa* (L.) Jacq.). Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. México, D.F. 1992. 1-6 pp.
- Deng, H., Ye Z.H., Wong M.H. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution*. 132: 29-40.

- Diwan H., Khan I., Ahmad A., Iqbal M. 2010. Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*. 61: 10725-010-9454-0.
- Duan G-L., Zhu Y-G., Tong Y-P, Cai Ch., Kneer R. 2005. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese Brake Fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiology*. 138, 461–469.
- Edwards R., Dixon D.P. 2005. Plant Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology*. 401:169-183.
- Flores Hernández A. Introducción a la Tecnología de las Semillas. 1era Edición. Universidad Autónoma Chapingo, México. 2004. 61-78 pp..
- Garg N., Singla P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters*. 9:303–321.
- Gill L.S., Jagede R.O., Husaini S.W.H. 1986. Studies on the seed germination of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. *Journal of Tree Sciences*. 5(2): 92-97.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. En: (Ed). Jacoby, W.B. *Methods in Enzymology*. 77: 398–405.
- Hernández Z. M. Estudio de la acumulación de plomo y cadmio por *Asphodelus fistulosus* L. y *Brassica juncea* L. para fitorremediar jales. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Maestría en Biotecnología. 24 p. 2009.
- Hokura A., Omuma R., Terada Y., Kitajima N., Abe T., Saito H., Yoshida S., Nakai I. 2006. Arsenic distribution and speciation in an arsenic hyperaccumulator fern by X-ray spectrometry utilizing a synchrotron radiation source. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 21: 321–328.
- Huang, J. W., Cunningham S. D. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*. 134: 75–84.
- Kabata-Pendias A. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Koller C.E., Patrick J.W., Rose R.J., Offler C.E., MacFarlane G.R. 2007. *Pteris umbrosa* R. Br. as an arsenic hyperaccumulator: accumulation, partitioning and comparison with the established As hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere*. 66:1256–1263.
- Konigsberg F. M. 2008. Radicales libre y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Manual Moderno. México.
- Lal N. 2010. Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Ed. M. Ashraf et al. India.
- Lane B.S.D. y Martin E.S. 1977. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytologist*. 79: 281-286.
- Lin A. S., Lin C.R., Du Y.CH., Lübken T., Chiang M. Y., Chen I.H., Wu CH.CH., Hwang T.L., Chen S.L., Yen M.H., Chang F.R., Wu Y.CH., A.S Linl. 2009. Acasiane A and B acasiane A and B and farnesirane A and B, diterpene derivatives from the roots of *Acacia farnesiana*. *Planta Médica*. 75: 256–261.

- Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folinphenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193: 265–275.
- Ma L.Q., Komar K.M., Tu C., Zhang W., Cai Y., Kennelly E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic: a hardy versatile, fast growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature*, 409: 579.
- Maehly A.C. 1954. *Methods of Biochemical Analysis*. Ed. Glick. Interscience Publishers. New York.. 358 pp.
- Maldonado-Magaña A., Favela-Torres E., Rivera-Cabrera F., Volke-Sepulveda T.L. 2011. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil*. 339: 377–389.
- Marrs K. A.1996. The functions and regulation of glutathiones-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:127–58.
- McGrath S. P., Zhao F. J., Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advances in Agronomy*. 75: 1–56.
- Meagher R.B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:153–162.
- Meharg A.A., Macnair M.R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system; a mechanism of arsenate tolerance in *Holcuslanatus* L. *Journal of Experimental Botany*. 43:519–524.
- Mench M., Schwitzguébel J.P., Schroeder P., Bert V., Gawronski S., Gupta S. 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research*. 16:876–900.
- Méndez M. O., Maier M. 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*. 7:47–59.
- Mishra S., Srivastava S., Tripathi R.D., Kumar R., Seth C.S., Gupta D.K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*. 65:1027-1039.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi R.D., Trivedi P.K. 2008. Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L. *Aquatic Toxicology*. 86: 205–215.
- Mokgalaka-Matlala N., Flores-Tavizo E., Castillo-Michel H., Peralta-Videa J. R., Gardea-Torresdey J.L. 2009. Arsenic tolerance in mesquite (*Prosopis* sp.): Low molecular weight thiols synthesis and glutathione activity in response to arsenic. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 822–826.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8:199–216.

