



---

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Biotecnología

## **MECANISMOS DE TOLERANCIA RELACIONADOS CON LA BIOACUMULACIÓN DE PLOMO POR *Dodonaea viscosa***

### **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**M. EN B. CÉSAR CUAHUTÉMOC ROJAS LORIA**

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPÚLVEDA

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

DIRECTORA

ASESOR

ASESOR

MÉXICO, D.F.

31 de marzo de 2014

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del CONACYT en el nivel de Competencia Internacional, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el No. de referencia 001466.**

México, D. F. a 31 de Marzo de 2014

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“MECANISMOS DE TOLERANCIA RELACIONADOS CON LA  
BIOACUMULACIÓN DE PLOMO POR *Dodonaea viscosa*”**

Que presentó:

**M. en B. César Cuahutémoc Rojas Loria**

**Comité Tutorial:**

**Directora:** Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

**Asesor:** Dr. Ernesto Favela Torres

**Asesor:** Dr. Humberto González Márquez

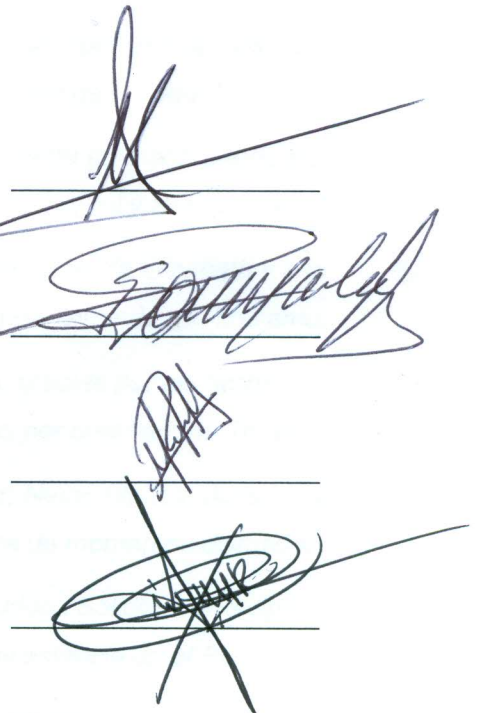
**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Secretario:** Dr. Humberto González Márquez  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Vocal:** Dra. María del Rosario Peralta Pérez  
Universidad Autónoma de Chihuahua

**Vocal:** Dr. Fernando Rivera Cabrera  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa por haberme permitido llevar a cabo este proyecto en sus instalaciones.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero recibido durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada.*

*A la Dra. Tania Volke Sepúlveda por su infinita paciencia, esfuerzo y apoyo que hicieron posible la culminación de este trabajo.*

*Al Dr. Ernesto Favela Torres y el Dr. Humberto González Márquez por su invaluable dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo.*

*A la Dra. María del Rosario Peralta Pérez y el Dr. Fernando Rivera Cabrera por sus valiosos comentarios en la revisión de esta Tesis.*

*Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por su apoyo y sus sabios consejos.*

## DEDICATORIAS

*A Dios, por ser mi guía. Te amo.*

*A mis padres Elpidio y Miriam por su amor incondicional, son mi mejor ejemplo de que todo se puede lograr con perseverancia y con paciencia. Los amo.*

*A mis hermanos Paola, Lorena e Israel por acompañarme siempre, por apoyarme y animarme cuando más lo necesito. Junto con mis padres son el pilar de mi vida. Los amo.*

*A las familias Cruz Rojas y Fierro Rojas por todo su apoyo y cariño pero sobre todo por regalarme a mis dos hermosos sobrinos: Emi y Sofi. Los amo.*

*A toda mi familia, en especial a mis abuelitos Miriam y Herculano, a mi tía Elizabeth y a la familia Cuellar Loria por estar siempre al pendiente de mí. Los amo.*

*A Karen por aparecer en mi vida cuando menos lo esperaba, gracias por los hermosos momentos que hemos compartido, pero sobre todo gracias por creer en mí. Te amo.*

*A mis amigos Gonzalo, Carlos, Marianela, Areli, Javier, Luis Víctor, Nemi, Blanca, Jose Luis, Adriana, Ailed y Jacqueline por ser mis confidentes y compañeros de momentos divertidos.*

*A mis compañeros y excompañeros del laboratorio de Residuos Sólidos por el apoyo recibido durante toda mi estancia en el Posgrado.*

*A la Dra. María Flores Cruz que, sin ser parte de mi comité tutorial, siempre me apoyó incondicionalmente.*

---

## RESUMEN

La contaminación de suelos por elementos potencialmente tóxicos (EPT) es una importante amenaza ambiental y de salud debido a que éstos no se degradan y entran fácilmente en la cadena trófica. El plomo (Pb) es uno de los EPT más abundantes, es altamente tóxico y se encuentra como contaminante en bastas áreas de suelos. La fitorremediación, que implica el uso de plantas tolerantes para acumular y/o estabilizar EPT, es una alternativa factible para remediar estos sitios. La acumulación de Pb por las plantas puede alterar procesos metabólicos importantes y generar estrés oxidante. Sin embargo, muchas plantas pueden resistir este elemento, a través de la activación de mecanismos de exclusión y/o tolerancia.

El objetivo de este trabajo fue determinar la resistencia de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. al Pb, a través del estudio de su capacidad de exclusión y de la activación de mecanismos de tolerancia relacionados con el glutatión (GSH) y la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa [CAT] y peroxidasa [G-POX]) y de conjugación (glutatión S-transferasa [GST]). Para lo anterior, se realizaron ensayos con agrolita bajo diferentes tratamientos con Pb. Cuando *D. viscosa* se expuso a diferentes concentraciones de Pb por 45 días, se encontró una concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 2228 mg kg<sup>-1</sup> de agrolita seca (AS). Lo anterior indica una alta resistencia, principalmente debida a la exclusión de este elemento ya que, independientemente del tratamiento, ~90% del Pb total bioacumulado fue retenido en las raíces sin observar signos de fitotoxicidad. En plantas expuestas a una concentración sub-CI<sub>50</sub> de Pb (2000 mg kg<sup>-1</sup> AS) para estudiar el efecto del tiempo sobre la tolerancia y bioacumulación, se encontró que del Pb total bioacumulado en 105 días, ~90% fue retenido en raíces y el 40% se bioacumuló durante los primeros 10 días a una tasa de 0.476 µg planta día<sup>-1</sup>. El estrés causado por la alta tasa inicial de bioacumulación se relacionó con un aumento en la producción de GSH (~1.3 veces) y en la actividad GST (≤3.5 veces). Lo anterior condujo a una correlación negativa entre ambas variables y el Pb bioacumulado, indicando su participación conjunta en la detoxificación. Las actividades G-POX y CAT se incrementaron (≤1.3 y ≤3.3 veces, respectivamente) por efecto del Pb y se correlacionaron positivamente con el metal bioacumulado, sugiriendo que el sistema antioxidante de *D. viscosa* contribuye de forma importante a la tolerancia. *D. viscosa* es una especie que resiste la exposición a altas concentraciones de Pb debido a la activación de mecanismos tanto de exclusión (retención en raíz) como de tolerancia.

**Palabras clave:** fitorremediación, plomo, *D. viscosa*, estrés oxidante, tolerancia.

---

---

## ABSTRACT

The soil pollution by potentially toxic elements (PTE) is a serious environmental and human health threat because they are non-degradable and are easily incorporated into the food chain. Lead (Pb) is one of the most abundant PTE, is highly toxic and it can be found as a pollutant in vast areas of soils. Phytoremediation, which involves the use of plants tolerant to bioaccumulate and/or stabilize PTE, is a feasible option to remediate these sites. Pb accumulation by plants can alter important metabolic processes and produce oxidative stress. However, many plant species can resist and accumulate this element through exclusion and/or tolerance mechanisms.

The aim of this research was to assess the resistance to Pb by *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. through the study of both its avoidance (exclusion) ability and the activation of tolerance mechanisms associated to glutathione (GSH) and the activity of antioxidant (catalase [CAT] and peroxidase [G-POX]) and conjugation (glutathione S-transferase [GST]) enzymes. For that purpose, trials with perlite under different Pb treatments were carried out. When *D. viscosa* was exposed to different Pb concentrations, a half-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 2228 mg kg<sup>-1</sup> of dry perlite (DP) was found. This indicates a high resistance mainly attributed to its exclusion since, independently of the treatment, ~90% of the total bioaccumulated Pb was retained in the roots without any phytotoxicity sign. In plants exposed to a sub- $IC_{50}$  concentration of Pb to study the effect of time on tolerance and bioaccumulation, we found that from the total Pb bioaccumulated in 105 days, ~90% was retained in roots and 40% was bioaccumulated during the first 10 days at a rate of 0.476 µg plant day<sup>-1</sup>. The stress caused by the high initial rate of bioaccumulation was associated with an increased GSH production (~1.3-fold) and GST activity (≤3.5-fold). This led to a negative correlation between both variables and the bioaccumulated Pb, indicating their coordinated participation in the detoxification. G-POX and CAT activities increased (≤1.3 and ≤3.3-fold, respectively) by effect of Pb and were positively correlated with the bioaccumulation, suggesting that the antioxidant system in *D. viscosa* contributes significantly to tolerance. Thus, *D. viscosa* is a species that withstands the exposure to high Pb concentrations due to the activation of both exclusion (root retention) and tolerance mechanisms.

**Keywords:** phytoremediation, lead, *D. viscosa*, oxidative stress, tolerance.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AH<sub>2</sub></b> : Sustrato oxidable	<b>GST</b> : Glutación S-transferasa
<b>APX</b> : Ascorbato peroxidasa	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peróxido de hidrógeno
<b>AS</b> : Agrolita seca	<b>IT</b> : Índice de tolerancia
<b>ASC</b> : Ascorbato	<b>MDHA</b> : Mono-dehidroascorbato
<b>CAT</b> : Catalasa	<b>MDHAR</b> : Mono-dehidroascorbato reductasa
<b>CI<sub>50</sub></b> : Concentración inhibitoria media	<b>MT</b> : Metalotioneínas
<b>DHA</b> : Dehidroascorbato	<b>NP-SH</b> : Tióles no proteicos
<b>DHAR</b> : Dehidroascorbato reductasa	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> : Oxígeno singulete
<b>EPT</b> : Elementos potencialmente tóxicos	<b>•O<sub>2</sub>•</b> : Radical superóxido
<b>ERO</b> : Especies reactivas de oxígeno	<b>•OH</b> : Radical hidroxilo
<b>FQ</b> : Fitoquelatinas	<b>Pb</b> : Plomo
<b>FT</b> : Factor de translocación	<b>PCA</b> : Análisis de componentes principales
<b>GPOX</b> : Guayacol peroxidasa	<b>PF</b> : Peso Fresco
<b>GPX</b> : Glutación peroxidasa	<b>PS</b> : Peso Seco
<b>GR</b> : Glutación reductasa	<b>POX</b> : Peroxidasas (no específica)
<b>GSSG</b> : Glutación disulfuro	<b>RB<sub>B</sub></b> : Relación raíz-brote (biomasa)
<b>GSH/GSSG</b> : Relación GSH/GSSG	<b>RB<sub>L</sub></b> : Relación raíz-brote (longitud)
<b>GSH</b> : Glutación	<b>RuBP</b> : Ribulosa-1,5-bisfosfato
<b>GSH<sub>T</sub></b> : Glutación total	<b>SOD</b> : Superóxido dismutasa

---

---

# ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN .....	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
1.1 Los elementos potencialmente tóxicos (EPT) en el suelo .....	4
1.2 Efectos de los EPT en las plantas .....	5
1.3 Efecto del Pb en las plantas.....	6
1.4 Estrés oxidante.....	7
1.5 Mecanismos de resistencia a EPT.....	13
1.6 <i>Dodonaea viscosa</i> .....	26
2 JUSTIFICACIÓN .....	28
3 HIPÓTESIS.....	30
4 OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos particulares .....	33
5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1 Estrategia experimental general.....	35
5.2 Material biológico .....	36
5.3 Ensayos de resistencia y bioacumulación .....	37
5.4 Ensayos cinéticos (respuesta antioxidante).....	37
5.5 Cuantificación del crecimiento de <i>D. viscosa</i> .....	38
5.6 Análisis de glutatión y actividades enzimáticas.....	38
5.7 Análisis de Pb .....	42
5.8 Análisis estadístico .....	43
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
6.1 Resistencia y acumulación de Pb por <i>D. viscosa</i> .....	45
6.2 Cinética de bioacumulación de plomo por <i>D. viscosa</i> .....	53
6.3 Tolerancia a plomo por <i>D. viscosa</i> : respuesta antioxidante .....	61
7 CONCLUSIONES .....	77
8 PERSPECTIVAS .....	79
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
ANEXO I. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP) .....	97
ANEXO II. PUBLICACIONES Y CONGRESOS .....	99

---



---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de algunas ERO en tejidos vegetales.....	11
<b>Tabla 2.</b> Relación raíz-brote (biomasa y longitud) de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días .....	48
<b>Tabla 3.</b> Indicadores del potencial fitorremediador de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días .....	52
<b>Tabla 4.</b> Indicadores del potencial fitorremediador de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 10, 25, 45 y 105 días .....	60

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista general de los efectos tóxicos causados por el Pb en las plantas .....	7
<b>Figura 2.</b> Generación de ERO a partir de oxígeno en estado triplete, mediante la redistribución electrónica o por reducción secuencial con un electrón .....	8
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de generación de ERO en plantas .....	9
<b>Figura 4.</b> Formación del radical hidroxilo ( $\bullet$ OH) a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	10
<b>Figura 5.</b> Respuestas de plantas superiores contra la toxicidad por EPT .....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura química de las fitoquelatinas (FQ) .....	17
<b>Figura 7.</b> Estructura esquemática del complejo formado entre el GSH y los EPT por acción de la GST .....	18
<b>Figura 8.</b> Estructura esquemática del glutatión (GSH) mostrando su grupo tiólico (SH) ..	20
<b>Figura 9.</b> Rutas de detoxificación de ERO en plantas .....	23
<b>Figura 10.</b> Semillas, tallos con hojas, flores y frutos de <i>Dodonaea viscosa</i> L. (Jacq.). ....	27
<b>Figura 11.</b> Estrategia experimental general.....	35
<b>Figura 12.</b> Producción de biomasa (peso seco, PS) de brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días .....	46
<b>Figura 13.</b> Elongación de brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días .....	47
<b>Figura 14.</b> Bigráfica de puntuaciones ( $\bullet$ ) y cargas de cada una de las variables analizadas para el CP1 y CP2 .....	49
<b>Figura 15.</b> Índice de tolerancia (IT-BM <sub>r</sub> ) de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días .....	50
<b>Figura 16.</b> Bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días.....	51
<b>Figura 17.</b> Efecto del tiempo de exposición a 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS sobre la producción de biomasa (peso seco, PS) de brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> .....	54
<b>Figura 18.</b> Efecto del tiempo de exposición a 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS sobre la elongación de brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> .....	55
<b>Figura 19.</b> Bigráfica de puntuaciones ( $\bullet$ ) y cargas de cada una de las variables analizadas para el CP1 y CP2 .....	56
<b>Figura 20.</b> Cinética del efecto de la exposición a 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS sobre el índice de tolerancia (IT-BM <sub>r</sub> ) de plántulas de <i>D. viscosa</i> crecidas en condiciones <i>in vitro</i> por 105 días. ....	58
<b>Figura 21.</b> Bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	59
<b>Figura 22.</b> Cinética de producción de GSH y GSSG en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a una concentración de 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS .....	62

---

---

<b>Figura 23.</b> Relación GSH/GSSG en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> expuestas a 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días .....	63
<b>Figura 24.</b> Grado de oxidación en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	64
<b>Figura 25.</b> Análisis de correlación entre el Pb bioacumulado y el contenido de GSH en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	65
<b>Figura 26.</b> Análisis de correlación entre el contenido de GSH y la actividad GST en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días..	65
<b>Figura 27.</b> Actividad GST en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días. ....	66
<b>Figura 28.</b> Análisis de correlación entre el Pb bioacumulado y la actividad GST en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días. ...	67
<b>Figura 29.</b> Actividad G-POX en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días. ....	68
<b>Figura 30.</b> Análisis de correlación entre la actividad G-POX y la bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 0, 10, 25, 45 y 105 días. ....	69
<b>Figura 31.</b> Análisis de correlación entre la actividad G-POX y el índice de tolerancia (IT) en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	70
<b>Figura 32.</b> Actividad CAT en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días. ....	71
<b>Figura 33.</b> Análisis de correlación entre la actividad CAT y la bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	72
<b>Figura 34.</b> Análisis de correlación entre la actividad CAT y el índice de tolerancia en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días..	72
<b>Figura 35.</b> Contenido de proteína en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días .....	74
<b>Figura 36.</b> Índice proteico en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días .....	74
<b>Figura 37.</b> Análisis de correlación entre el contenido de proteína y la bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de <i>D. viscosa</i> tratadas con 2000 mg Pb kg <sup>-1</sup> AS durante 105 días.....	75

---

## **INTRODUCCIÓN**

La expansión tan rápida de la urbanización así como de las actividades industriales como la minería, el transporte y la agricultura intensiva, entre otros, son una amenaza para el ambiente y el bienestar de la humanidad. Los elementos potencialmente tóxicos (EPT) como el plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), arsénico (As) y mercurio (Hg) se han clasificado como contaminantes ambientales poderosos, ya que no se degradan y pueden entrar con gran facilidad a la cadena alimenticia (Sengar *et al.*, 2008). El Pb es uno de los EPT más abundantes en la tierra, es muy tóxico y puede presentarse en la atmósfera en polvos, humo y vapores, o en el suelo en forma de minerales. Entre las fuentes más importantes de contaminación de suelos con Pb se encuentran la meteorización geológica, el procesamiento de minerales y la lixiviación a partir de residuos sólidos. El Pb puede también depositarse en el suelo debido al uso de gasolinas adicionadas con tetraetilo de plomo (Pilgrim y Hughes, 1994; U.S. EPA, 2006).

El Pb puede incorporarse a un organismo vivo a través de la respiración, la digestión y por vía cutánea (Carruyo *et al.*, 2008). En el ser humano, la inhalación es la vía principal, pero también puede incorporarse a través de la digestión y la reabsorción en el tracto gastrointestinal, particularmente en personas con deficiencia de hierro y calcio (Wong *et al.*, 2002). Se considera un carcinógeno probable (U.S. EPA, 2006) y puede afectar casi todos los órganos y sistemas del ser humano, siendo los sistemas hematopoyético y nervioso central los más afectados (Patocka y Cerný, 2003).

A pesar de la toxicidad del Pb, ciertas especies de plantas toleran su presencia mediante mecanismos que favorecen su remoción (fitoextracción) o su estabilización en el suelo (fitoestabilización) (Adriano, 1986). Una tecnología que aprovecha esta capacidad es la fitorremediación, que hace uso de plantas y los microorganismos asociados para remover, contener y/o estabilizar contaminantes presentes en suelos, agua y aire (Pilon-Smits, 2005). Así, la fitorremediación representa una alternativa ambientalmente amigable para la remediación y tratamiento de suelos contaminados con EPT (U.S. EPA, 2000).

No obstante, una consecuencia de la acumulación de EPT en las plantas es que se alteran procesos metabólicos importantes como la fotosíntesis, la respiración, la mitosis y la división celular. Como consecuencia a la condición de estrés que la presencia de EPT produce, ocurre una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que, si no es controlada, conduce a estrés oxidante (Sharma y Dubey, 2005; De Vizcaya y Del Razo, 2008). Para evitar tal situación, las plantas han desarrollado varios mecanismos de

tolerancia que involucran moléculas y enzimas antioxidantes que eliminan o transforman las ERO, así como enzimas y proteínas implicadas en reacciones de conjugación y secuestro de EPT (Manara, 2012). Esta serie de mecanismos se relaciona con la capacidad de plantas como *D. viscosa* para tolerar la presencia intracelular de EPT.

*D. viscosa* es un arbusto cuyo potencial para la fitorremediación de EPT ha sido demostrada (Rojas-Loria *et al.*, 2012), por lo que conocer los mecanismos de su tolerancia puede mejorar los procesos de fitorremediación.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la resistencia de *D. viscosa* al Pb a través del estudio de su capacidad de exclusión y de la activación de mecanismos de tolerancia relacionados con el glutatión y la actividad de enzimas antioxidantes y de conjugación. El primer capítulo de este documento comprende una revisión bibliográfica que incluye una breve descripción del problema de la contaminación de suelos por EPT y el uso de la fitorremediación como alternativa para su recuperación. Se revisan algunos de los efectos tóxicos provocados por la acumulación de EPT en las plantas y su importancia como detonante de estrés oxidante. Particularmente, los efectos del Pb sobre el crecimiento y desarrollo vegetal y su relación con la sobreproducción de ERO. Por último se revisa la relación entre algunos de los mecanismos de defensa antioxidante y la bioacumulación de EPT.

En los capítulos dos, tres y cuatro se plantea el problema que justifica el estudio, la hipótesis a demostrar y los objetivos a cumplir. En el capítulo cinco se presenta la estrategia general de trabajo y se detallan los materiales y métodos utilizados con el fin de determinar: (i) la resistencia y bioacumulación, (ii) la respuesta antioxidante, y (iii) la actividad de una enzima de conjugación (GST); en plántulas de *D. viscosa* tratadas con Pb. Los resultados y discusión del trabajo se presentan en el capítulo seis. Se analiza y discute el efecto de la concentración de Pb ( $\leq 3000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ AS}$ ) sobre la bioacumulación y crecimiento de *D. viscosa*. A partir de estos resultados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de conocer la variable más sensible a la presencia de Pb y se estimó el índice de tolerancia (IT) a Pb. En la segunda etapa, se evaluó el efecto de diferentes tiempos de exposición a una sub- $\text{Cl}_{50}$  de Pb sobre el crecimiento, bioacumulación y respuesta antioxidante de *D. viscosa*. Finalmente, se relacionó la respuesta antioxidante de *D. viscosa* con la bioacumulación de Pb. En los últimos dos capítulos, se presentan las conclusiones y algunas perspectivas que surgen de este estudio.