- Naumann B, Eberius M, Appenroth KJ. 2007. Growth rate based dose –response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *Journal of Plant Physiology*. 164:1656–1664.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. 2007. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Ongley L.K. Sherman L., Armienta A., Concilio A., Salinas C.F. 2007. Arsenic in the soils of Zimapán, Mexico. *Environmental Pollution*. 145: 793-799.
- Parrotta, J.A. 1992. *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Aroma, huisache. SO-ITF-SM-49. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. New Orleans, U.S.A. 6. pp
- Peralta-Pérez M. del R., Volke-Sepúlveda T. L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11:1-14.
- Pickering I.J., Gumaelius I. Harris H., Prince R., Hirsch G., Banks J., Salt D.E., George G.N. 2006. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environmental Science and Technology*. 40: 5010-5014.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 15–39.
- Prasad V.M.N. y Freitas de O.H.M. 2010. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (6): 122-129.
- Puga S., Sosa M., De la Mora A., Pinedo C., Jiménez J. 2006. Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22: 75-82.
- Reddy A.M., Kumar S.G., Jyothsnakumari G., Thimmanaik S., Sudhakar C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*. 60:97–104.
- Rolston M.P. 1978. Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review*. 44: 365-398.
- Salas S.F. 2007. Selección *in vitro* de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Especialización en Biotecnología. 24 pp.
- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gómez M., Romero P. M. C., Del Río L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism-induced Changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52: 2115-2126.
- Schützendübel A., Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1351–1365.
- Seregin I.V., Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48: 523–544.

- Sharma S.S., Dietz K. J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14: 43-50.
- Singh N., Ma L.Q., Srivastava M., Rathinsabapathi B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*. 170: 274–282.
- Smith I. K., Vierheller T. L., Thorne C. A. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*. 175: 408–13.
- Solis-Ibarra A. 2009. Fitorremediación de plomo por *Acacia farnesiana* (L) Willd en cultivos in vitro y determinación de enzimas antioxidantes involucradas. Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Posgrado en Biotecnología. Tesis de Especialización en Biotecnología. 53 pp.
- Srivastava M., Ma L.Q., Singh N., Singh S. 2005. Antioxidant responses of hyperaccumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*. 56: 1343–1349.
- Tongbin Ch., Chaoyang W., Zechun H., Qifei H., Quanguo L., Zilian F. 2002. Arsenic hyperaccumulator *Pteris Vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chinese Science Bulletin*. 47: 902-905.
- Van Assche F., Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*. 13:195-206.
- Vengadesan G., Ganapathi A., Amutha S., Selvaraj N. 2002. *In vitro* propagation of *Acacia* species. *Plant Science*. 163: 663-671.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:364–372.
- Visoottiviseth P., Francesconi K., Sridokchan W. 2002. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental Pollution*. 118: 453–461.
- Vithanage M., Dabrowska B., Mukherjee A., Sandhi A., Bhattacharya P. 2011. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental Chemistry Letters*. 10: 217-224.
- Volke Sepúlveda T., Velasco J. A., de la Rosa D. A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales* (INE-SEMARNAT). 141 pp.
- Wang J.R., Zhao F.J., Meharg A.A., Raab A., Feldmann J., McGrath S.P. 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*. 130:1552–1561.
- Zhao, F.J., Wang J. R., Barker J. H. A., Schat H., Bleeker P.M., McGrath S.P. 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*. 159: 403–410.
- Zhu N., Rosen H. 2009. Perspectives for genetic engineering for the phytoremediation of arsenic contaminated environments: from imagination to reality?. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 220–224.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00118

Matrícula: 2113801382

RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE
Acacia farnesiana (L.) WILLD
BAJO CONDICIONES DE ESTRES
POR ARSENICO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 25 del mes de noviembre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS
DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ



ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ILHUICE NEMI ALCANTARA MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. LAURA JOSEFINA PEREZ FLORES

VOCAL

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

VOCAL

DRA. LETICIA BUENDIA GONZALEZ

SECRETARIO

DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