# **1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 Los elementos potencialmente tóxicos (EPT) en el suelo

La contaminación de los suelos por elementos potencialmente tóxicos (EPT) se ha incrementado considerablemente, como consecuencia del empleo intensivo de agroquímicos, de los residuos generados por actividades de minería, fundición y del riego con aguas residuales (Adriano, 1986; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Se consideran EPT a aquellos elementos esenciales y no esenciales que pueden generar síntomas de toxicidad e inhibir el crecimiento de las plantas (Dietz *et al.*, 1999). En este grupo podemos encontrar elementos que están presentes en forma de cationes ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{2+}$ ) y que, en niveles traza, desempeñan un papel importante en reacciones bioquímicas y en el metabolismo de las plantas (Yadav, 2010). Por otra parte, otros elementos como el Pb, Cd, Hg, As y Si se caracterizan por ser tóxicos para las plantas (aún en bajas concentraciones), actuando como “venenos” metabólicos de procesos fisiológicos e inhibiendo algunos sistemas enzimáticos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). A diferencia de los contaminantes orgánicos, los EPT no pueden ser degradados, por lo que su concentración excesiva en los suelos provoca un problema ambiental importante debido a los efectos tóxicos que producen sobre los organismos con que entran en contacto (Adriano, 1986)

Con el fin de restaurar los suelos contaminados por EPT se han desarrollado métodos fisicoquímicos que, si bien ayudan a solventar en parte el problema, tienen la desventaja de ser muy costosos y alterar las propiedades originales de los suelos. Por lo anterior, recientemente, su aplicación ha sido remplazada paulatinamente por alternativas biológicas amigables con el ambiente, de bajo costo, como la fitorremediación. Esta tecnología aprovecha la capacidad de plantas tolerantes para estabilizar, extraer, degradar o volatilizar los contaminantes (orgánicos e inorgánicos) presentes en el suelo, agua o aire; aprovechando también las interacciones que establecen con los microorganismos que habitan su rizósfera (Pilon-Smits, 2005).

La fitorremediación es una tecnología que ha ganado aceptación en los últimos años debido a los bajos costos y mantenimiento que implica su aplicación. Los cambios en las políticas internacionales sobre el desarrollo sustentable y cuidado del ambiente han sido un factor importante para que algunos gobiernos inicien la implementación de tecnologías “verdes” (Pilon-Smits, 2005). El éxito de esta tecnología depende de varios factores entre los que se incluyen: i) el tipo de superficie contaminada, ii) la cantidad de elemento disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas y iii) la capacidad de las plantas para absorber y

acumular los EPT en sus tejidos (Ernst, 1996). Para que la aplicación de esta tecnología sea viable, resulta indispensable conocer la toxicidad potencial de los elementos presentes en el suelo. Lo anterior depende, en gran medida, de la biodisponibilidad, es decir, de la cantidad del elemento que puede ser absorbido por la biota. Esta propiedad de los EPT está relacionada con las condiciones fisicoquímicas del ambiente en que se encuentra (pH, temperatura, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico de la fase sólida y la competencia entre iones), las que, a su vez, determinan la especiación del elemento, y por tanto, la concentración biodisponible para un organismo (Göthberg *et al.*, 2004).

Comparada con los métodos tradicionales, la fitorremediación presenta la desventaja de ser una tecnología de remediación a largo plazo. Debido a esto, es necesario considerar aquellos factores que puedan optimizar este proceso, por lo que es indispensable conocer las condiciones que prevalecen en la zona que se quiere remediar (tipo de suelo y sus propiedades fisicoquímicas, condiciones climatológicas, el tipo y nivel del contaminante) para poder realizar una selección adecuada de especies de plantas que se adapten mejor a las condiciones del medio (Peuke y Rennenberg, 2005; Wuana y Okieimen, 2011).

## 1.2 Efectos de los EPT en las plantas

Los efectos causados por la acumulación de EPT en las plantas son variados y tienen una relación estrecha con la etapa del crecimiento del organismo (Peralta-Videa *et al.*, 2004). Estos efectos pueden ser: (i) alteración del transporte/absorción de agua y nutrientes esenciales; (ii) modificación de la tasa de división celular; (iii) inhibición de la fotosíntesis; (iv) modificaciones en la membrana y aumento en el estrés oxidante (Wang, 1996; Cheng, 2003). En etapas tempranas, los EPT pueden alterar la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas, así como, inhibir la diferenciación de órganos reproductivos. Estas modificaciones están relacionadas con alteraciones en la tasa de división celular (Cheng, 2003), debido a la exposición a elementos como Cd, Hg y Pb. Estos EPT pueden interactuar con ácidos nucleicos, dañando la estructura del núcleo, así como inhibir la actividad de enzimas de replicación como las DNA y RNA polimerasas, dando como resultado una interrupción en la síntesis de DNA que afecta la división celular (Sharma y Dubey, 2005).

Los EPT inhiben la fotosíntesis, al modificar la micro-estructura de los cloroplastos (principalmente la composición de la membrana tilacoidal) y al alterar el sistema enzimático encargado de la síntesis de clorofilas (Peng y Wang, 1991). Pueden también afectar la función de los fotosistemas I y II (PSI y PSII), debido a que modifican las proteínas



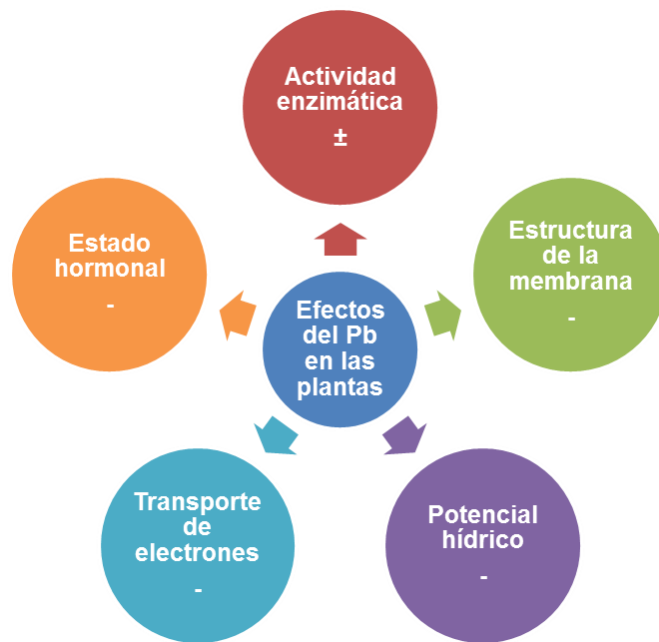
asociadas a la clorofila encargadas de tomar los protones durante el proceso (Yang *et al.*, 1989). El Hg puede alterar la movilización de agua dentro de las plantas al unirse a proteínas transportadoras llamadas acuaporinas y provocar el cierre de estomas, lo que representa una barrera física para el flujo de este compuesto (Yadav, 2010). EPT como el Pb, Zn, Cu y Cd pueden limitar la absorción de nutrientes inorgánicos en las plantas; por ejemplo, pueden sustituir elementos esenciales como el Fe, provocando su deficiencia y generando desordenes fisiológicos como la clorosis en hojas jóvenes (Yadav, 2010). La acumulación a largo plazo de niveles altos de EPT puede interferir con la actividad mitocondrial e inducir estrés oxidante, disparando la generación de ERO. Esto conduce a una condición conocida como estrés oxidante, que produce la peroxidación de lípidos de la membrana (modificando su permeabilidad) y altera el metabolismo celular de las plantas (Messer *et al.*, 2005; Cargnelutti *et al.*, 2006; Israr *et al.*, 2006).

A pesar de que generalmente estos elementos son potencialmente tóxicos para las plantas y otros organismos, no todos sus efectos son negativos. Existen casos en que EPT como el Hg pueden estimular el crecimiento de las plantas cuando se encuentran en concentraciones bajas (Ma y Hong, 1998). Este fenómeno es una respuesta adaptativa a la presencia de bajas dosis de un contaminante determinado, la cual se caracteriza por un estímulo en ciertas variables fisiológicas y una inhibición posterior al incrementar la dosis (Calabrese *et al.*, 2007). Lo anterior ocurre debido a que niveles bajos de estrés por EPT estimulan la actividad de enzimas como las amilasas, proteasas y lipasas, además de que pueden acelerar la descomposición del endospermo y la tasa de respiración, provocando que la germinación ocurra de forma más rápida (Ma y Hong, 1998). Otras moléculas que pueden incrementarse por este fenómeno son el glutatión (GSH), ácido oxálico, histidina, citrato y proteínas de unión a EPT, utilizadas en las vías de detoxificación (Cheng, 2003).

### **1.3 Efecto del Pb en las plantas**

Dentro de los EPT que afectan a las plantas, el Pb se encuentra dentro de los más tóxicos y que con mayor frecuencia se encuentra en el suelo. Se ha reportado como el segundo elemento más peligroso después del As, basado en su frecuencia de ocurrencia, toxicidad y potencial de exposición hacia los seres vivos (ATSDR, 2003). Además, su peligrosidad radica en que continúa siendo utilizado en una gran variedad de procesos industriales y está ampliamente distribuido en el ambiente (Pourrut *et al.*, 2011).

Particularmente, la presencia de Pb en las plantas puede conducir a la destrucción de biomoléculas y alteraciones en el metabolismo. Algunos de los efectos fitotóxicos del Pb son visibles y, entre ellos, se encuentran síntomas como la necrosis, la clorosis, así como el oscurecimiento y disminución de la longitud de raíces. Otros signos no visibles, incluyen disminución en la producción de fitohormonas, alteraciones en el transporte de electrones durante la fotosíntesis, disminución en el potencial hídrico, alteración de la permeabilidad de la membrana, disminución en la capacidad de absorción de minerales esenciales y, en casos extremos, inhibición o disminución de algunas actividades enzimáticas. Todos estos eventos ocasionan, finalmente, alteraciones en varios procesos fisiológicos (Sharma y Dubey, 2005) (Figura 1).



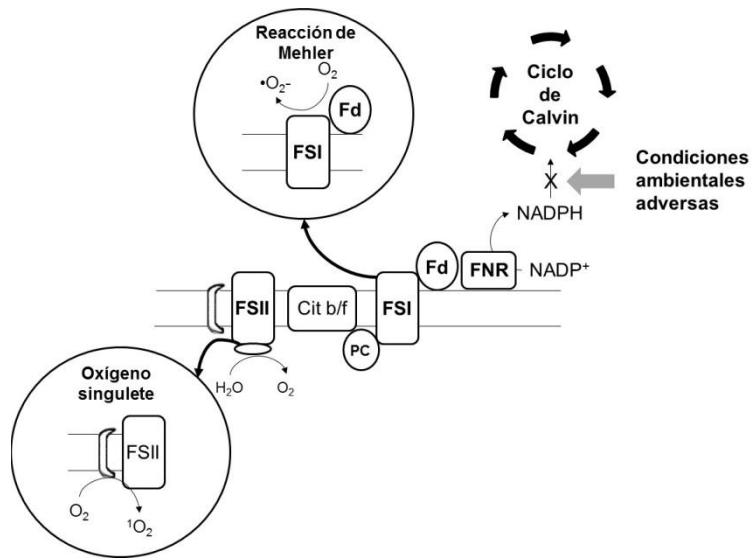
**Figura 1.** Vista general de los efectos tóxicos causados por el Pb en las plantas. Los signos “+” y “-” indican efectos positivos y negativos, respectivamente (modificado de Sharma y Dubey, 2005).

#### 1.4 Estrés oxidante

Una característica que comparten todos los organismos aerobios, es la utilización de oxígeno molecular ( $O_2$ ) como aceptor final de electrones durante la respiración. En las células, puede transformarse hasta formar  $H_2O$  a través de una serie de reacciones que forman parte del metabolismo normal. Como consecuencia de este proceso se producen intermediarios conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), que incluyen



con una velocidad intensa en el flujo de electrones (Rivera *et al.*, 2008). En los brotes y hojas de las plantas, los cloroplastos y los peroxisomas son los sitios principales de producción de ERO. El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) se forma, principalmente, en los cloroplastos por la foto-excitación de la clorofila dentro del FS II, en donde, un electrón se eleva a un orbital de energía superior, liberando al oxígeno de su estado de *spin* restringido y favoreciendo su reacción con moléculas orgánicas. Otra ERO producida durante la fotosíntesis, es el superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), generado en el FSI a través de la reacción de Mehler (Figura 3) (Niyogi, 1999).



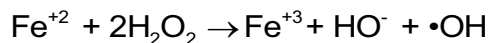
**Figura 3.** Mecanismo de generación de ERO en plantas. Las condiciones ambientales adversas causan la inactivación de varias enzimas del ciclo de Calvin, conduciendo a la sobre reducción de la cadena fotosintética de transporte de electrones. Como consecuencia, el exceso de energía y de electrones es transferido al  $\text{O}_2$  para generar el oxígeno singlete y el superóxido (Carrillo y Valle, 2005).

Entre los factores que favorecen el incremento en la producción de  $\bullet\text{O}_2^-$  se encuentran las condiciones limitantes de fijación de  $\text{CO}_2$ , como el estrés hídrico, lumínico o de temperatura. Por ejemplo, en las plantas  $\text{C}_3^1$ , la baja fijación de  $\text{CO}_2$  puede además generar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mediante la activación de la vía de la fotorrespiración dentro de los peroxisomas, en una reacción catalizada por la enzima glicolato-oxidasa (Rivera *et al.*, 2008). El  $\bullet\text{O}_2^-$  producido en los peroxisomas y la membrana plasmática (mediante la

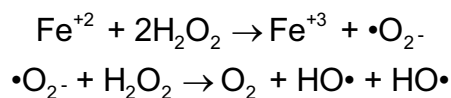
<sup>1</sup> La fijación de  $\text{CO}_2$  ocurre a través del ciclo de Calvin, donde reacciona con la RuBP y es convertido en 2 moléculas de ácido 3-fosfoglicérico, en una reacción catalizada por la enzima conocida como RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa).

NADPH-oxidasa) puede dar lugar a la formación de otras ERO como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y al radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), a través de la reacción de Fenton, catalizada por metales de transición libres como Fe y Cu. Existe además la reacción de Haber-Weiss, que forma  $\bullet\text{OH}$  partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\bullet\text{O}_2^-$ . Esta última es muy lenta, y es catalizada por el Fe en estado de oxidación (III) (Valko *et al.*, 2005) (Figura 4).

#### Reacción de Fenton



#### Reacción de Haber-Weiss



**Figura 4.** Formación del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. En el caso de la reacción de Fenton, el  $\text{Fe}^{+3}$  puede ser sustituido por otro metal de transición como el  $\text{Cu}^{+2}$  (Valko *et al.*, 2005).

En los microcuerpos (peroxisomas, glioxisomas, glicosomas), la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocurre durante el catabolismo de los lípidos, como un subproducto de la oxidación de los ácidos grasos. En el caso de las mitocondrias, la sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones es la fuente de producción principal de  $\bullet\text{O}_2^-$  bajo condiciones de estrés específicas (Rivera *et al.*, 2008).

Cada una de estas ERO posee características específicas que la distinguen de otras. Por ejemplo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la especie más estable de todas, con una vida media de 1 ms y una concentración en los tejidos vegetales en un intervalo de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ , dependiendo del compartimento celular en que se encuentre. En contraparte, ERO como el  $^1\text{O}_2$ , el  $\bullet\text{O}_2^-$  y el radical  $\bullet\text{OH}$  tienen una vida media muy corta y su concentración celular es muy baja (Tabla 1) (Møller *et al.*, 2007).

Como se observa en la Tabla 1, otra característica de las ERO es su reactividad, ya que mientras el  $\bullet\text{OH}$  reacciona rápidamente con cualquier tipo de componente celular, el  $\bullet\text{O}_2^-$  reacciona únicamente con proteínas que poseen centros Fe-S, y el  $^1\text{O}_2$  con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Así, las propiedades de cada ERO determina la forma en que reaccionan con los componentes celulares (Mittler, 2002).

**Tabla 1.** Características de algunas ERO en tejidos vegetales (Møller *et al.*, 2007).

Característica	$^1\text{O}_2$	$\bullet\text{O}_2^-$	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\bullet\text{OH}$
Vida media*	1 $\mu\text{s}$	1 $\mu\text{s}$	1 ms	1 ns
Distancia recorrida**	30 nm	30 nm	1 $\mu\text{m}$	1 nm
Concentración celular	¿?	¿?	¿?	$\mu\text{M}$ -mM
<b>Reacciona con:</b>				
Lípidos	PUFA***	Casi nunca	Casi nunca	Rápidamente
ADN	Principalmente guanina	No	No	Rápidamente
Carbohidratos	No	No	No	Rápidamente
Proteínas	Trp, His, Tyr, Met, Cys	Centros Fe-S	Cisteína	Tyr, Trp, Phe, Met

\* Vida media en sistemas biológicos

\*\* Distancia recorrida durante su vida media, asumiendo un coeficiente de difusión de  $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

\*\*\* Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

En condiciones de crecimiento normales, la producción de ERO en las células vegetales es baja (en cloroplastos es de  $240 \mu\text{M seg}^{-1}$  y de  $0.5 \mu\text{M seg}^{-1}$  para el  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente); sin embargo, existen factores detonadores de estrés oxidante que incrementan su producción (hasta  $720 \mu\text{M seg}^{-1}$  de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $15 \mu\text{M seg}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Algunos de estos factores son la sequía y desecación, el estrés salino, el choque térmico, la acumulación de EPT, la radiación ultravioleta, los contaminantes del aire, como  $\text{O}_3$  y  $\text{SO}_2$ , el estrés mecánico, la carencia de nutrientes, el ataque de patógenos y el estrés por alta intensidad lumínica (Rivera *et al.*, 2008).

A pesar de su alta reactividad y del daño potencial que pueden provocar sobre los componentes celulares, las ERO son moléculas utilizadas dentro de procesos de señalización importantes en las plantas, por lo que su producción dentro de las células es necesaria (Apel y Hirt, 2004). Algunos de los procesos de señalización que involucran a las ERO incluyen la inducción de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y su relación con la respuesta a condiciones de estrés (Kovtun *et al.*, 2000). Las ERO en plantas, pueden también regular la función de fosfatasa involucradas en la inactivación de MAPK y en la síntesis de ácido abscísico (ABA), un regulador de crecimiento vegetal (Meinhard y Grill, 2001; Meinhard *et al.*, 2002).

### 1.4.2 Estrés oxidante asociado con la acumulación de EPT en plantas

Dentro de los factores mencionados, la bioacumulación de EPT influye de forma importante sobre la generación de estrés oxidante en las plantas. Algunos elementos como Pb, Hg, Cr, Cd y As, están implicados en reacciones de transferencia de electrones que incluyen al oxígeno, favoreciendo la formación de radicales tóxicos (Ercal *et al.*, 2001).

Uno de los principales blancos celulares de los efectos oxidantes de los EPT es la mitocondria (Valko *et al.*, 2005). Esto se debe a que los EPT pueden perturbar la integridad estructural de la membrana mitocondrial interna, conduciendo a un aumento en su permeabilidad (Møller *et al.*, 2007). Esto altera el potencial de membrana y se traduce en un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, favoreciendo la producción de ERO, como  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a través de la cadena transportadora de electrones. Lo anterior conduce también a la producción de especies reactivas intermediarias, producto de la biotransformación tanto del  $\bullet\text{O}_2^-$  como del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generando estrés oxidante a nivel mitocondrial y celular (De Vizcaya y Del Razo, 2008).

Otra manera en la que los EPT pueden inducir estrés oxidante sucede mediante la inhibición o reducción de la actividad de algunas de las enzimas que participan en el control de este estrés, como la catalasa (CAT), las peroxidasas (GPOX) y la superóxido dismutasa (SOD), entre otras.

En el caso particular del Pb, aunque es un elemento que no lleva a cabo reacciones de óxido-reducción en las plantas, puede actuar junto con otros elementos como el As, Hg y Cd, incrementando la producción de radicales libres y disminuyendo la disponibilidad de reservas antioxidantes de las plantas, de manera que el estrés oxidante es una consecuencia clave de la toxicidad generada por el Pb (Jomova y Valko, 2011). Además, puede inducir estrés oxidante y causar daño a componentes celulares como los cloroplastos, también puede alterar la producción de biomoléculas de respuesta al estrés como prolina, ascorbato, glutatión y proteínas solubles. Asimismo, puede modificar la actividad de algunas enzimas antioxidantes importantes, como la SOD, CAT, guayacol peroxidasa (G-POX) ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Reddy *et al.*, 2005).

La inducción del estrés oxidante por Pb está relacionado, entre otros factores, con un bloqueo en el transporte de electrones en el FS II (Qureshi *et al.*, 2007). Además, algunas

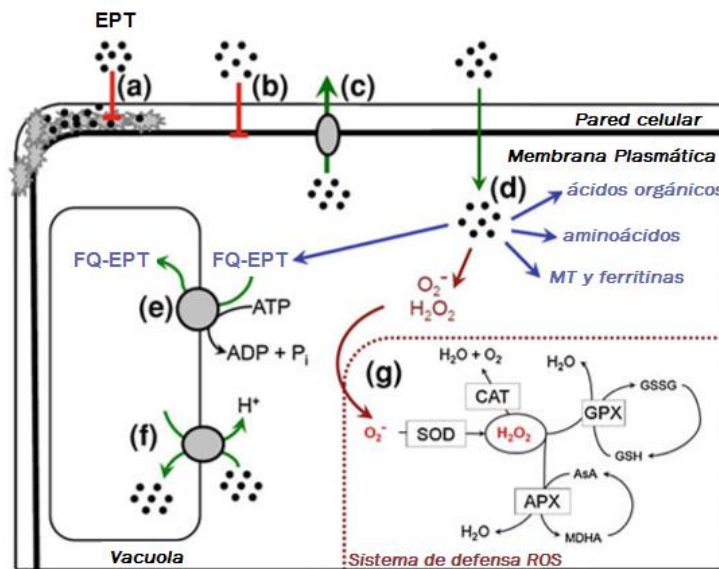
rutas alternas de generación de  $H_2O_2$ , diferentes a la dismutación del superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), pueden verse aceleradas (Choudhuri, 1988).

### 1.5 Mecanismos de resistencia a EPT

Los EPT pueden actuar como factores de estrés abiótico, lo que provoca alteraciones en la fisiología y metabolismo de las plantas. No obstante, desde hace tiempo, se han encontrado especies de plantas que tienen la capacidad de crecer en sitios que presentan concentraciones elevadas de EPT, resistiendo sus efectos tóxicos (Azevedo *et al.*, 2007).

Se denomina “resistencia” a la capacidad de respuesta que tienen las plantas para sobrevivir y reproducirse ante condiciones de estrés por EPT (Baker, 1987). Esta respuesta es posible debido a la activación de dos mecanismos de defensa generales: i) la exclusión, en la que la planta se protege externamente de la influencia del estresor; y ii) la tolerancia, en la que la planta sobrevive en presencia de un factor estresante interno (Baker, 1987).

Entre las respuestas de resistencia más importantes que poseen las plantas ante la presencia de EPT destacan: (a) la unión del EPT a la pared celular o la quelación con exudados de la raíz; (b) reducción del paso a través de la membrana celular; (c) expulsión hacia el apoplasto por transportadores en membrana; (d) quelación en el citosol por ligandos como fitoquelatinas (FQ), metalotioneinas (MT), ácidos orgánicos y aminoácidos; (e) transporte de complejos EPT-ligando a través del tonoplasto e incorporación en la vacuola; (f) secuestro en la vacuola por transportadores del tonoplasto; (g) mecanismos de defensa contra el estrés oxidante (Manara, 2012) (Figura 5).



**Figura 5.** Respuestas de plantas superiores contra la toxicidad por EPT (Modificado de Manara, 2012).



### 1.5.1 Mecanismos de exclusión

Al entrar en contacto con EPT, las plantas activan una primera línea de defensa, que consiste en la activación de mecanismos de exclusión. Los mecanismos de exclusión son aquellos que tienen como función principal prevenir o regular la entrada de compuestos o elementos tóxicos al interior de la célula. Se sabe que esto ocurre a través de alguna de las siguientes vías: (i) liberación de metabolitos hacia el medio externo o en las paredes y membranas celulares, por ejemplo, mediante la producción de exudados que actúan como quelantes de EPT y son retenidos en el apoplasto; (ii) precipitación del EPT en el exterior de las células por la producción y excreción de metabolitos, como el ácido oxálico que, aunque es comúnmente producido por ciertos grupos de hongos, también se ha reportado en plantas superiores; (iii) fijación en pared celular, principalmente por mecanismos pasivos (adsorción); (iv) alteración de sistemas de transporte en la membrana celular, que regulan la entrada y salida de EPT y que además pueden inhibir su transporte a larga distancia<sup>2</sup>, por ejemplo, a través de la síntesis de proteínas de transporte en el citosol (Hall, 2002; Bellion *et al.*, 2006).

A continuación se detalla el papel que desempeñan algunos de los mecanismos mencionados en la exclusión de EPT en plantas.

#### 1.5.1.1 Producción de ácidos orgánicos

Cuando las plantas entran en contacto con un elemento tóxico, se detona la excreción intra- y extra-celular de metabolitos secundarios en las raíces. Estos exudados incluyen ácidos orgánicos de masa molecular baja, generados durante el ciclo de Krebs, los cuales evitan la entrada de los EPT y regulan su concentración intracelular (Young *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2001).

La importancia de los ácidos orgánicos en la resistencia a EPT en el sistema radicular se debe a su influencia sobre la solubilidad de elementos tanto esenciales como no esenciales. Este cambio en la solubilidad puede ocurrir de forma directa, mediante la activación de procesos de acidificación, quelación, precipitación y oxido-reducción en la rizósfera, o indirecta, a través de alteraciones sobre la actividad microbiana, las propiedades físicas de la rizósfera o en la dinámica de crecimiento de la raíz (Marschner, 1995).

---

<sup>2</sup> Se refiere al movimiento de las moléculas a través de los espacios intercelulares o apoplasto

Varios trabajos describen la función de los ácidos orgánicos sobre la resistencia y acumulación de EPT por las plantas. Por ejemplo, Zheng *et al.* (1998) demostraron que la exposición de plantas de *Fagopyrum esculentum* a Al aumentó la producción de ácido oxálico, lo que se asoció con la resistencia de la planta a este elemento y la restricción de su entrada a la célula. Así mismo, Yang *et al.* (2005), observaron un incremento en el flujo de oxalato en las raíces de *Spinacia oleracea* en plantas tratadas con Al. Salt *et al.* (2000) observaron un aumento en la concentración de citrato en exudados de raíces de plantas no hiperacumuladoras que fueron expuestas a Ni, lo que contribuyó a limitar su absorción mediante la formación de complejos en la rizósfera.

Además de limitar la entrada de EPT, los ácidos orgánicos también pueden solubilizarlos, favoreciendo su acumulación por las plantas. Lo anterior ha sido reportado en plantas hiperacumuladoras de Cd y Ni, como *Thlaspi caerulescens* y *Alyssum bertolonii*, respectivamente (Ma *et al.*, 2005; Callahan *et al.*, 2006). En tales casos se encontró que una sobreproducción de ácido cítrico, málico y oxálico en las raíces laterales estimuló la formación de complejos entre los ácidos y los EPT, favoreciendo así su solubilización, y mejorando la absorción y retención intracelular en el sistema radicular, además de favorecer su transporte a vacuolas por medio de proteínas de membrana del tonoplasto. Así mismo, Zeng *et al.* (2008) observaron un aumento el producción de ácidos oxálico y málico en plantas de *Oryza sativa* sometidas a estrés por Cu, lo que estuvo relacionado con un incremento en su acumulación, principalmente en las raíces.

Generalmente, la acumulación elevada de EPT en plantas se atribuye a una inducción de la producción de ácidos orgánicos, los cuales, son transportados al citosol donde forman complejos con los cationes metálicos para posteriormente ser secuestrados en la vacuola o excretados de la célula. Durante este proceso, es importante la coordinación de transportadores de los ácidos y los canales de K<sup>+</sup> localizados en la membrana, ya que éstos regulan la entrada de los EPT a la célula y mantienen estable el pH citosólico (Ryan *et al.*, 2001).

#### **1.5.1.2 Adsorción en pared celular**

Además de la quelación de EPT por ácidos orgánicos en el medio extracelular, existen otros mecanismos pasivos (no metabólicos) relacionados con las propiedades estructurales de los organismos. Entre estas propiedades, se encuentra la adsorción de EPT en la pared celular de plantas, hongos y bacterias (Nishizono *et al.*, 1987; Mullen *et al.*, 1989; Cañizares-

Villanueva, 2000; Bayramoğlu *et al.*, 2003). Al respecto, Thurman (1981) fue uno de los primeros investigadores en proponer que los componentes de la pared celular de las plantas (como lignina y celulosa) podían contribuir a la tolerancia a EPT. Desde entonces se han realizado estudios que han demostrado que el arreglo de los componentes de la pared celular permiten formar enlaces covalentes con EPT a través de sus átomos de oxígeno, secuestrándolos así en el apoplasto (Carrier *et al.*, 2003). Crist *et al.* (2002) y Marmiroli *et al.* (2005) analizaron por espectroscopía de rayos X el proceso de acumulación de Pb en raíces de *Medicago sativa* y *Juglans regia*, demostrando la formación de enlaces del EPT con complejos de lignina y celulosa, respectivamente. Ederli *et al.* (2004) y Wójcik y Tukiendorf (2005) observaron que el secuestro de elementos como Zn, Cu y Cd en la pared celular de la raíz de *Phragmites australis* y *Zea mays* está relacionado con una mayor lignificación de las células radicales. Ambos grupos atribuyen este efecto al incremento de la actividad de la peroxidasa que estimula la biosíntesis de la lignina en respuesta al estrés causado por estos EPT.

## 1.5.2 Mecanismos de tolerancia

Si la entrada de EPT no puede ser regulada, las plantas poseen un conjunto de mecanismos de tolerancia. Algunos de éstos son ubicuos, ya que son necesarios para mantener la homeostasis de elementos en general. O bien, pueden estar orientados hacia iones metálicos individuales<sup>3</sup>; de hecho, algunas plantas tienen más de un mecanismo para prevenir la acumulación de elementos específicos. Estos mecanismos tienen la finalidad de reducir el efecto tóxico de EPT al interior de la célula, neutralizándolo a través de estrategias de detoxificación y almacenamiento (Manara, 2012).

Entre éstas se incluyen la quelación o el transporte y secuestro de EPT en la vacuola, para aislarlos de componentes celulares sensibles, así como la activación de mecanismos relacionados con la respuesta antioxidante (Manara, 2012). A continuación se describen algunos de estos mecanismos.

### 1.5.2.1 Detoxificación interna de EPT

La detoxificación interna de EPT está relacionada con procesos como: a) el secuestro intracelular en compartimentos donde éstos no afecten las actividades celulares vitales, como la vacuola; b) la formación de complejos con proteínas y moléculas que contienen

---

<sup>3</sup> Por ejemplo, la familia de transportadores de cobre (CTR)

grupos tiólicos (-SH), como el glutatión (GSH), metalotioneinas (MT) y fitoquelatinas (FQ); c) conjugación con el GSH por acción de glutatión-S-transferasas (GST); d) reacciones de óxido-reducción que modifican el estado reactivo de los EPT, transformándolos en formas menos tóxicas. Aunado a lo anterior, el secuestro de iones metálicos por la ferritina y otras proteínas que atrapan EPT, previenen la formación del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), considerada la forma más reactiva de las ERO (Hansberg, 2008; Manara, 2012).

Algunos de estos procesos ocurren debido a que los cationes metálicos pueden ser atrapados por un grupo de moléculas con las que tienen una gran afinidad. A continuación se describe la función que desempeñan algunas de estas moléculas:

**Metalotioneinas (MT).** Junto con el GSH, uno de los sistemas más documentados para la eliminación y detoxificación de EPT comprende las MT. Éstas son proteínas y polipéptidos de masa molecular baja (~7 kDa) con un alto contenido de residuos de cisteína (Carpene *et al.*, 2007), que pueden unirse a iones metálicos, formando complejos MT-EPT. Estos complejos son transportados comúnmente a compartimentos en el interior de la célula, como la vacuola, o directamente a la pared celular.

**Fitoquelatinas (FQ).** Las plantas contienen múltiples MT, pero también poseen un sistema alternativo de detoxificación a través de las FQ que, junto con el GSH, pueden detoxificar EPT como el Pb, Zn, Cd o Hg, debido a su alta afinidad por ellos. Tanto las MT como las FQ, se caracterizan por una estructura general de tipo  $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{-Gli}$  con un alto contenido de cisteína, un aminoácido azufrado al que pueden unirse cationes como el Pb (Figura 6).

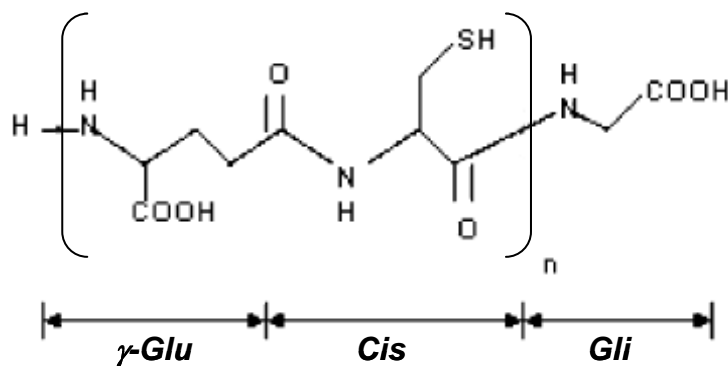


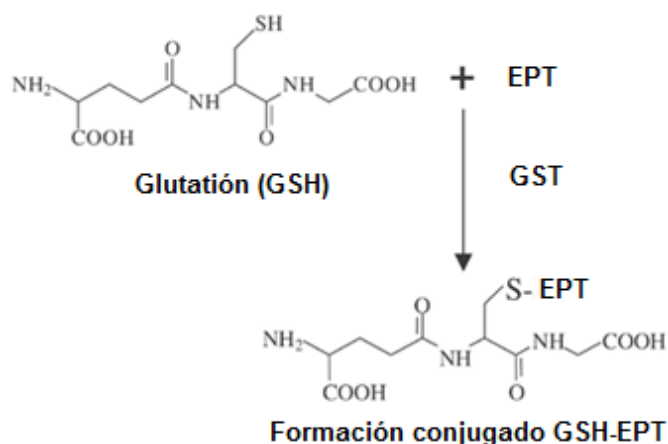
Figura 6. Estructura química de las fitoquelatinas (FQ) (modificada de Pal y Rai, 2010).

Las FQ son péptidos sintetizados enzimáticamente a partir del GSH, con masa molecular variable, pero que difícilmente superan 2 kDa en hongos inferiores (Rouhier *et al.*, 2008). Estas fueron identificadas por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, pero se han encontrado también en plantas y algas como ligandos que atrapan EPT, sugiriendo

que son sintetizadas como mecanismo de tolerancia en ambientes hostiles y tóxicos (Pal y Rai, 2010).

Se ha demostrado que las FQ desempeñan una función importante en la detoxificación de EPT en plantas como *Arabidopsis*, y en algunos hongos, como *Schizosaccharomyces pombe*. Ha *et al.* (1999) compararon la sensibilidad de ambos organismos hacia los EPT en organismos modificados que carecían de la FQ sintetasa, enzima encargada de la síntesis de FQ. Demostraron que los organismos modificados presentaron una sensibilidad mayor a Cd y a As, respecto a los no modificados. En presencia de elementos como Cu, Hg, Ag, Zn y Ni, dichos organismos presentaron poca o nula sensibilidad. Este estudio demostró, además, que el As es un activador fuerte de la biosíntesis *in vitro* e *in vivo* de FQ.

**Conjugación de EPT mediada por la GST.** En la detoxificación de EPT, las células vegetales presentan mecanismos de conjugación en los que participan moléculas como las MT, FQ y GSH, para formar moléculas blanco que, posteriormente, son eliminadas. Una vez formados, los conjugados son transportados a las vacuolas por bombas dependientes de ATP en donde son compartimentados, a través de proteínas de transporte de tipo ABC<sup>4</sup> (Manara, 2012). Las enzimas que catalizan la unión (conjugación) del GSH con EPT (Figura 7) se conocen como glutatión-S-transferasas (GST) y se encuentran en casi todos los organismos vivos (Coleman *et al.*, 1997). Aunque la formación de estos conjugados puede ocurrir en ausencia de la GST, su presencia acelera significativamente la reacción (Schröder, 2002).



**Figura 7.** Estructura esquemática del complejo formado entre el GSH y los EPT por acción de la GST (modificada de Townsend y Tew, 2003).

<sup>4</sup> Proteínas especializadas en el transporte activo de sustancias a través de la membrana celular

La súper-familia de las GST comprende enzimas multifuncionales de detoxificación, que se encuentran principalmente en el citosol. Con base en su secuencia, se dividen en 4 clases: phi, tau, theta y zeta; de éstas, las dos primeras son características en las plantas y las últimas son compartidas filogenéticamente por muchos organismos (Marrs, 1996; Edwards *et al.*, 2000; Nutricati *et al.*, 2006). Dixon *et al.* (2002) encontraron dos clases adicionales de GST en *Arabidopsis thaliana*, las cuales difieren de las anteriores debido a que presentan una cisteína en lugar de serina en su sitio activo. Estas últimas dos clases se denominan dehidroascorbato reductasas dependientes del GSH y GST de clase lambda, también específicas de las plantas, como las clases phi y tau (Öztetik, 2008).

A pesar de que existe una diferencia importante entre las secuencias de las GST, su estructura tridimensional es muy similar. Esto sugiere que dicha estructura es resultado de una fuerte presión evolutiva dirigida hacia la conservación de patrones estructurales involucrados con su sitio activo (Dirr *et al.*, 1994; Armstrong, 1997; Sheehan *et al.*, 2001). De forma general, las GST son enzimas homo o heterodiméricas con subunidades de aproximadamente 25 kDa. Cada subunidad dimérica contiene un sitio catalítico independiente formado por dos componentes (dominios I y II) y, entre éstos, existe una pequeña región de unión de tamaño variable, con 5 a 10 residuos (Öztetik, 2008).

Por sus propiedades catalíticas, también sirven como proteínas de unión y son responsables del destino de muchos ligandos xenobióticos y endógenos (Rouhier *et al.*, 2008). Hasta hace algunos años, la mayoría de los estudios sobre GST se había realizado en tejidos de hígado de mamíferos como ratones y humanos, en donde se encuentra de forma abundante (Mannervik y Danielson, 1988) Sin embargo, también se ha demostrado su presencia en plantas, algunos invertebrados y vertebrados inferiores, en bacterias y en hongos, en donde son las principales enzimas involucradas en procesos metabólicos de detoxificación (Nutricati *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2009b).

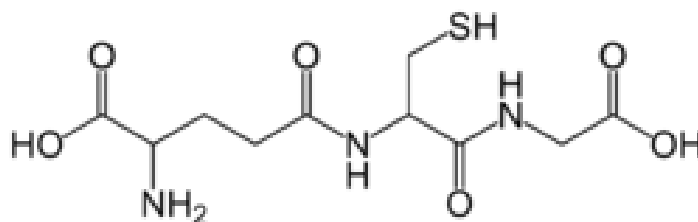
### **1.5.2.2 Defensa antioxidante**

Otro mecanismo intracelular de detoxificación contra las especies reactivas, tanto de nitrógeno como de oxígeno, generadas por la exposición a EPT, es la defensa antioxidante, que involucra el incremento de la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de controlar los niveles de ERO en las células (Sharma y Dietz, 2009). Ambos tipos de mecanismos proveen a las células de una maquinaria altamente eficiente para la detoxificación de ERO como el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entre otros.

### Antioxidantes no enzimáticos

Este grupo incluye compuestos hidrofílicos, como el ascorbato (ASC) y el glutatión reducido (GSH), además de moléculas lipofílicas, como carotenoides y tocoferoles, capaces de transformar ERO dentro de las células. A continuación se describe el papel que desempeñan estas moléculas.

**Glutatión (GSH).** El glutatión (GSH) es un tiol no protéico ( $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) de masa molecular baja, sintetizado por la adición secuencial de cisteína al glutamato seguida por la adición de una glicina. Es el antioxidante de masa molecular baja más importante en las células y es una molécula involucrada en varios procesos celulares y es clave en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Figura 8) (Pocsi *et al.*, 2004; Bellion *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Estructura esquemática del glutatión (GSH) mostrando su grupo tiólico (SH) (modificada de Thomas, 1999).

Su importancia se debe a que es una molécula metabólicamente activa que desempeña funciones diversas y significativas en la protección celular, entre las que destacan: (i) su participación en mecanismos de señalización celular, (ii) su función como un poderoso detoxificante de EPT y xenobióticos, y (iii) su función como un amortiguador poderoso (formando una barrera entre proteínas con grupos Cis y las ERO) (Blokhina *et al.*, 2003; Gratão *et al.*, 2005; Rouhier *et al.*, 2008). Gracias a la presencia de un grupo sulfhidrilo (-SH) en su estructura, el GSH participa directamente en la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al ser utilizado como sustrato de varias enzimas de reducción, como las peroxidasas (Foyer y Noctor, 2005).

Su función en la tolerancia y/o acumulación de EPT ha sido demostrada en muchos estudios. Ben Ammar *et al.* (2008) observaron que la exposición de *Lycopersicon esculentum* al Cd (1-50  $\mu$ M) provocó una disminución en los niveles de GSH, proporcional a la concentración de Cd en el medio. Este grupo atribuyó la disminución del nivel de GSH a su utilización como precursor para la síntesis de fitoquelatinas (FQ), ya que se observó un

incremento en su producción y en la cantidad de Cd acumulado en las raíces, en forma de complejos FQ-Cd. En contraparte, varios grupos de investigación han reportado un incremento en la producción de GSH en respuesta a un aumento en la concentración de Cd en plantas como *Pisum sativum*, *Sedum alfredii* y *Vigna mungo* (Rivera-Becerril *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2008).

**Ascorbato (ASC).** El ASC es un antioxidante hidrosoluble potente, presente en extractos biológicos y un reductor de ERO, como el  $^1\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  y el radical peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ), o de especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el bióxido de nitrógeno ( $\text{NOO}\bullet$ ). Al reaccionar con ERO y ERN, el ASC genera el radical ascorbilo ( $\bullet\text{A}$ ). Esta molécula sufre rápidamente una dismutación para transformarse en el anión ascorbato ( $\bullet\text{AH}^-$ ) o en dehidro-ascorbato (DHA), formas no radicales del ascorbato. Otro mecanismo antioxidante propuesto para el ASC se asocia con su capacidad para regenerar otros antioxidantes de masa molecular baja como el  $\alpha$ -tocoferol, el GSH y el  $\beta$ -caroteno, debido a que reduce sus formas oxidadas (Scarpa *et al.*, 1984; Meister, 1994; Winkler *et al.*, 1994; Machado y Fernandes, 2008b).

**Carotenoides.** Son metabolitos secundarios lipofílicos y constituyen el grupo de pigmentos con mayor diversidad y distribución en la naturaleza; pueden encontrarse en forma de carotenos o xantofilas y son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, además de algunos no fotosintéticos. Son moléculas conformadas por ocho unidades de isoprenoides (o terpenos) y se caracterizan por presentar una estructura general acíclica de 40 átomos de carbono (Botella-Pavía *et al.*, 2004). Pueden proteger a las células contra daños oxidantes, por su capacidad para funcionar como agentes fotoprotectores contra los efectos nocivos de la luz y del oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), así como de moléculas reactivas contra especies químicas generadas dentro de las células, capaces de inducir daños oxidantes (Machado y Fernandes, 2008a).

**Tocoferoles.** Los  $\alpha$ -tocoferoles son antioxidantes liposolubles, cuya función es proteger a las células contra los radicales libres. Su función principal es destruir la mayor parte de los radicales libres del oxígeno, protegiendo a los ácidos grasos saturados de la oxidación y evitando así el daño oxidante de los lípidos de la membrana (Balmori, 2008).

### **Antioxidantes enzimáticos**

Los sistemas enzimáticos que eliminan las ERO incluyen a: (i) superóxido dismutasa (SOD), encontrada en casi todos los compartimentos celulares; (ii) catalasa (CAT) presente en los peroxisomas; (iii) peroxidasas (POX) como la guayacol peroxidasa (GPOX), glutatión

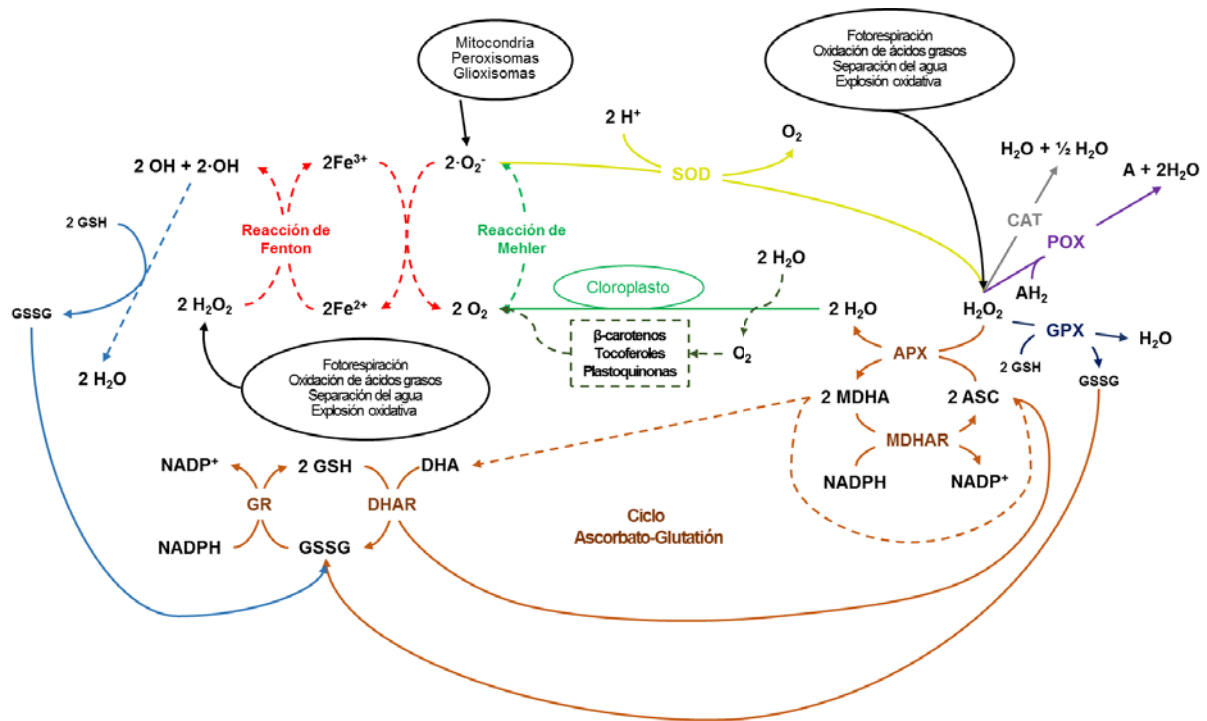


peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX), encontradas en el citosol, vacuola y pared celular. Además, existe un conjunto de enzimas necesarias para la regeneración de las formas activas de los antioxidantes, como la glutatión reductasa (GR), monodehidro-ascorbato reductasa (MDHAR) y dehidro-ascorbato reductasa (DHAR). Algunas de estas enzimas forman parte de un mecanismo complejo de detoxificación de ERO conocido como ciclo ascorbato-glutatión, que ocurre en los cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplasto y peroxisomas (Rivera *et al.*, 2008). La forma en que participan estas enzimas en la detoxificación de ERO se muestra en la Figura 9.

El  $^1\text{O}_2$  generado en los cloroplastos es transformado a  $\bullet\text{O}_2^-$  mediante la reacción de Mehler. El  $\bullet\text{O}_2^-$  es entonces convertido en  $\bullet\text{OH}$  por la reacción de Fenton, o en  $\text{H}_2\text{O}_2$  por acción de la SOD y de eventos como la fotorespiración, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos<sup>5</sup> y otras reacciones. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado es transformado en  $\text{H}_2\text{O}$  por enzimas como la CAT y POX, o por la GPX y APX en el ciclo ascorbato-glutatión, las cuales utilizan el NADPH como poder reductor. Finalmente, el  $\bullet\text{OH}$  puede ser removido por el GSH, y el GSSG formado es regenerado por la GR (Silva *et al.*, 2013).

---

<sup>5</sup> Se cree que en ácidos grasos de cadena larga (C-22) ocurre una primera oxidación en los peroxisomas, seguida de una oxidación mitocondrial. Durante esta primera etapa, la reacción no está acoplada a la síntesis de ATP, por lo que electrones de alto potencial se transfieren a  $\text{O}_2$ , generando  $\text{H}_2\text{O}_2$



**Figura 9.** Rutas de detoxificación de ERO en plantas. **Abreviaturas:** ASC, ascorbato;  $\text{AH}_2$ , sustrato oxidable; MDHA, monodehidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; SOD, superóxido dismutasa; GR, glutatión reductasa; POX, peroxidasas; APX, ascorbato peroxidasa; MDHAR, MDHA-reductasa; DHAR, DHA-reductasa; GPX, glutatión peroxidasa;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno;  $\bullet\text{OH}$ , radical hidroxilo;  $\bullet\text{O}_2^-$ , radical superóxido;  $^1\text{O}_2$ , oxígeno singulete. Las vías no enzimáticas se indican con una línea discontinua (modificado de Silva *et al.*, 2013).

Aunque las rutas de generación y eliminación de ERO en los compartimentos celulares ocurren por separado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede difundirse fácilmente a través de las membranas. Antioxidantes como el GSH y el ASC, pueden transportarse entre los compartimentos (Silva *et al.*, 2013). A continuación se detallan las funciones de cada enzima:

**Superóxido dismutasa (SOD).** La SOD (E.C. 1.15.1.1) es una enzima que cataliza la dismutación del superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Así, la actividad de esta enzima modula las cantidades relativas de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ambos sustratos de la reacción Haber-Weiss, disminuyendo así la formación del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Esta enzima se encuentra en la mayoría de los compartimentos subcelulares que generan ERO, por lo que se considera una pieza clave en el mecanismo de defensa antioxidante. El producto de la reacción de esta enzima es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una ERO que debe ser eliminada mediante su conversión en  $\text{H}_2\text{O}$  en reacciones posteriores. Aunque existen varias enzimas

que regulan los niveles intracelulares de  $H_2O_2$ , en las plantas, la catalasa (CAT) y las peroxidasas (POX) se encuentran entre las más importantes (Silva *et al.*, 2013).

**Catalasa (CAT).** La CAT (E.C. 1.11.1.6) es una enzima tetramérica con un grupo hemo en su estructura, que cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ , protegiendo a las células de los efectos dañinos que genera la acumulación de  $H_2O_2$ . La CAT está presente en todos los eucariontes aerobios y actúa en la remoción del  $H_2O_2$  generado en procesos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de purinas y el ciclo del glioxilato (fotorespiración). La actividad de esta enzima puede ser alterada por estresores como la salinidad, la presencia de EPT y los cambios de temperatura, entre otros (Peraza, 2008).

Se ha observado una respuesta variable en la actividad CAT bajo estrés por EPT. Por ejemplo, se encontró una disminución en su actividad por efecto de la acumulación de Cd en raíces de especies como *Glycine max* (Balestrasse *et al.*, 2001), *Phragmites australis* (Iannelli *et al.*, 2002), *Capsicum annuum* (Leon *et al.*, 2002) y *Arabidopsis thaliana* (Cho y Seo, 2005). En contraste, en otras especies como *Oryza sativa* (Hsu y Kao, 2004), *Brassica juncea* (Mobin y Khan, 2007), *Triticum aestivum* (Khan *et al.*, 2007), *Cicer arietinum* (Hasan *et al.*, 2008) y *Vigna mungo* (Singh *et al.*, 2008) su actividad aumentó bajo condiciones de estrés por el mismo elemento.

**Peroxidasas (POX).** Las peroxidasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la oxidación-reducción entre el  $H_2O_2$  y diferentes agentes reductores. En el sistema antioxidante vegetal, la ascorbato (APX), guayacol (GPOX) y glutatión peroxidasas (GPX) se consideran las peroxidasas más importantes (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008; Peraza, 2008).

La APX (E.C. 1.11.1.11) es una enzima con gran afinidad por el ascorbato como agente reductor. Su secuencia es distinta a otras peroxidasas y existen formas diferentes de APX que se encuentran en los cloroplastos, citosol, mitocondria, peroxisomas y glioxisomas. La APX utiliza dos moléculas de ascorbato (ASC) para reducir al  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y produce dos moléculas de monodehidro-ascorbato (MDHA). El MDHA es un radical de vida corta que puede dismutarse de forma espontánea en ascorbato y dehidro-ascorbato (DHA), así como ser reducido para formar ascorbato por el NADPH mediante la MDHA reductasa (MDHAR; E.C. 1.6.5.4) (Asada, 1992). El DHA formado es reducido entonces a ascorbato por la acción de la DHA reductasa (DAHR; E.C. 1.8.5.1), que utiliza al GSH como sustrato reductor. Esta reacción genera glutatión oxidado (GSSG), que es reducido para formar GSH mediante la NADPH en una reacción catalizada por la GSH reductasa (GR; E.C. 1.6.4.2) (Figura 9). En general, se han reportado incrementos en la actividad APX bajo condiciones de estrés

por Cd en *Ceratophyllum demersum* (Aravind y Prasad, 2005), *B. juncea* (Mobin y Khan, 2007), *T. aestivum* (Khan *et al.*, 2007) y *V. mungo* (Singh *et al.*, 2008). Hsu y Kao (2007) reportaron que el pretratamiento de plántulas de *O. sativa* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó un incremento en la actividad APX, protegiendo a las plántulas de un estrés posterior por Cd.

Las GPOX (E.C. 1.11.1.7) pertenecen a un grupo de peroxidases que se distinguen de las APX en términos de su secuencia y funciones fisiológicas. Las GPOX descomponen el ácido índol-3-acético (AIA) y desempeñan una función importante en la biosíntesis de lignina y la defensa contra estrés biótico al reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las GPOX utilizan donadores de electrones aromáticos como el guayacol y el pirogalol. La actividad GPOX varía considerablemente dependiendo de la especie y de la condición de estrés. Se ha observado un incremento en la actividad de esta enzima en plantas de *T. aestivum*, *A. thaliana* y *C. demersum* expuestas a Cd (Aravind y Prasad, 2005; Cho y Seo, 2005; Khan *et al.*, 2007). Radotic *et al.* (2000) reportaron un incremento inicial en la actividad GPOX en agujas de pino sometidas a estrés por niveles bajos de Cd, mostrando una disminución en la actividad con concentraciones más altas.

Las GPX (E.C. 1.11.1.9) forman una familia de isoenzimas presentes en el citosol, cloroplastos, mitocondria, peroxisomas y apoplastos. Estas enzimas reducen al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando glutatión reducido (GSH) como agente reductor, protegiendo así a las células contra el estrés oxidante. Las GPX tienen también afinidad por otros agentes reductores como las tioredoxinas, las cuales se ha sugerido utiliza preferentemente. Existen reportes contradictorios sobre la respuesta de estas enzimas a condiciones de estrés por EPT en varias especies de plantas (Anjum *et al.*, 2012). Por ejemplo, Leon *et al.* (2002) encontraron un incremento en su actividad en plántulas de *Capsicum annuum* expuestas a Cd; en contraste, Dixit *et al.* (2001), reportaron una disminución en la actividad GPX en plantas de *P. sativum* expuestas al mismo elemento. Halušková *et al.* (2009) reportaron una respuesta diferencial en plántulas de *Glycine max* tratadas con elementos como Cd, Pb, Co, Hg y Zn. Estos autores observaron un ligero incremento de la actividad GPX después de la aplicación de Pb y Zn, sin encontrar un efecto por la adición de Co, mientras que en presencia de elementos como el Hg y Cd, la actividad fue estimulada fuertemente.

## 1.6 *Dodonaea viscosa*

*Dodonaea viscosa* L. (Jacq.), mejor conocida como chapulixtle, es un arbusto de la familia *Sapindaceae* que presenta una distribución cosmopolita en regiones tropicales, subtropicales y templadas de África, América y el sur de Asia (Von-Carlowitz *et al.* 1991). Esta especie, ampliamente distribuida en nuestro país, está generalmente asociada con diferentes tipos de vegetación como bosques de coníferas y bosque tropical caducifolio. Su presencia se ha registrado en los estados de Chihuahua, Baja California Norte, Baja California Sur, Aguascalientes, Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Yucatán y Tamaulipas (Villaseñor y Espinosa, 1998). A continuación se muestra la clasificación taxonómica de esta especie (Cronquist, 1988).

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida (dicotiledónea)

**Orden:** Sapindales

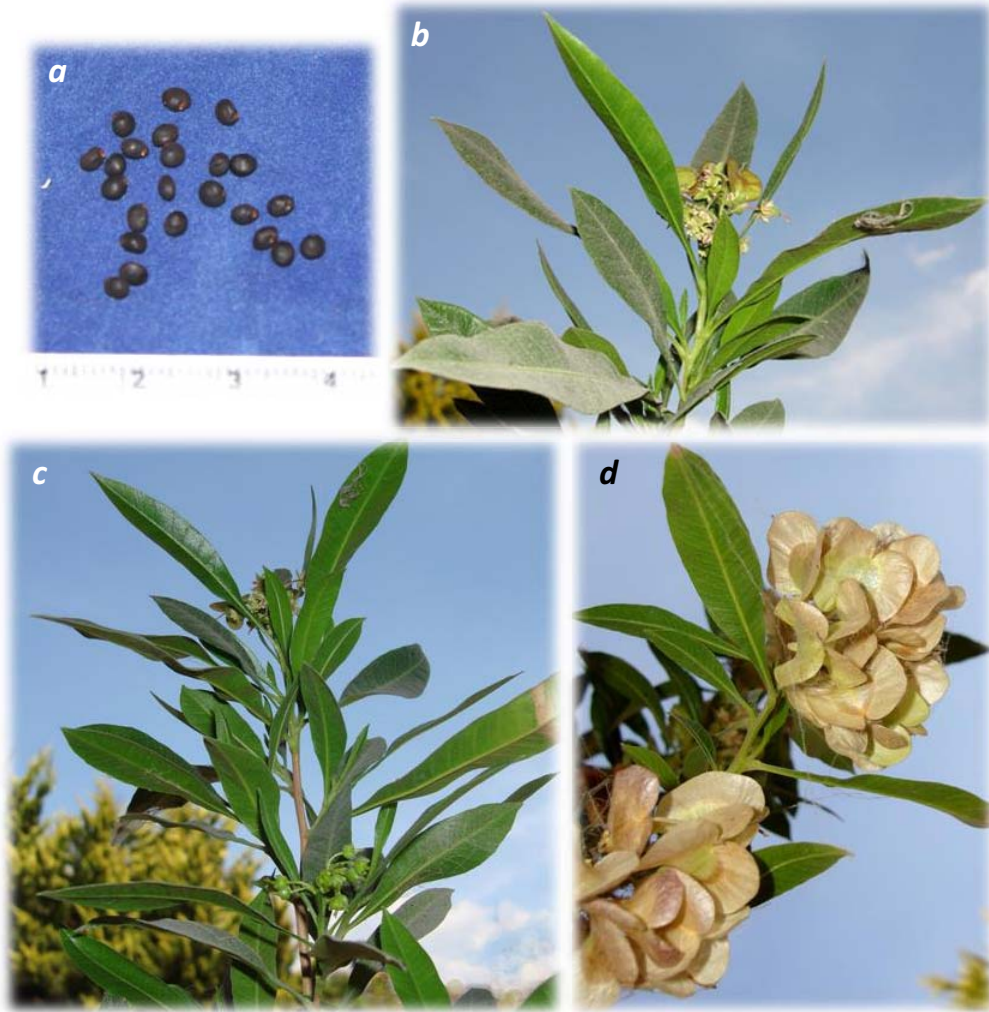
**Familia:** Sapindaceae

**Género:** *Dodonaea*

**Especie:** *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

*D. viscosa* es un arbusto perennifolio que puede alcanzar una altitud de 1 a 5 m. Sus semillas lenticulares son brillantes, negras y duras, de 2 mm (Figura 10a). Tiene hojas simples (Figura 10b) con una gran variedad de formas que van desde lineares a oblongo-lanceoladas de 4 a 12 cm de largo y 2 a 4 cm de ancho (Standley, 1982). Sus flores van del color amarillo a naranja-rojizo y se localizan en racimos cortos (Figura 10c) (Gilman, 1999). El fruto es una cápsula de ~2 cm de ancho que cuando emerge es verde y, posteriormente, se torna a un color verde amarillo y luego en rosa y rojo (Figura 10d).

Una característica particular de *D. viscosa* es que sus hojas segregan una sustancia resinosa que les proporciona una cubierta protectora que evita la pérdida de agua, lo cual hace de esta planta una especie con una tolerancia excepcional a sequías, vientos y heladas (Gilman, 1999).



**Figura 10.** Semillas (**a**), tallos con hojas y flores (**b, c**) y frutos (**d**) de *Dodonaea viscosa* L. (Jacq.).

Camacho *et al.* (1992) documentaron la importancia de *D. viscosa* como una planta que produce los tutores hortícolas más apreciados en el centro de nuestro país; además tiene propiedades medicinales y puede usarse como planta ornamental en áreas de temporal limitado y sin riego. Además, se recomienda la utilización de esta especie para el control de la erosión, como cortina rompevientos y como restaurador de suelos (Von Carlowitz *et al.* 1991). De acuerdo con Martínez-Pérez *et al.* (2006) *D. viscosa* es una especie que facilita la sucesión natural en procesos de restauración de zonas degradadas.

## **2 JUSTIFICACIÓN**

El éxito de la fitorremediación en la recuperación de suelos contaminados por EPT requiere de una selección cuidadosa de las especies vegetales utilizadas, las cuales deben tener características que garanticen un óptimo desempeño en la remediación de estos sitios. Se han publicado muchos estudios al respecto, sin embargo, a pesar de la gran diversidad de plantas que existe en nuestro planeta, éste es un mercado que está dominado predominantemente por géneros como *Brassica*, *Arabidopsis* y *Sesbania*, los cuales han sido extensamente estudiados, por lo que resulta importante explorar otras especies que enriquezcan los recursos utilizables en esta tecnología.

En este sentido, se ha demostrado la capacidad fitorremediadora de *Dodonaea viscosa*; una planta, poco estudiada y con potencial para fitoestabilizar Pb, que presenta una alta capacidad de bioacumulación de Pb en raíces (Rojas-Loria *et al.*, 2012). Además del uso potencial que tiene esta especie, es fundamental conocer los mecanismos que actúan sobre su notable capacidad para tolerar este elemento.

Está demostrado que la acumulación de EPT en las células detona una serie de reacciones metabólicas en las plantas, generando condiciones de estrés que, si no son controladas, pueden llevarlas a la muerte. Una consecuencia importante del estrés por EPT en las plantas, es la sobreproducción de ERO que, a largo plazo, puede conducir a un estado de estrés oxidante. Como respuesta, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de tolerancia, que involucra reacciones de conjugación y secuestro de EPT en la vacuola, así como un aumento en la respuesta antioxidante encargada de transformar estas ERO.

Tomando en cuenta lo anterior, el conocimiento de los mecanismos de tolerancia en las plantas como respuesta ante la exposición de EPT es un aspecto clave del mejoramiento de los procesos involucrados en la fitorremediación.



## **3 HIPÓTESIS**

*Dodonaea viscosa* resiste la presencia de altas concentraciones de Pb debido a su exclusión, y a la activación de mecanismos de tolerancia relacionados con el aumento en la producción de glutatión y de la actividad de enzimas antioxidantes (CAT y G-POX) y de conjugación (GST).

## **4 OBJETIVOS**

#### 4.1 Objetivo general

Determinar la resistencia de *D. viscosa* al Pb a través del estudio de su capacidad de exclusión y de la activación de mecanismos de tolerancia relacionados con el glutatión y la actividad de enzimas antioxidantes y de conjugación.

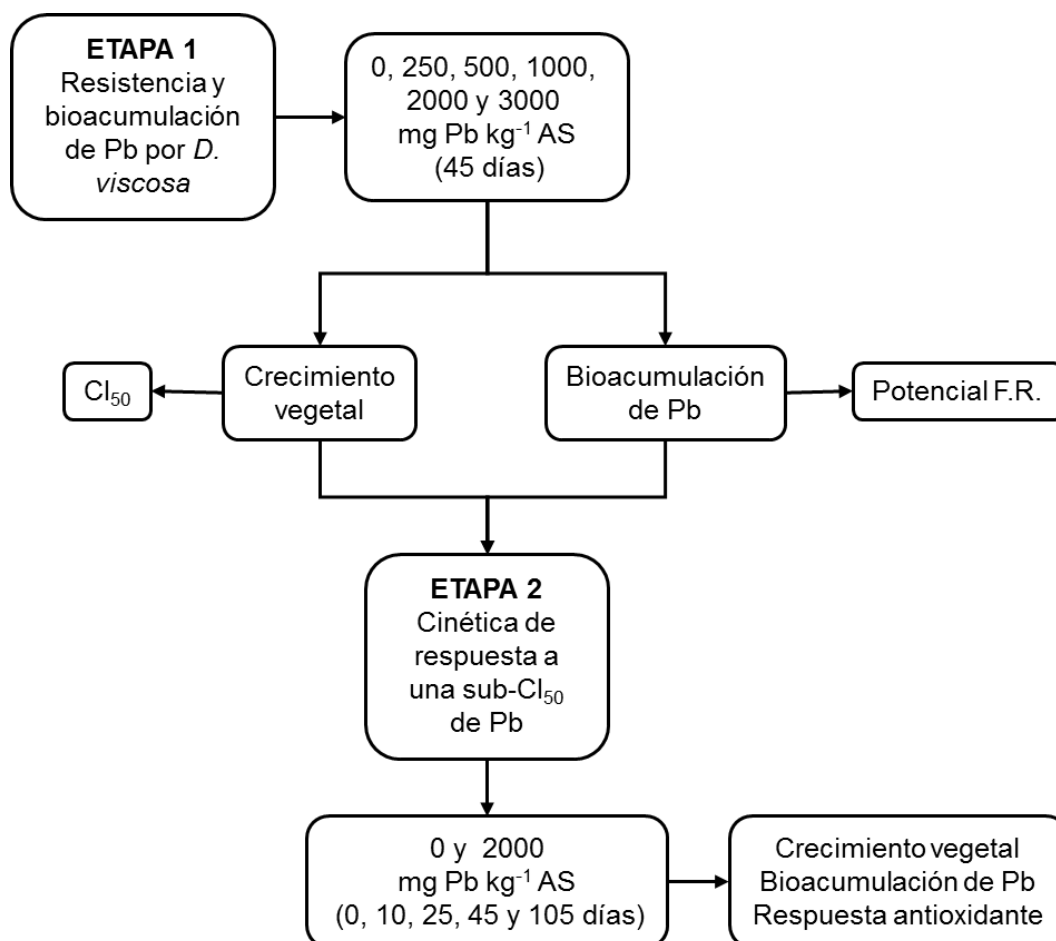
#### 4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la resistencia y capacidad de bioacumulación de Pb por *D. viscosa* en función de la concentración inicial, para definir una  $CI_{50}$ .
2. Evaluar el efecto del tiempo de exposición a una sub- $CI_{50}$  de Pb sobre el crecimiento vegetal y la producción de glutatión en *D. viscosa*
3. Evaluar la respuesta de las actividades enzimáticas GST, CAT y GPOX en *D. viscosa* en función del tiempo de exposición a una sub  $CI_{50}$  de Pb.
4. Analizar la relación entre la producción de glutatión y la actividad de las enzimas GST, CAT y G-POX sobre la bioacumulación y tolerancia a Pb por *D. viscosa* en el tiempo.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5.1 Estrategia experimental general

Con el fin de estudiar la relación entre la producción de enzimas y moléculas antioxidantes con la capacidad para resistir y bioacumular Pb por *Dodoanea viscosa* (L.) Jacq., la fase experimental de este trabajo se dividió en 2 etapas (Figura 11). En la etapa 1 se evaluó la resistencia y capacidad de bioacumulación de Pb por *D. viscosa*, en cultivos con diferentes concentraciones iniciales del metal. Una vez definida su resistencia, a través de la estimación de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ), se procedió a seleccionar una concentración sub-inhibitoria (sub- $CI_{50}$ ) para la segunda etapa. Durante la segunda etapa, se evaluó el efecto del tiempo de exposición a Pb sobre la bioacumulación del metal, la producción de glutatión y la respuesta de enzimas antioxidantes (CAT y G-POX) y de detoxificación (GST).



**Figura 11.** Estrategia experimental general. AS: agrolita seca;  $CI_{50}$ : concentración inhibitoria media; potencial FR: potencial fitorremediador.

## 5.2 Material biológico

Para el presente estudio se empleó *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq., un arbusto perennifolio distribuido en casi todo el país, que puede crecer en suelos muy erosionados y con pendientes muy inclinadas, así como en tepetate y toba removidos (Camacho *et al.*, 1992). Es tolerante a sequías, inundaciones, viento y heladas y se recomienda para el control de la erosión, como cortina rompevientos y como restaurador de suelos (Von Carlowitz *et al.*, 1991). Esta especie se seleccionó con base en estudios previos (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2009; Rojas-Loria *et al.*, 2012), en donde se demostró su resistencia y potencial para fitoestabilizar Pb, además de ser una especie que crece con frecuencia cerca de sitios contaminados.

### 5.2.1 Obtención de plántulas de *D. viscosa*

Las semillas de *D. viscosa* se colectaron en los alrededores de un sitio contaminado con residuos mineros en el estado de Guanajuato (Mineral de La Valenciana). Estas fueron seleccionadas mediante el método de flotación en agua, debido a que las semillas vivas tienden a hundirse (Camacho *et al.*, 1992). Una vez seleccionadas y, con el fin de acelerar la germinación, se escarificaron térmicamente en agua destilada a 75°C durante 3 min.

Para la obtención de plántulas de *D. viscosa*, después de su escarificación, las semillas se lavaron con detergente comercial (2%) durante 30 min y se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de etanol (70%) por 30 seg y en una solución de hipoclorito de sodio (1.8%) por 25 min. Las semillas se enjuagaron repetidamente con agua destilada estéril entre cada solución y se sembraron en cajas Magenta (*Sigma*) con medio Murashige & Skoog (MS, *Sigma*) con sacarosa (10 g L<sup>-1</sup>, *Sigma*) y Phytigel (2 g L<sup>-1</sup>, *Sigma*) como agente solidificante. Las semillas se mantuvieron en la oscuridad hasta su germinación y, posteriormente, se incubaron 15 días a 25°C con un fotoperiodo de 16 h con una intensidad de luz de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 5.2.2 Condiciones de cultivo

Todos los ensayos se realizaron en agrolita contaminada artificialmente o no con Pb. La agrolita fue lavada previamente (3 lavados con agua destilada) y tamizada (1.19 - 4.76 mm, entre tamices 16 y 4). Cada plántula obtenida en las cajas Magenta se transfirió a un tubo de cultivo (38 × 200 mm, *Pyrex*) que contenía 5 g de agrolita seca (AS) hidratada (75% de humedad) con medio MS, adicionado con sacarosa (10 g L<sup>-1</sup>, *Sigma*) y, en donde se indica,

con Pb en forma de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (*JT Baker*). Todos los medios se ajustaron a pH 5.7 con NaOH 0.5 N antes de su esterilización en autoclave (121°C, 15 min). Las plántulas se mantuvieron bajo una intensidad de luz de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 16 horas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante el tiempo establecido para los tratamientos descritos a continuación.

### **5.3 Ensayos de resistencia y bioacumulación**

La resistencia y capacidad de bioacumulación de Pb por *D. viscosa* se determinaron en tubos con agrolita con diferentes concentraciones de Pb (0, 500, 1000, 2000 y 3000  $\text{mg kg}^{-1}$  AS). El contenido de nitrógeno adicionado en forma de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  en los medios, fue compensado con  $\text{NaNO}_3$  (*JT Baker*). Para cada tratamiento, se cultivaron 12 plántulas durante 45 días en las condiciones descritas anteriormente. Finalizado el período de crecimiento, las plántulas se cosecharon y se secaron (60°C, 48 h) para su análisis.

La resistencia de *D. viscosa* a Pb se cuantificó a través de la determinación de variables como: (i) el crecimiento, medido a través de la elongación y el peso seco de la parte aérea y las raíces por separado; (ii) la acumulación de Pb en brotes<sup>6</sup> y raíces; (iii) la concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) de Pb (Sección 5.6). Una vez calculada la  $\text{CI}_{50}$ , se seleccionó una concentración subinhibitoria de Pb (2000  $\text{mg kg}^{-1}$  AS), para los ensayos cinéticos.

### **5.4 Ensayos cinéticos (respuesta antioxidante)**

Se realizaron ensayos cinéticos con una duración de hasta 105 días, con el fin de evaluar el efecto de la exposición de *D. viscosa* a una concentración subinhibitoria ( $\text{sub-}\text{CI}_{50}$ ) de Pb sobre el crecimiento, tasa de bioacumulación, producción de glutatión (GSH) y la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y guayacol peroxidasa (G-POX). Para lo anterior, plántulas de 15 días se trasplantaron a tubos de cultivo sin Pb o con 2000  $\text{mg Pb kg}^{-1}$  AS. Las plántulas se mantuvieron bajo las condiciones antes descritas durante 0, 10, 25, 45 y 105 días. Las plántulas correspondientes al tiempo inicial (0 días) fueron aquellas germinadas y crecidas por 15 días en cajas Magenta. Para cada tiempo de muestreo, se procesaron 24 plántulas de la siguiente forma: (i) 12 se secaron en estufa (60°C, 48 h) y se utilizaron para la cuantificación del crecimiento; que posteriormente se distribuyeron en tres vasos de Teflón (cuatro plántulas por recipiente) para su digestión ácida y análisis de Pb; (ii) 12 fueron separadas en tres grupos y procesadas en fresco para determinar el contenido de glutatión total ( $\text{GSH}_T$ ), glutatión oxidado (GSSG), proteína total

---

<sup>6</sup> Se denomina brote al sistema conformado por el tallo y sus hojas (Raven y Johnson, 2002)



y la actividad de las enzimas GST, CAT y G-POX en brotes y raíces frescos. Las mediciones se realizaron mediante análisis destructivos para cada tiempo de muestreo.

## 5.5 Cuantificación del crecimiento de *D. viscosa*

Una vez finalizado el período de crecimiento establecido para cada ensayo, las plántulas de *D. viscosa* se cosecharon de la agrolita, se lavaron con agua destilada y se separaron en brotes y raíces con el fin de realizar las mediciones de crecimiento. Para ello, se midió la biomasa y longitud de los brotes (distancia desde la base del tallo hasta el ápice terminal) y las raíces en cada condición. La longitud de brotes y raíces se midió mediante un analizador y procesador digital de imágenes (*ImageJ* Software, National Institute of Health, USA). Las determinaciones de biomasa se realizaron en base seca (PS), después de secar el tejido vegetal (60°C, 48 h). Con los datos de producción de biomasa (PS) de brotes (IT-BM<sub>i</sub>) o raíces (IT-BM<sub>r</sub>) se estimó el índice de tolerancia (IT) a Pb (Ec. 1) y la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de plántulas expuestas a Pb. El IT fue calculado de la siguiente manera (Audet y Charest, 2007):

$$IT (\%) = \frac{\text{Biomasa de plántulas con Pb}}{\text{Biomasa de plántulas sin Pb}} \times 100 \quad (1)$$

La CI<sub>50</sub> fue calculada a partir de una curva de dosis-respuesta del IT vs. la concentración de Pb, y corresponde a la concentración de Pb en la que se produjo una disminución del 50% en el IT, con respecto al valor máximo alcanzado (Naumann *et al.*, 2007).

## 5.6 Análisis de glutatión y actividades enzimáticas

### 5.6.1 Preparación de extractos crudos

Con el fin de determinar el contenido de glutatión (GSSG y GSH<sub>T</sub>), así como las actividades enzimáticas GST, CAT y GPX, las muestras frescas de brotes (~100 mg de peso fresco, PF) y raíces (~50 mg PF) de *D. viscosa* se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 1 mL de la solución de extracción respectiva: (i) amortiguador de fosfatos de sodio (50 mM, pH 7) para el contenido de proteína total y las actividades GST, CAT y G-POX; (ii) ácido metafosfórico (AMF) al 5% para GSH<sub>T</sub>, ó (iii) AMF al 5% con 2-vinilpiridina (2-VP, 1 mM) para glutatión disulfuro, GSSG (Griffith, 1980). Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 12000 x *g* durante 15 min a 4°C y los sobrenadantes,

considerados como extractos enzimáticos crudos (EEC), se utilizaron para las determinaciones.

### 5.6.2 Contenido de proteína

El contenido de proteína en los extractos crudos se cuantificó por el método de Lowry *et al.* (1951), con albúmina sérica bovina como patrón de calibración (0 – 1 mg mL<sup>-1</sup>). Las determinaciones de proteína se utilizaron para estimar un índice protéico (IP) (Ec. 2), como una medida relativa que indica la relación entre el contenido de proteína en las muestras expuestas a Pb con respecto a las muestras de las plantas control.

$$IP = \frac{\text{Contenido de proteína en plántulas con Pb}}{\text{Contenido de proteína en plántulas sin Pb}} \quad (2)$$

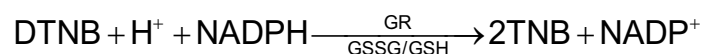
### 5.6.3 Glutación total y oxidado

Para cuantificar la concentración de glutatión, los extractos crudos se neutralizaron (pH~7) con trietanolamina (0.45 M) para la precipitación de proteínas antes del análisis (Griffith, 1980). El contenido de GSH<sub>T</sub> y GSSG se determinó espectrofotométricamente con un kit comercial (CS0260, *Sigma-Aldrich*). La tasa de producción de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), por reducción del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), se monitoreó espectrofotométricamente a 412 nm en un lector de placas (*ELX808, BIO-TEK Instruments*).

El GSSG formado es reciclado por la glutatión reductasa (GR) y NADPH, y cuantificado como parte del glutatión total. La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a la concentración de GSH<sub>T</sub> en la muestra. El contenido de GSSG se cuantificó selectivamente a través de la tasa de producción de TNB, en muestras en las que el glutatión reducido (GSH) fue enmascarado por la presencia de 2-VP (2-vinilpiridina) (Griffith, 1980). El GSSG en la muestra se reduce entonces por la GR, generando GSH. Se consideró que se detectan dos moles de GSH por cada mol de GSSG.



#### La reacción combinada



La mezcla de reacción contenía 150  $\mu\text{L}$  de mezcla de trabajo, 50  $\mu\text{L}$  de NADPH  $0.16 \text{ mg mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{L}$  de ácido metafosfórico (AMP) al 5% y 10  $\mu\text{L}$  del extracto crudo, con o sin 2-VP. La concentración final de los componentes en la mezcla de trabajo fue: amortiguador de fosfatos de sodio 95 mM con EDTA 0.95 mM (pH 7.0), NADPH 48 mM, DTNB  $0.031 \text{ mg mL}^{-1}$ , solución GR  $0.115 \text{ unidades mL}^{-1}$  y AMF al 0.24%. El contenido de GSH y GSSG se calculó a partir de una curva estándar de GSH (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) en AMF al 5%. La concentración de GSH se calculó por la diferencia entre la concentración de GSH<sub>T</sub> y la de GSSG. El grado de oxidación (GO) de las muestras, se calculó con las concentraciones de GSH ([GSH]) y GSSG ([GSSG]), mediante la Ec. 3 (Meyer y Hell, 2005):

$$\text{GO (\%)} = \frac{2 [\text{GSSG}]}{[\text{GSH}] + 2[\text{GSSG}]} \times 100 \quad (3)$$

## 5.6.4 Actividades enzimáticas

### 5.6.4.1 Glutación S-transferasa (GST, E.C. 2.5.1.18)

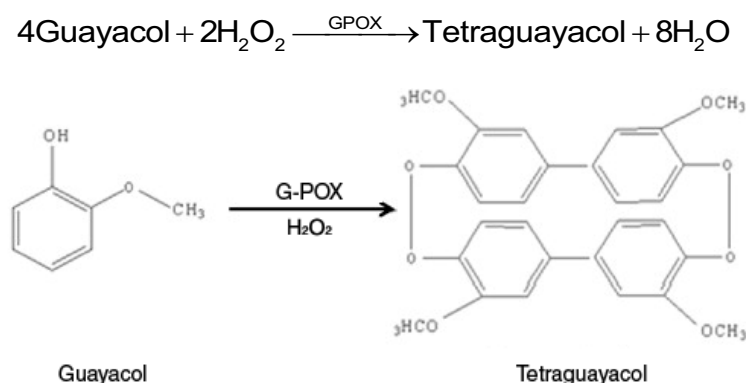
La actividad GST se determinó espectrofotométricamente en los EEC, utilizando un kit comercial (CS0410, *Sigma-Aldrich*). El ensayo mide el aumento de la absorbancia a 340 nm del conjugado formado entre el grupo tiol del glutati3n (GSH) y el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), en una reacci3n catalizada por la GST (Habig y Jakoby, 1981).



La mezcla de reacci3n contenía 190  $\mu\text{L}$  de la soluci3n de sustrato y 10  $\mu\text{L}$  de EEC. La soluci3n de sustrato contenía 980  $\mu\text{L}$  de soluci3n de amortiguador salino de fosfato de Dulbecco (DPBS) (pH 7,5), 10  $\mu\text{L}$  de L-glutati3n reducido (GSH) 200 mM y 10  $\mu\text{L}$  de CDNB 100 mM. En el blanco, el GSH fue reemplazado por H<sub>2</sub>O destilada. El aumento en la absorbancia a 340 nm se monitore3 en un lector de placas y la actividad enzimática se calcul3 a partir de la velocidad inicial de la reacci3n con un coeficiente de extinci3n molar ( $\epsilon$ ) de  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el conjugado formado por el GSH y el CDNB. Una unidad de actividad GST se defini3 como la cantidad de enzima que cataliza la formaci3n de 1  $\mu\text{mol}$  del conjugado GSH-CDNB por minuto a 25°C y pH 7,5 (Wilce y Parker, 1994).

### 5.6.4.2 Guayacol peroxidasa (G-POX, EC 1.11.1.7)

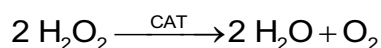
La actividad G-POX en los EEC se determinó con guayacol como sustrato reductor (Kim y Yoo, 1996). La tasa de formación de tetraguayacol por las peroxidasa a partir de guayacol, se determinó espectrofotométricamente en un lector de placas.



La mezcla de reacción contenía 210  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7), 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM en amortiguador de fosfatos), 10  $\mu\text{L}$  de guayacol (1% en amortiguador de fosfatos) y 10  $\mu\text{L}$  de EEC. La reacción se inició con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la actividad se midió a través del aumento en la absorbancia a 450 nm, debida a la formación de tetraguayacol. La actividad G-POX se calculó usando un  $\epsilon$  de  $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Maehly y Chance, 1954). En el control, se sustituyó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por agua destilada. Una unidad G-POX se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mmol de tetraguayacol por min a  $25^\circ\text{C}$ .

### 5.6.4.3 Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

La actividad CAT se determinó en los EEC midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm, debida a la desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en un espectrofotómetro UV-visible (Cary 50 Conc UV-Vis, Varian). La CAT cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , liberando agua y oxígeno como productos.



La mezcla de reacción contenía 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM) y 0.2 mL de EEC. La solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se preparó en el mismo amortiguador de extracción (amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7). La reacción se inició con la adición del EEC y la actividad enzimática se calculó con un  $\epsilon$  de  $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Aebi, 1984). Se utilizaron dos blancos: uno de EEC, en el que se sustituyó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el amortiguador de extracción y un blanco de reactivos en el

que se adicionó solamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una unidad CAT se define como cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min a 27°C (Aebi, 1984).

## **5.7 Análisis de Pb**

Previo al análisis Pb en las muestras de tejido vegetal, las raíces de *D. viscosa* se lavaron con una solución de EDTA (10 mM) para eliminar el Pb extracelular (Göthberg *et al.*, 2004) y, posteriormente, se enjuagaron nuevamente con agua desionizada (18 MΩ cm<sup>-1</sup>) obtenida de un equipo de destilación PURELAB Option-Q (*Elga*).

### **5.7.1 Digestión ácida asistida por microondas**

Para cuantificar el Pb acumulado intracelularmente en la biomasa de *D. viscosa* por espectrometría de absorción atómica (EAA), las muestras se digirieron en un digestor de microondas *CEM (MARSXpress)*. Para esto se pesaron entre 30 y 50 mg de raíces (PS) y alrededor de 100 mg de brotes (PS) en vasos para la digestión, y se adicionaron 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (69-70 %, *J.T. Baker*, Instra-analyzed) y 4 mL de H<sub>2</sub>O desionizada (*Milli-Q*, 18 MΩ cm<sup>-1</sup>). Después de su digestión, las muestras se dejaron enfriar, se filtraron (0.45 μm, *Millipore*) y se aforaron a 10 mL con agua desionizada. Lo extractos filtrados se analizaron por EAA.

### **5.7.2 Espectrometría de absorción atómica (EAA)**

El análisis de Pb en los extractos se llevó a cabo mediante el método de flama, utilizando una longitud de onda de 283 nm, con una mezcla aire-acetileno (1.5-2 L min<sup>-1</sup>) y una apertura del quemador de 0.5 mm. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (*Shimadzu*, AA-6300). Las curvas patrón para la cuantificación de Pb se prepararon con agua desionizada, en un intervalo de 0 a 12 mg L<sup>-1</sup>, con una solución estándar de 1000 μg mL<sup>-1</sup> de Pb (*J.T. Baker*, Instra-analyzed).

Con las concentraciones de Pb medidas, se estimaron los factores de translocación (FT) y de fitoestabilización (Fest). Ambos parámetros sirven como indicador para evaluar el potencial fitoremediador de una especie vegetal (Audet y Charest, 2007). El FT se definió como la relación entre la concentración de Pb acumulado en los brotes y la concentración en raíces (Ec. 4); mientras que el Fest se definió como la relación entre la concentración de Pb acumulado en raíces y la concentración de Pb inicial en la agrolita (Ec. 5).

$$FT = \frac{\text{Pb acumulado en brotes}}{\text{Pb acumulado en raíces}} \quad (4)$$

$$Fest = \frac{\text{Pb acumulado en raíces}}{\text{Pb inicial en agrolita}} \quad (5)$$

## **5.8 Análisis estadístico**

Las diferencias entre los tratamientos se analizaron mediante un ANOVA de una vía (ONE-WAY ANOVA) y la comparación entre medias se realizó utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Statgraphics Centurion XVI.I (*Statpoint Technologies, Inc., E.U.A.*). Los resultados se presentan como las medias obtenidas a partir de al menos tres repeticiones con su desviación estándar (DE).

Con el fin de seleccionar una variable representativa para la estimación de la  $CI_{50}$ , se realizó un análisis multivariado sobre las variables de crecimiento vegetal, por lo que los datos se estandarizaron para su comparación estadística mediante un análisis de componentes principales (ACP). Los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon para determinar si existía correlación entre la bioacumulación de Pb y las variables analizadas.

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este capítulo está dividido en dos secciones. En la primera se evalúa la resistencia y la capacidad de bioacumulación de Pb por plantas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb. Con base en los resultados de esta sección, se realizó un análisis estadístico para seleccionar la variable más sensible a la presencia de Pb y determinar una  $Cl_{50}$  que permitiera seleccionar una concentración sub- $Cl_{50}$  para el estudio de algunos mecanismos de tolerancia. En la segunda sección se analiza la capacidad de acumulación de Pb por la planta en función del tiempo de cultivo y su relación con la activación de mecanismos de tolerancia relacionados con el GSH y la actividad de algunas enzimas.

## **6.1 Resistencia y acumulación de Pb por *D. viscosa***

Se denomina resistencia a la capacidad de un organismo para sobrevivir bajo las condiciones de estrés que puede generar un agente externo, generalmente tóxico, en el ambiente. Particularmente, las plantas pueden responder favorablemente a estos cambios en el entorno a través de dos estrategias generales: (i) la exclusión, que es una respuesta de protección externa que evita la entrada de agentes “extraños” al interior de las células; o (ii) la tolerancia, que implica mecanismos de defensa intracelulares que reducen o neutralizan los efectos de elementos o moléculas que logran entrar, permitiendo que la planta pueda crecer normalmente, incluso en presencia de concentraciones altas de elementos tóxicos (Baker, 1987).

### **6.1.1 Crecimiento de *D. viscosa***

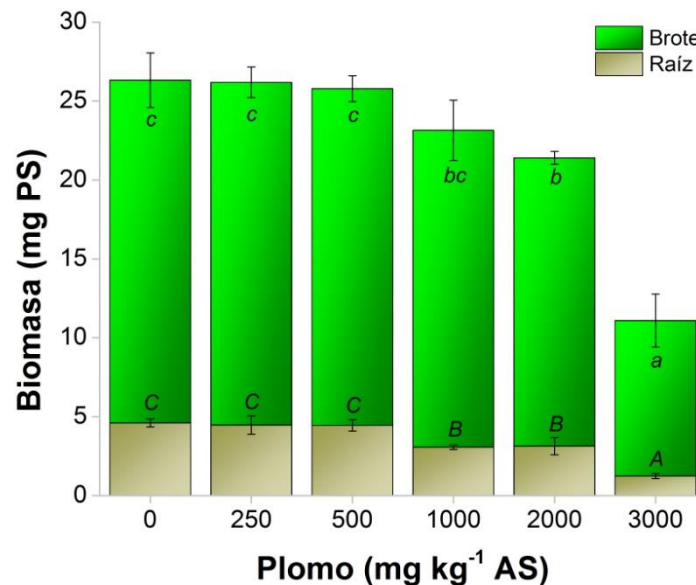
La acumulación de un EPT en plantas puede conducir a alteraciones en el metabolismo. Por tal motivo, es importante caracterizar la capacidad de una planta para resistir la presencia de estos elementos, con el fin de que puedan ser utilizadas con fines de fitorremediación (Pilon-Smits, 2005; Sharma y Dubey, 2005). Aunque la mayoría de las alteraciones producidas por los EPT ocurren a nivel celular, existen algunos síntomas de fitotoxicidad visibles como: i) necrosis; ii) clorosis; iii) oscurecimiento y disminución de la longitud de brotes y raíces (Sharma y Dubey, 2005). En el presente estudio, la resistencia de *D. viscosa* contra el efecto de diferentes concentraciones de Pb se evaluó a través del crecimiento, determinado a través de la producción de biomasa (Figura 12), la elongación (Figura 13) de brotes y raíces y la relación de crecimiento raíz-brote (Tabla 2).

Después de 45 días de cultivo, la producción de biomasa de las plántulas de *D. viscosa* no presentó efectos significativos, con respecto a las plantas control (Figura 12), por efecto de la presencia de 250 y 500 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS. Al aumentar la concentración de Pb a 1000 y



2000 mg kg<sup>-1</sup> AS, la producción de biomasa en brotes disminuyó ligeramente (8 y 16%, respectivamente), mientras que en las raíces se registró una disminución de 32 y 33%, respectivamente. La exposición de *D. viscosa* a 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS resultó fitotóxica, ya que provocó una reducción importante (55 y 73%, respectivamente) en la producción de biomasa de brotes y raíces.

La disminución en la producción de biomasa en brotes y raíces de plantas expuestas a altos niveles de Pb puede atribuirse a una inhibición en la tasa de división celular (Sharma y Dubey, 2005). Una respuesta similar la reportaron Hosseini *et al.* (2007), quienes sometieron dos variedades de *Brassica napus* a diferentes concentraciones (33-132 mg L<sup>-1</sup>) de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y observaron una disminución en la producción de biomasa de brotes (28-42 %) y raíces (24-50 %) por efecto de este compuesto.

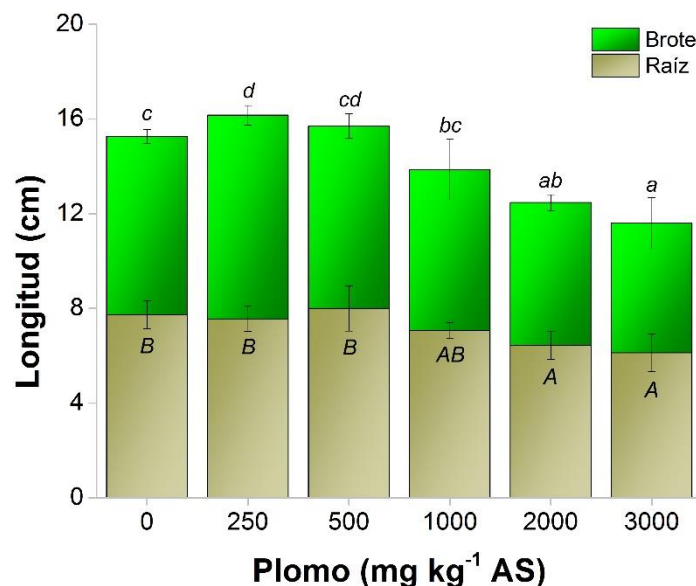


**Figura 12.** Producción de biomasa (peso seco, PS) de brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días (medias ± DE, n≥5). AS: agrolita seca. Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

La raíz fue el órgano de la planta que registró un mayor efecto negativo debido a la presencia de Pb. Esto puede atribuirse al hecho de que las raíces son el primer órgano de contacto de una planta con los EPT, además de su función como tejido de absorción (Abedin y Meharg, 2002). Esto ha sido observado en varios estudios. Por ejemplo, Ho *et al.* (2008), reportan una mayor reducción en la producción de biomasa de raíces con respecto a la de brotes en dos genotipos de *Zea mays* por efecto del Pb.

Además de su efecto en la producción de biomasa, la exposición de *D. viscosa* a 2000 y 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS provocó una disminución en la elongación de brotes y raíces, con respecto a las plantas control. Sin embargo, la exposición a concentraciones de Pb ≤ 1000 mg kg<sup>-1</sup> AS no tuvo un efecto negativo significativo sobre la elongación de brotes y raíces, encontrando inclusive un incremento en la elongación de brotes en plántulas expuestas a 250 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS (Figura 13). De acuerdo con Poschenrieder *et al.* (2013) este efecto podría deberse a que la exposición a bajas dosis de EPT como el Pb, As, Cd y Cr puede activar respuestas de defensa en las plantas relacionadas con la sobreexpresión de enzimas antioxidantes y con el metabolismo del glutatión.

Al aumentar la concentración de Pb hasta 2000 y 3000 mg kg<sup>-1</sup> AS, la elongación de la planta disminuyó con respecto al control (del 20 y 27% en raíces y del 17 al 21 % en brotes). Se ha corroborado que EPT como el As pueden desencadenar eventos que estimulan el metabolismo de *Pteris vittata*, un helecho tolerante, favoreciendo su crecimiento directa o indirectamente (Ma *et al.*, 2001).



**Figura 13.** Elongación de brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días (medias ± DE, n≥5). AS: agrolita seca. Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

De forma general se puede observar que el aumento en la concentración inicial de Pb tuvo efecto mayor sobre la producción de biomasa de las plántulas de *D. viscosa*, en comparación con los cambios registrados sobre la elongación (Figuras 12 y 13). Fue así

que, al estudiar el efecto del Pb sobre la relación raíz-brote, el efecto fue mayor cuando se calculó a partir de la biomasa producida ( $RB_B$ ), en comparación con la relación obtenida a partir de la elongación ( $RB_L$ ) (Tabla 2).

Los cambios producidos en la relación raíz-brote ( $RB_B$ ) fueron dependientes de la concentración inicial de Pb, registrándose una disminución significativa (19 – 40%) con respecto a las plantas control, en concentraciones superiores a 2000 mg Pb  $kg^{-1}$  AS.

**Tabla 2.** Relación raíz-brote (biomasa y longitud) de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días\*.

Plomo (mg $kg^{-1}$ AS)**	Relación raíz-brote ( $RB_B$ , mg $mg^{-1}$ )	Relación raíz-brote ( $RB_L$ , cm $cm^{-1}$ )
0	0.212 ± 0.009 <sup>c</sup>	1.030 ± 0.049 <sup>b</sup>
250	0.206 ± 0.019 <sup>c</sup>	0.879 ± 0.025 <sup>a</sup>
500	0.210 ± 0.011 <sup>c</sup>	1.053 ± 0.079 <sup>b</sup>
1000	0.153 ± 0.007 <sup>ab</sup>	1.063 ± 0.152 <sup>b</sup>
2000	0.171 ± 0.027 <sup>b</sup>	1.067 ± 0.045 <sup>b</sup>
3000	0.127 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.147 ± 0.234 <sup>b</sup>

\* Los valores son las medias ± DE ( $n \geq 5$ ).

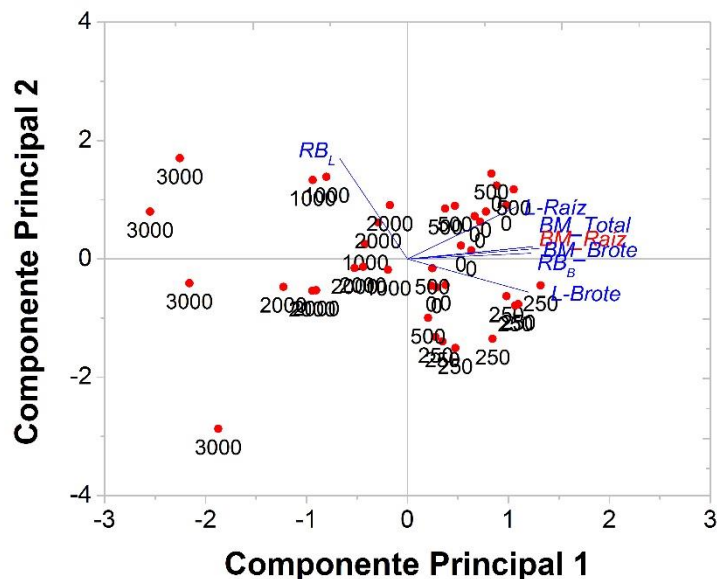
\*\* Medias con diferente letra por columna indican diferencias significativas (Tukey;  $P < 0.05$ ).

### 6.1.2 Selección de una variable representativa para la estimación de la $CI_{50}$

Con el fin de llegar a conclusiones certeras sobre la capacidad de una especie para resistir la presencia de un EPT, es importante seleccionar adecuadamente la(s) variable(s) de respuesta más sensible(s) (García de la Torre *et al.*, 2013). Con base en lo anterior, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de identificar las variables que proporcionarían más información acerca de la respuesta de *D. viscosa* a la presencia de Pb. Mediante este análisis se lograron extraer dos componentes principales (CP) los cuales, en conjunto, explican el 90 % de la variabilidad total de los datos. El 75% de esa variabilidad es atribuible al CP1 y el 15% restante al CP2. Como puede observarse en la Figura 14, el CP1 separa muy bien a los individuos con base en el tratamiento recibido (la concentración inicial de Pb), mientras que el CP2 no permite establecer una separación clara entre las muestras.

Al analizar la Figura 14 y la tabla de cargas (Tabla A1, Anexo I) se encontró que seis de las siete variables analizadas presentaron una carga similar dentro del CP1. Esta distribución

equitativa de cargas, indica que el comportamiento de las variables analizadas por efecto del Pb fue muy parecido. Así, tomando en cuenta la carga de cada variable dentro del CP1 y que este componente explica la mayor parte de la variabilidad total, se encontró que la biomasa de raíces (base seca) fue la variable más sensible a la exposición de Pb en *D. viscosa*. En consecuencia, se seleccionó la biomasa de raíces como la variable representativa para calcular el índice de tolerancia (IT-BM<sub>r</sub>) y la CI<sub>50</sub>.



**Figura 14.** Bigráfica de puntuaciones (●) y cargas de cada una de las variables analizadas (vectores en azul) para el CP1 y CP2.

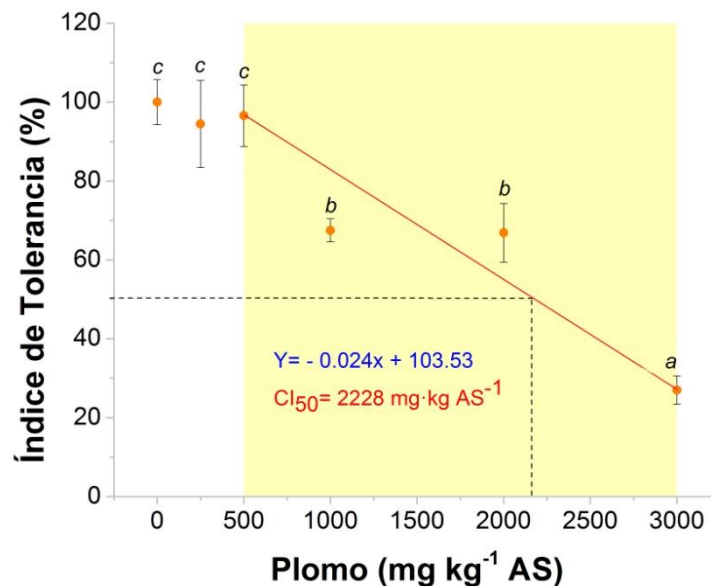
### 6.1.3 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)

El uso de estimadores de crecimiento permite conocer la resistencia y la capacidad de respuesta de un organismo cuando es expuesto a elementos o sustancias tóxicas. Entre los estimadores de crecimiento vegetal más usados se encuentran: la producción de biomasa, longitud de raíces y brotes, y la tasa de crecimiento (Mishra *et al.*, 2006). La cuantificación de este tipo de variables, permite evaluar la resistencia de una planta a un estresor en particular, a través de la estimación de índices de tolerancia (Rabie, 2005; Saleh y Al-Garni, 2006).

De forma general, las plántulas de *D. viscosa* mostraron resistencia a Pb en un intervalo de 250 a 2000 mg kg<sup>-1</sup> AS después de exponerlas durante 45 días, ya que no presentaron señales visibles de estrés, como es la clorosis. Los valores del IT (IT-BM<sub>r</sub>) no se modificaron significativamente por la presencia de Pb hasta 500 mg kg<sup>-1</sup> AS, manteniéndose alrededor

de 100%. El aumento en la concentración inicial de Pb a niveles de 1000 y 2000 mg kg<sup>-1</sup> AS, redujo significativamente el valor de IT en un 32 y 34%, respectivamente. La disminución más drástica (73%) en el valor del IT se observó en plántulas expuestas a 3000 mg Pb·kg AS<sup>-1</sup> (Figura 15).

Estos resultados indican que, aunque *D. viscosa* creció en todas las concentraciones de Pb ensayadas, en 3000 mg kg<sup>-1</sup> AS, las plántulas mostraron síntomas de fitotoxicidad, como es la disminución en el IT debida a la reducción en producción de biomasa en raíces. Con base en estos datos, se estimó un valor de la CI<sub>50</sub> de 2228 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS, la cual es una medición cuantitativa que indica que concentración de Pb inicial es necesaria para inhibir el crecimiento (IT) de *D. viscosa* en un 50% (Figura 15). Fue así que este valor fue utilizado como referencia para definir una concentración sub-inhibitoria de trabajo de 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS para los ensayos cinéticos posteriores, de tal manera que la concentración de Pb fuera lo suficientemente alta para desencadenar los mecanismos de defensa en la planta, pero sin inhibir o alterar el crecimiento (Liu *et al.*, 2008).



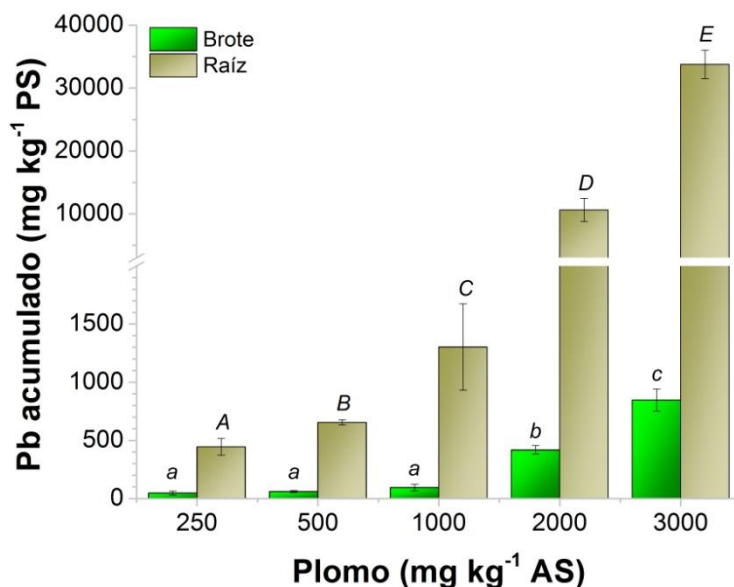
**Figura 15.** Índice de tolerancia (IT-BM<sub>r</sub>) de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días. La línea punteada indica un valor del 50% en el IT, que fue considerado para el cálculo de la CI<sub>50</sub> (medias ± DE, n≥5). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

Es importante resaltar que la disminución registrada en el IT ocurrió después de 45 días de exposición, lo que confirma la capacidad de *D. viscosa* para resistir la presencia de concentraciones altas de Pb. Esta capacidad es mayor a la reportada por Piechalak *et al.*

(2002) en plántulas de especies como *Vicia faba*, *Pisum sativum* y *Phaseolus vulgaris*, las cuales registraron disminuciones en el IT entre 50 y 60 % después de 96 h de exposición a una concentración inicial de 331 mg L<sup>-1</sup> de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la capacidad de las plantas para resistir la presencia de concentraciones altas de EPT está relacionada con la activación de mecanismos de tolerancia, que les permite contrarrestar el estrés producido por estos elementos.

#### 6.1.4 Bioacumulación de Pb

Se encontró que la capacidad de bioacumulación de Pb por *D. viscosa* fue dependiente de la dosis inicial. Por lo que la cantidad de Pb acumulado, en brotes y raíces, aumentó conforme se incrementó la concentración inicial de Pb en el medio, registrando niveles de bioacumulación de hasta ~900 ± 100 y 33800 ± 2300 mg kg<sup>-1</sup> PS en brotes y raíces respectivamente, de plantas expuestas a 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS por 45 días (Figura 16).



**Figura 16.** Bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días (medias ± DE, n=3). AS: agrolita seca. Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

La capacidad de bioacumulación de Pb por *D. viscosa* fue superior a lo reportado en trabajos similares con otras especies. Por ejemplo, Zou *et al.* (2011) encontraron niveles de bioacumulación de hasta ~500 y ~30000 mg kg<sup>-1</sup> PS en brotes y raíces, respectivamente, de

*Athyrium wardii* después de 48 días de crecimiento en contacto con diferentes concentraciones de Pb (0-1000 mg Pb Kg<sup>-1</sup>).

En *D. viscosa*, la raíz fue el sitio principal de acumulación de Pb, encontrando concentraciones entre 10 y 40 veces más altas que las registradas en brotes, lo que representa entre el 68 y 85% del Pb total acumulado por la planta. Este resultado se vio reflejado en los valores del FT y Fest obtenidos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Indicadores del potencial fitorremediador de plántulas de *D. viscosa* expuestas a diferentes concentraciones de Pb durante 45 días\*

Plomo (mg kg <sup>-1</sup> AS)**	FT	Fest	Pb total acumulado por planta (µg)		Pb acumulado en raíz (%)***
			Brote	Raíz	
250	0.080 ± 0.026 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	68.0
500	0.077 ± 0.017 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	71.0
1000	0.084 ± 0.023 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	65.2
2000	0.034 ± 0.005 <sup>a</sup>	4.93 ± 0.42 <sup>b</sup>	7.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	27.8 ± 5.2 <sup>b</sup>	79.2
3000	0.025 ± 0.006 <sup>a</sup>	10.90 ± 0.32 <sup>c</sup>	7.7 ± 1.6 <sup>b</sup>	41.9 ± 2.8 <sup>c</sup>	84.6

\* Los valores son las medias ± DE (n=3).

\*\* Medias con diferente letra por columna indican diferencias significativas (Tukey; P < 0.05).

\*\*\* Se refiere a la fracción de Pb bioacumulado en raíces con respecto al total bioacumulado.

Al incrementar la concentración inicial de Pb aumentó la bioacumulación en brotes y raíces de *D. viscosa*, que estuvo acompañado por una disminución en los valores del FT. Esta disminución, está relacionada con el hecho de que el aumento en el Pb bioacumulado en las raíces fue mayor (hasta ~42 µg) que el registrado en los brotes (hasta ~8 µg). Lo anterior condujo a la obtención de valores menores a la unidad (0.03) en plántulas expuestas a 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS. Debido a la alta retención de Pb en las raíces y, de manera contraria al FT, los valores del Fest aumentan en función del incremento en la concentración de Pb inicial, obteniendo valores de hasta 10.9 en las plántulas crecidas en presencia de 3000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS.

De acuerdo con Audet y Charest (2007), valores del FT < 1 indican una capacidad baja para translocar el Pb hacia la parte aérea, por lo que los resultados obtenidos indican que este elemento está siendo estabilizado, principalmente, en las raíces de *D. viscosa*. Esta capacidad de estabilización de Pb por *D. viscosa* fue medida a través del Fest, un parámetro propuesto en este trabajo, que relaciona la concentración de Pb acumulado en raíces con respecto a la concentración inicial de Pb en el medio. *D. viscosa* mostró valores del Fest >>

1, lo que indica una alta capacidad de fitoestabilización y sugiere un gran potencial para su aplicación con fines de fitorremediación.

Otros trabajos como el de Ho *et al.* (2008) han reportado el carácter fitoestabilizador de Pb ((PbNO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) de plantas como *Hibiscus cannabinus*, la cual registró valores bajos del FT (<0.4) cuando fue expuesta a diferentes concentraciones de Pb (0-400 mg L<sup>-1</sup>) y en donde la acumulación de Pb en raíces (~4000 mg kg<sup>-1</sup>) fue hasta ~80 superior a la registrada en los brotes (~50 mg kg<sup>-1</sup>). Se ha propuesto que la retención de EPT en las raíces de las plantas, ya sea por sorción o por precipitación, constituye un mecanismo adaptativo de las plantas. Este mecanismo permite regular la cantidad de elementos que son transportados hacia los tejidos aéreos, evitando así la alteración de procesos metabólicos importantes como la fotosíntesis (Blaylock *et al.*, 1997).

Una retención alta de Pb en las raíces de una planta puede atribuirse a su capacidad de unión con los sitios de intercambio iónico presentes en la pared celular, así como a la formación de precipitados extracelulares, principalmente en forma de carbonatos (Blaylock *et al.*, 1997). Se ha propuesto que las plantas pueden disminuir la disponibilidad y, en consecuencia, la toxicidad de un elemento a través de la activación de mecanismos involucrados en la fitoestabilización, que implican su transformación en formas menos solubles, como sulfatos, fosfatos o carbonatos metálicos y complejos con ácidos orgánicos, o bien, mediante la sorción superficial y acumulación en la raíz (Mendez y Maier, 2008).

Una ventaja de la aplicación de plantas fitoestabilizadoras para remediar suelos contaminados con EPT es que reducen la cantidad de contaminantes libres, evitando así su movilización o transporte por eventos naturales como la erosión y lixiviación (Ho *et al.*, 2008).

## **6.2 Cinética de bioacumulación de plomo por *D. viscosa***

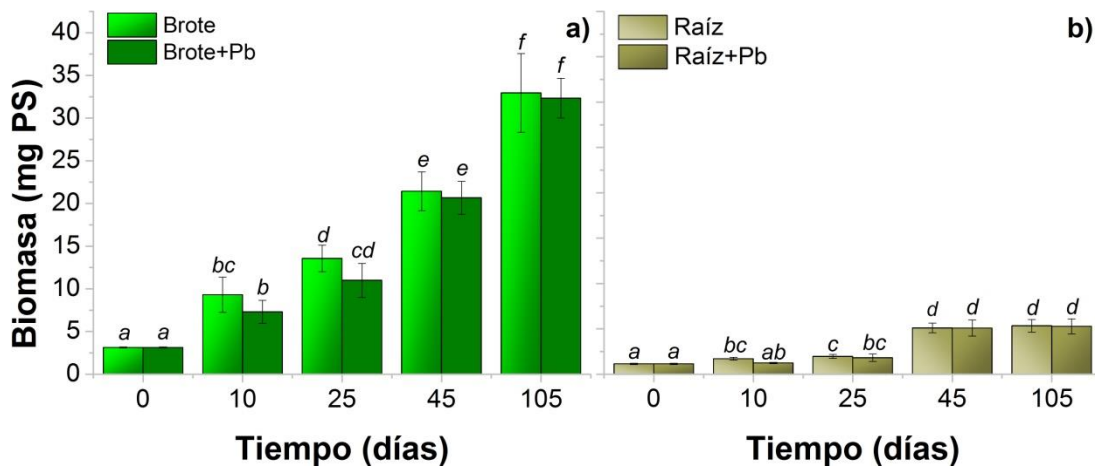
Está demostrado que el grado de fitotoxicidad de un EPT depende del tiempo de contacto, y la cantidad de contaminante bioacumulado (Mishra *et al.*, 2006). La fitotoxicidad puede evaluarse a través de variables que pueden usarse como indicadores del desarrollo y crecimiento vegetal. Entre éstas se encuentran: biomasa, longitud de raíces y brotes, tasa de crecimiento y contenido de proteína (Baker, 1987; Mishra *et al.*, 2006).

### **6.2.1 Crecimiento de *D. viscosa***

Una vez que se estableció, a partir del valor de la CI<sub>50</sub> (sección 6.1.3) una concentración de trabajo inicial de 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS, se analizó el efecto del tiempo de exposición a Pb



sobre el crecimiento de plántulas de *D. viscosa*. Los datos de producción de biomasa (base seca) indican que las plántulas de *D. viscosa* resistieron la presencia de 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante tiempos de exposición prolongados, ya que no presentaron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a los controles (Figura 17). Si bien en ambos órganos se observó una disminución en la producción de biomasa durante los primeros 25 días, las diferencias con respecto al control no fueron significativas.

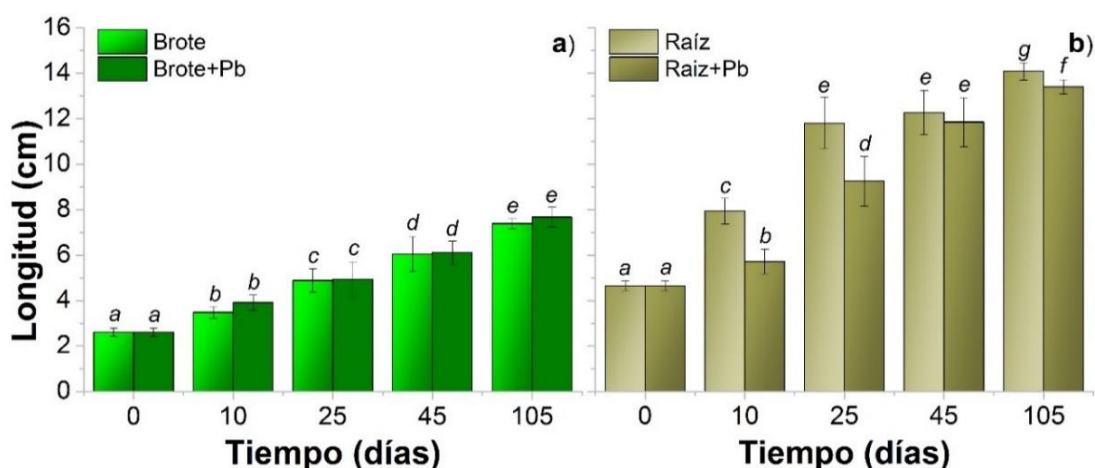


**Figura 17.** Efecto del tiempo de exposición a 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS sobre la producción de biomasa (peso seco, PS) de brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* (medias  $\pm$  DE,  $n \geq 12$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

La longitud de brotes y raíces de *D. viscosa* tampoco se modificó significativamente por efecto de la presencia de Pb durante 105 días (Figura 18), y las plántulas de *D. viscosa* no mostraron signos de fitotoxicidad después de 105 días de exposición. Aunque se registró una disminución importante en la elongación de raíces en tiempos cortos de exposición (28 y 22% a los 10 y 25 días, respectivamente). A tiempos posteriores no se observaron diferencias significativas en la longitud de raíces entre plantas crecidas con o sin Pb, lo que significa que las plantas crecidas con Pb se recuperaron a partir de los 45 días, lo que corrobora su capacidad para resistir la presencia de este elemento.

La reducción inicial (10 – 25 días) en el crecimiento de *D. viscosa* podría relacionarse con la bioacumulación de Pb por la planta, ya que, el Pb es tóxico para muchas plantas debido a que puede provocar la alteración de la tasa de germinación de las semillas, disminución de la producción de biomasa y de la elongación de los tejidos, inhibición de la síntesis de clorofilas; así como alteraciones y lesiones a nivel cromosomal (Xiong, 1998).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados en varios estudios que han demostrado la capacidad de diferentes plantas para tolerar la presencia de Pb. Por ejemplo, Miller *et al.* (2011) demostraron la tolerancia de plantas de *Sesbania exaltata* crecidas por 10 semanas en suelos contaminados con concentraciones de hasta 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup>. Otras especies que han mostrado alta tolerancia incluyen *Hibiscus cannabinus*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* y *Vicia faba* (Piechalak *et al.* 2002; Ho *et al.* 2008). Muchos organismos resistentes a Pb pueden sobrevivir en ambientes contaminados debido a mecanismos de exclusión, o bien, a la reducción del efecto tóxico del metal mediante la activación de mecanismos de detoxificación intracelular (Piechalak *et al.*, 2002).



**Figura 18.** Efecto del tiempo de exposición a 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS sobre la elongación de brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* (medias ± DE, n≥12). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

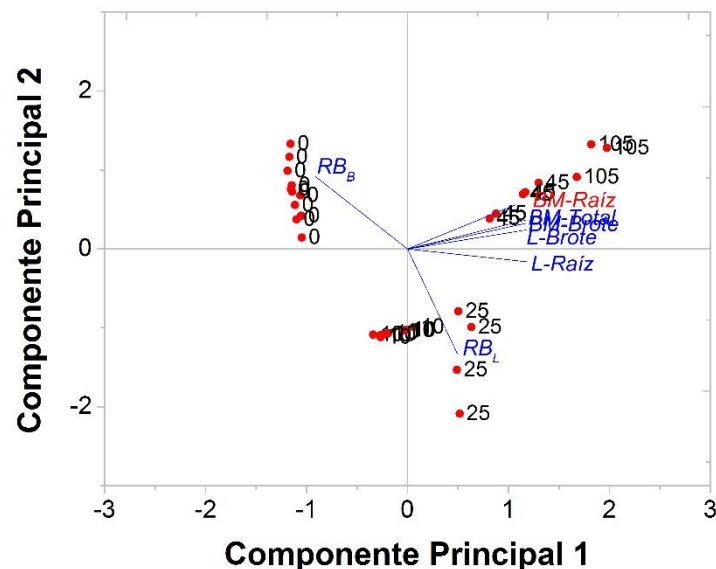
Los efectos del Pb sobre el crecimiento de una planta pueden ser diversos. Por ejemplo, Xiong (1998) reportó que la exposición de *Brassica pekinensis* a una concentración inicial de 1000 mg Pb kg<sup>-1</sup> provocó respuestas opuestas, dependiendo de la variable de crecimiento cuantificada. La acumulación de Pb por esta especie, causó una reducción (~90%) en la elongación de raíces y brotes y, al mismo tiempo, un estímulo en la producción de biomasa en ambos órganos (11 y 62%, respectivamente).

*D. viscosa* mostró una resistencia alta a la exposición a Pb por periodos prolongados (hasta 105 días), comparado con lo reportado para otras especies. Particularmente, Mahmood *et al.* (2007) reportaron una inhibición de 43, 37 y 19% (respectivamente) en la relación raíz-brote (RB<sub>P</sub>) de plántulas de *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum* expuestas a 2.8 mg Pb L<sup>-1</sup> (en forma de PbCl<sub>2</sub>) después de sólo 3 días de contacto. De hecho, los efectos de los EPT sobre las plantas también varían en función de la etapa de crecimiento en la

que son expuestas (Cheng, 2003). Otros factores que influyen son la concentración biodisponible del elemento, así como las diferencias geno y fenotípicas entre especies (Sharma y Dubey, 2005).

### 6.2.2 Selección de una variable representativa para la estimación del IT

Para estimar el IT de las plántulas expuestas a Pb durante diferentes tiempos de cultivo se realizó un análisis de componentes principales con todas las variables de crecimiento evaluadas. Así, se identificó la variable que recibe mayor influencia por el efecto del Pb (Figura 19). Nuevamente, mediante este análisis se lograron extraer dos componentes principales (CP) que explican el 94% de la variabilidad total de datos. El 73% de esa variabilidad se puede atribuir al CP1 y el 21% restante al CP2.



**Figura 19.** Bigráfica de puntuaciones (●) y cargas de cada una de las variables analizadas (vectores en azul) para el CP1 y CP2

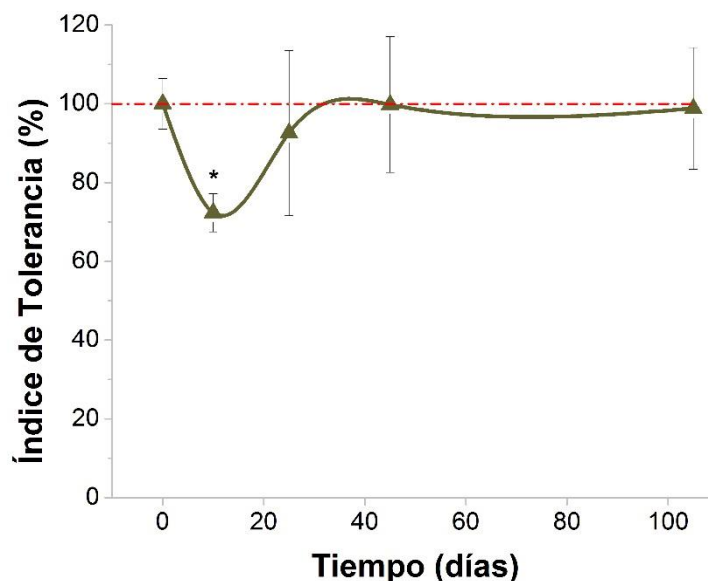
Como se observa en la Figura 19, el CP1 separa muy bien a los individuos con base en los diferentes tiempos en que fueron expuestos al Pb. Por otra parte, el CP2 separó de mejor manera a los individuos entre los que fueron tratados con Pb durante tiempos cortos, de aquellos que sufrieron una exposición prolongada. De manera similar a los resultados obtenidos en el análisis realizado en función de la concentración de Pb, la distribución de las cargas dentro de cada uno de los CP se repartió casi equitativamente entre las variables analizadas (Tabla A2, Anexo I).

Estos resultados demuestran que el efecto del tiempo de exposición al Pb fue muy similar en todas las variables analizadas. Tomando en cuenta el peso de cada variable, se seleccionó la biomasa de raíces (base seca) como variable representativa para estimar el índice de tolerancia (IT-BM<sub>r</sub>), ya que ésta es la que presentó mayor carga en ambos CP. También es importante considerar que, en este caso, tanto el CP1 como el CP2 explican la variabilidad de los datos producida tanto por efecto del tiempo como de la presencia de Pb.

### 6.2.3 Índice de tolerancia en función del tiempo de exposición a Pb

Los valores del IT de plántulas expuestas a 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS mostraron una disminución significativa (28%) con respecto a los controles, durante los primeros 10 días de contacto. Durante ese período, la tasa de crecimiento de las raíces también disminuyó por efecto de Pb, encontrando una media de 0.009 mg PS día<sup>-1</sup> por planta, en comparación con una tasa de 0.056 mg PS día<sup>-1</sup> registrada en las plantas control. A partir de los 45 días no se registraron diferencias significativas, ni en la tasa de crecimiento (~ 0.03 mg PS día<sup>-1</sup>) ni en el IT, entre las plántulas expuestas a Pb y los controles (Figura 20).

Varios estudios muestran que el Pb inhibe el crecimiento vegetal, reduce el IT y la producción de biomasa de brotes y raíces en varias especies (Sharma y Dubey, 2005). Por ejemplo, Baranowska-Morek y Wierzbicka (2004) encontraron una disminución en el IT de plántulas de *Dianthus carthusianorum* durante los primeros 5 días de tratamiento con Pb (5 mg L<sup>-1</sup>); posteriormente el IT se estabilizó y se mantuvo en un 70% por debajo del valor encontrado en los controles. Mishra *et al.* (2006), reportaron una disminución en la producción de biomasa de plantas de *Ceratophyllum demersum* expuestas a Pb (20.7 a 0.207 mg L<sup>-1</sup>) durante periodos de hasta 7 días. En el caso de *D. viscosa*, la reducción inicial del crecimiento y su recuperación posterior, sugiere la activación de mecanismos de resistencia que le permiten recuperarse de la toxicidad inicialmente generada por el Pb.

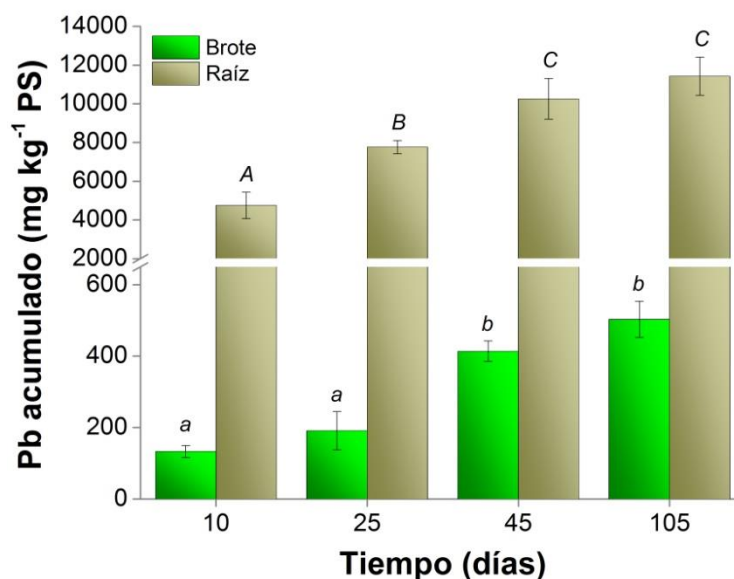


**Figura 20.** Cinética del efecto de la exposición a  $2000 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ AS}$  sobre el índice de tolerancia (IT-BM<sub>r</sub>) de plántulas de *D. viscosa* crecidas en condiciones *in vitro* por 105 días (medias  $\pm$  DE,  $n \geq 12$ ). La línea punteada indica el valor del IT-BM<sub>r</sub> (100%) de las plántulas control. Las diferencias significativas (t-student;  $P < 0.05$ ) con respecto a los controles se indican con un asterisco (\*).

#### 6.2.4 Bioacumulación de Pb en función del tiempo

De manera similar a los resultados obtenidos en la sección anterior, se encontró una capacidad elevada de bioacumulación de Pb por *D. viscosa*, la cual fue dependiente del tiempo de exposición, ya que el contenido de Pb en tejidos aumentó en función del tiempo de contacto entre las plántulas y este elemento. De la cantidad total de Pb bioacumulado, ~90% fue retenido en las raíces (Tabla 4), en donde se encontraron concentraciones de hasta  $11400 \pm 1000 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ PS}$  en plántulas expuestas a  $2000 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ AS}$  durante 105 días (Figura 21).

En un estudio previo (Baranowska-Morek y Wierzbicka, 2004), se reportó la capacidad de *D. carthusianorum* para acumular concentraciones de Pb similares a las reportadas en este trabajo para *D. viscosa* ( $\sim 11000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PS}$ ), cuando fueron expuestas a  $5 \text{ mg Pb L}^{-1}$ . No obstante, este grupo observó una disminución (70% con respecto a plantas control) sobre el crecimiento de *D. carthusianorum* por efecto del Pb. En el caso de *D. viscosa*, la capacidad para acumular concentraciones altas de Pb en las raíces, se vio reflejada en altos valores del Fest (hasta  $5.7 \pm 0.5$ ), así como en bajos valores del FT ( $< 0.05$ ), lo que indica una restricción en el transporte interno de este elemento en la planta (Tabla 4).



**Figura 21.** Bioacumulación de Pb en brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días (medias ± DE, n = 3). Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

La capacidad para retener en las raíces más del 80% de la concentración total de Pb bioacumulado en la planta, con valores bajos del FT (<0.2) se ha reportado para varias especies, como *Betula occidentalis* (Klassen *et al.*, 2000), *Juglans regia* (Marmioli *et al.*, 2005), *Hibiscus cannabinus* (Ho *et al.*, 2008), *Allium sativum* (Liu *et al.*, 2009) y *Acacia farnesiana* (Maldonado *et al.*, 2011). Por otra parte, una forma común de resistencia a EPT en algunos árboles forestales – *Pinus sp.* y *Picea sp.* (Brunner *et al.*, 2008) – y arbustos – *J. regia* (Marmioli *et al.*, 2005), *B. occidentalis* (Klassen *et al.*, 2000) y *Chamaecytisus palmensis* (Jarvis y Leung, 2001) – ocurre a través de mecanismos de exclusión mediados por procesos como: (i) inmovilización (precipitación) por efecto de exudados de la raíz, previniendo su absorción, o (ii) acumulación preferencial en las raíces, debido a bajas tasas de translocación a tejidos aéreos (Marmioli *et al.*, 2005; Brunner *et al.*, 2008).

Comúnmente, las especies que limitan la translocación de EPT a los tejidos aéreos son más resistentes a la contaminación en comparación con especies que transportan estos elementos a los brotes (Klassen *et al.*, 2000; Marmioli *et al.*, 2005). La formación de complejos con componentes orgánicos, la adsorción sobre las superficies radiculares y la acumulación en los tejidos radiculares son formas comunes de inmovilización de EPT a través de varios procesos que ocurren en las raíces y que, en consecuencia, protegen sitios

metabólicos clave en la planta (Baranowska-Morek y Wierzbicka, 2004). Por lo tanto, las especies de plantas que exhiben estas características, como *D. viscosa*, pueden considerarse como una buena opción para la fitoestabilización del Pb, ya que pueden disminuir su movilidad, toxicidad y dispersión a través del crecimiento de las raíces.

**Tabla 4.** Indicadores del potencial fitorremediador de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 10, 25, 45 y 105 días\*

Tiempo (días)**	FT	Fest	Tasa acumulación de Pb por planta (µg planta día <sup>-1</sup> )	Pb acumulado en raíz (%)***
10	0.028 ± 0.004 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.68	39.9
25	0.025 ± 0.007 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.62	65.1
45	0.041 ± 0.004 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	2.23	86.0
105	0.044 ± 0.001 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.26	95.8

\* Los valores son las medias ± DE (n=3).

\*\* Medias con diferente letra por columna indican diferencias significativas (Tukey; P < 0.05).

\*\*\* Se refiere a la fracción de Pb bioacumulado en raíces con respecto al total bioacumulado

Como puede verse en la Tabla 4, la acumulación de Pb por *D. viscosa* ocurre en 2 etapas. La primera, se caracteriza por una rápida bioacumulación durante los primeros 45 días de exposición, encontrando una tasa constante de ~1.33 µg Pb planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Posteriormente, durante periodos de exposición más largos (45 – 105 días), la tasa de bioacumulación disminuyó a 0.26 µg Pb planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Esta tasa elevada se relaciona, principalmente, con la cantidad de Pb bioacumulado en raíces. Durante los primeros 45 días, *D. viscosa* acumuló en las raíces el 86% (10300 mg Pb kg<sup>-1</sup> PS) del Pb total acumulado por planta durante 105 días (11900 mg kg<sup>-1</sup> PS).

Considerando que el Pb se retuvo principalmente en las raíces (Figura 21) y que tal proceso depende de la unión del Pb a sitios de intercambio iónico presentes en la pared celular (Sharma y Dubey, 2005), la tasa de bioacumulación lenta que se observa en periodos de exposición prolongados podría atribuirse a la saturación de los sitios de unión (Mishra *et al.*, 2006). Este fenómeno se ha descrito anteriormente para *C. demersum*, donde el 70% (1200 mg Pb kg<sup>-1</sup> PS) del Pb total bioacumulado fue absorbido durante el primer día; a partir de entonces, la tasa de absorción disminuyó gradualmente (Mishra *et al.*, 2006). Piechalak *et al.* (2002), también encontraron que el mayor índice de absorción de Pb por especies de leguminosas ocurrió durante las primeras 10 h de exposición, siendo significativamente más lento en las horas subsecuentes.

Aunque la mayor parte del Pb bioacumulado por *D. viscosa* se encontró en las raíces (96%), el hecho de que una fracción fue translocada y acumulada en los brotes, llegando a niveles de hasta  $500 \pm 50$  mg Pb kg<sup>-1</sup> PS, indica que la planta fue capaz de combatir los efectos del estrés producido por su acumulación mediante la acción de mecanismos de tolerancia involucrados en la protección celular de *D. viscosa* (Baker, 1981). La activación de estos mecanismos tienen como finalidad contrarrestar los efectos producidos por la bioacumulación de EPT a través de: (i) su aislamiento de componentes celulares sensibles (secuestro en la vacuola); (ii) su detoxificación por la formación de conjugados con proteínas y moléculas ricas en tioles; (iii) la activación del sistema antioxidante capaz de controlar la sobreproducción de ERO (Sun *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009).

En la siguiente sección se analiza la función que desempeñan algunos de estos mecanismos en la tolerancia a Pb por *D. viscosa*.

### **6.3 Tolerancia a plomo por *D. viscosa*: respuesta antioxidante**

La acumulación intracelular de Pb por plantas como *D. viscosa* puede inducir una sobreproducción de ERO que, en especies tolerantes, es regulada a través de la activación del sistema de defensa antioxidante (Chaffai y Koyama, 2011). Este sistema, además de una serie de enzimas de óxido-reducción entre las que destacan las catalasas (CAT), peroxidasas (POX) y la superóxido dismutasa (SOD), incluye la síntesis de aminoácidos y péptidos con alto contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) como la cisteína, el glutatión y las fitoquelatinas, entre otros compuestos (Grill *et al.*, 1985; Morelli *et al.*, 2009a).

#### **6.3.1 Producción de glutatión**

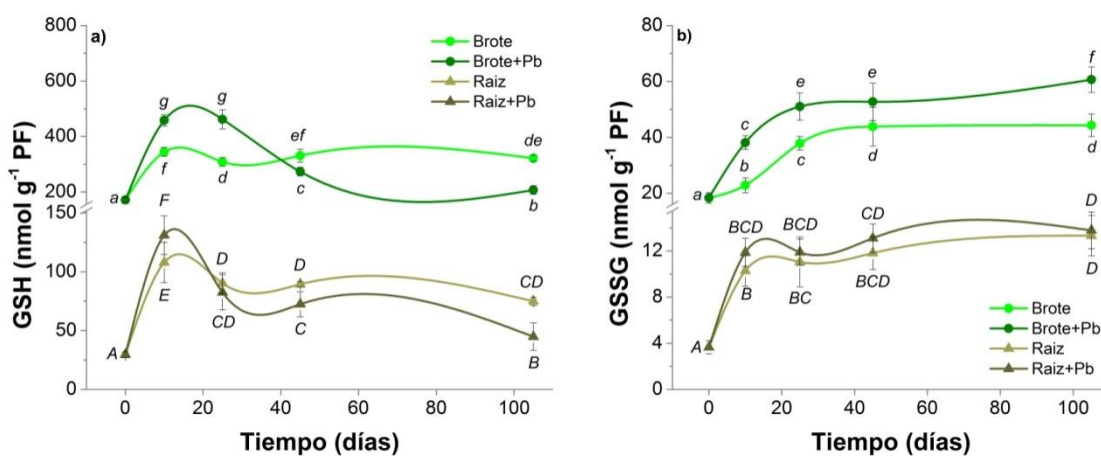
El glutatión (GSH) es un péptido de masa molecular baja y forma parte de un grupo de compuestos que se conocen, en general, como tioles no proteicos (NP-SH); los cuales actúan como poderosos antioxidantes debido a que se oxidan fácilmente al ceder el átomo de hidrógeno del grupo -SH para formar puentes disulfuro (Mulier *et al.*, 1998).

Dentro de los NP-SH, el GSH es el péptido más abundante en las células vegetales, ya que conforma alrededor del 90% del total de estos compuestos (Mulier *et al.*, 1998). Este tiene una afinidad alta por cationes divalentes como el Pb y es considerado el antioxidante más importante que poseen las células, debido a la amplia variedad de funciones que desempeña: i) formando conjugados con EPT a través de la actividad de GST, ii) protegiendo los grupos sulfhidrilo (-SH) de enzimas, iii) participando en la regeneración del



ascorbato, actuando iv) como precursor en la síntesis de las fitoquelatinas (FQ), o v) como sustrato de enzimas involucradas en el metabolismo del GSH, como las GSH-peroxidasas y las GST (Anjum *et al.*, 2012).

Al analizar el contenido de GSH en brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* se registró una concentración mayor en los brotes (3-6 veces) que en las raíces, y su concentración en los tejidos fue dependiente del tiempo de exposición al Pb (Figura 22). La concentración de GSH se incrementó (~34 y ~21 %) en brotes y raíces durante los primeros 10 días en respuesta a la presencia de Pb (Figura 22a). Este aumento coincide con la disminución en el índice de tolerancia (IT-BM<sub>r</sub>) durante el mismo periodo (Figura 20), especialmente de las raíces de *D. viscosa*, lo que sugiere una respuesta inicial de defensa de las plántulas contra el estrés ocasionado por la rápida entrada de Pb durante este periodo (Tabla 4). Una respuesta similar fue reportada por Piechalak *et al.* (2002) y Sun *et al.* (2005) en especies tolerantes como *Sedum alfredii* y *Pisum sativum*; en ambos casos se reportó un aumento en la producción de GSH, relacionado con la inducción de mecanismos de detoxificación ante la sobre-producción de ERO generada debido a la alta tasa de bioacumulación de Pb.

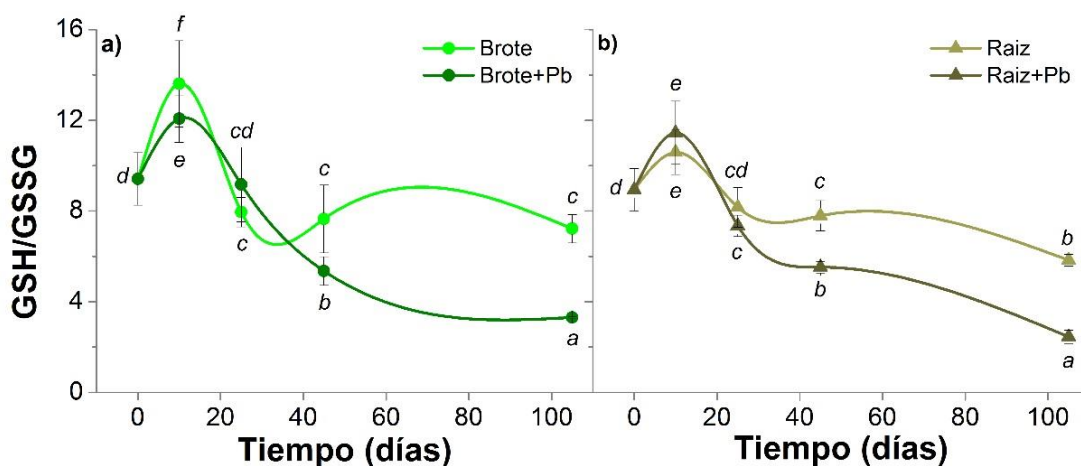


**Figura 22.** Cinética de producción de GSH (a) y GSSG (b) en brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* expuestas a una concentración de 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS (medias ± DE, n = 3). Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

Generalmente, el aumento en la producción de GSH en períodos cortos de exposición está asociado con tasas altas de acumulación de EPT. Se ha reportado que niveles de GSH elevados se correlacionan positivamente con la capacidad de las plantas para resistir el estrés oxidante inducido por EPT (Zhang y Ge, 2008). Sin embargo, tanto la concentración de GSH, como su par redox son modulados diferencialmente por el tipo, forma química y

concentración del elemento, así como por la especie de plantas y el tipo de tejido estudiado (Anjum *et al.*, 2012).

Períodos más largos de exposición a Pb tuvieron un efecto negativo sobre la producción de GSH tanto en brotes como en raíces de *D. viscosa*. En comparación con las plántulas que no recibieron tratamiento, se registró una disminución (9 – 41%) en su concentración en raíces a partir de los 25 días de exposición al Pb. Mientras tanto, en los brotes, la disminución en el contenido de GSH (17 – 36%) por efecto del Pb, se registró a partir de los 45 días de exposición. La disminución en el contenido de GSH coincidió con un aumento en la acumulación de la forma oxidada del glutatión (GSSG) (Figura 22b), conduciendo a una reducción en el tiempo en la relación GSH/GSSG de ambos órganos (Figura 23). A pesar de esto, después de 105 días de contacto con el plomo, las plántulas de *D. viscosa* mostraron la capacidad de mantener un ambiente intracelular reductor, registrando valores superiores a 2.5 en la relación GSH/GSSG, gracias a que independientemente del tiempo de contacto con el Pb ~86% del contenido total de GSH (GSH<sub>T</sub>) se encontró en su forma reducida (GSH).

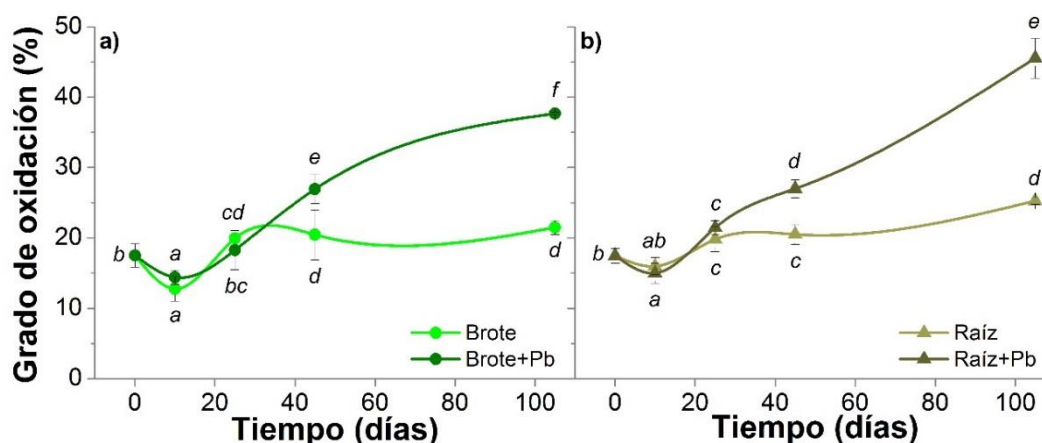


**Figura 23.** Relación GSH/GSSG en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* expuestas a 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días (medias ± DE, n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

Maldonado *et al.* (2011) también encontraron una disminución en la relación GSH/GSSG en brotes y raíces de plantas de *Acacia farnesiana* expuestas a 1000 mg Pb L<sup>-1</sup> durante 60 días, con respecto a la relación observada para plantas crecidas en ausencia de Pb. En ese trabajo se reportan valores incluso menores a los encontrados para *D. viscosa*, lo cual incide directamente en el grado de reducción intracelular.

Cuando hay una sobreproducción de ERO debido al estrés generado por la presencia de un contaminante, el GSSG tiende a acumularse y la relación GSH/GSSG disminuye (Pessarakli, 2001; Hossain *et al.*, 2011). El equilibrio entre el GSH y GSSG es un indicador de estrés oxidante en las células, siendo esencial una relación GSH/GSSG > 2 para la eliminación eficiente de ERO (Gill y Tuteja, 2010; Chaffai y Koyama, 2011; Anjum *et al.*, 2012). Además, una relación elevada de GSH/GSSG es clave para la activación o inactivación de sistemas enzimáticos redox-dependientes y para la regeneración del ácido ascórbico, otro antioxidante celular poderoso (Singh *et al.*, 2006).

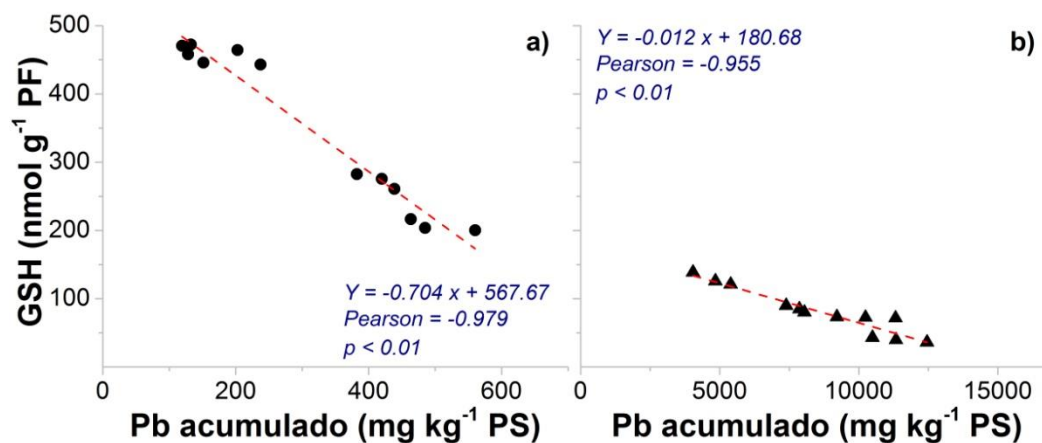
El potencial de reducción del GSH no sólo depende de la relación GSH/GSSG, sino también de la concentración de GSH<sub>T</sub> (Meyer y Hell, 2005) que, a su vez depende de su biosíntesis y catabolismo (Gill y Tuteja, 2010; Yadav, 2010). Por lo anterior, se estimó el estado de oxidación en función del tiempo de exposición a Pb en plántulas de *D. viscosa*, a través del grado de oxidación (GO) (Figura 24). El GO de las plantas expuestas a Pb no mostró cambios significativos con respecto a las plantas control durante 25 días. A partir de los 45 días, el GO aumentó significativamente (7-16% y 6-20%) en brotes y raíces de plantas tratadas con Pb con respecto al GO registrado en las plantas control.



**Figura 24.** Grado de oxidación en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días (medias ± DE, n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

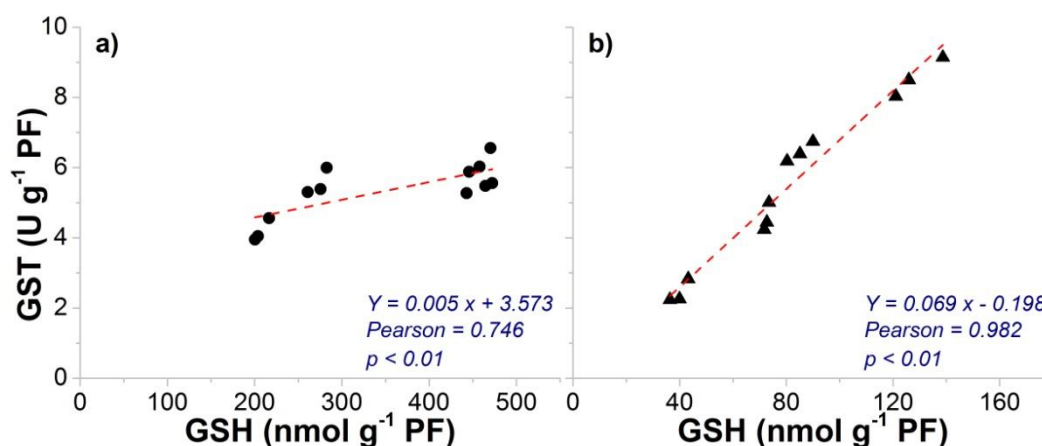
La reducción de GSH y el aumento en el GO a partir de los 45 días en plántulas expuestas a Pb, sugieren el uso masivo de GSH para la detoxificación del Pb acumulado, particularmente en las células de la raíz, en donde la alta acumulación puede generar estrés oxidante (Mishra *et al.*, 2006). Esto se corroboró con la fuerte correlación negativa que se

encontró entre la concentración de Pb bioacumulado y la concentración de GSH tanto en brotes como en raíces (Figura 25).



**Figura 25.** Análisis de correlación entre el Pb bioacumulado y el contenido de GSH en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

Alternativamente, la disminución en la reserva de GSH podría atribuirse a su uso como precursor en la síntesis de FQ (Yadav, 2010), o en la formación de conjugados de Pb por acción de la GST (Figura 7, sección 1.5.2.1) (Reddy *et al.*, 2005). De hecho, se encontró una correlación fuerte, particularmente en raíces de plántulas *D. viscosa* expuestas a Pb, entre el contenido de GSH y la actividad GST (Figura 26). Esta serie de resultados indica una estrecha relación entre la producción de GSH y la detoxificación de Pb por acción de la actividad GST en *D. viscosa*.

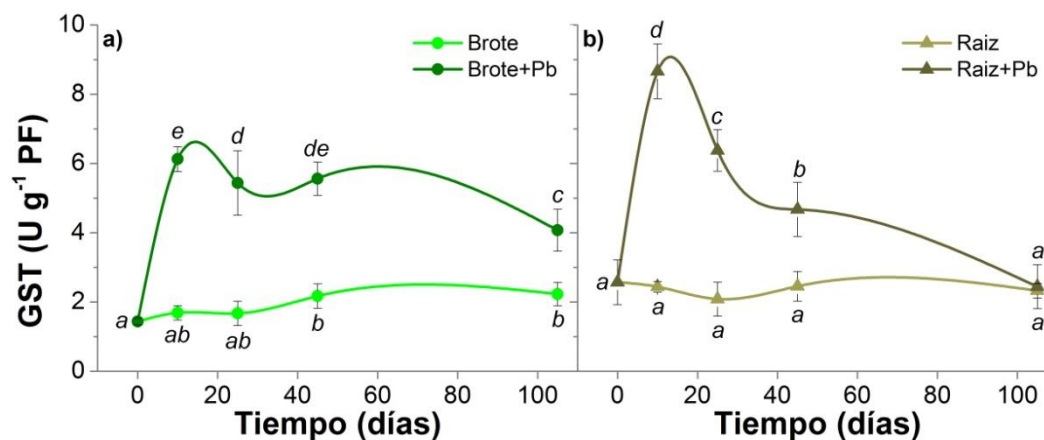


**Figura 26.** Análisis de correlación entre el contenido de GSH y la actividad GST en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

### 6.3.2 Glutación S-transferasa

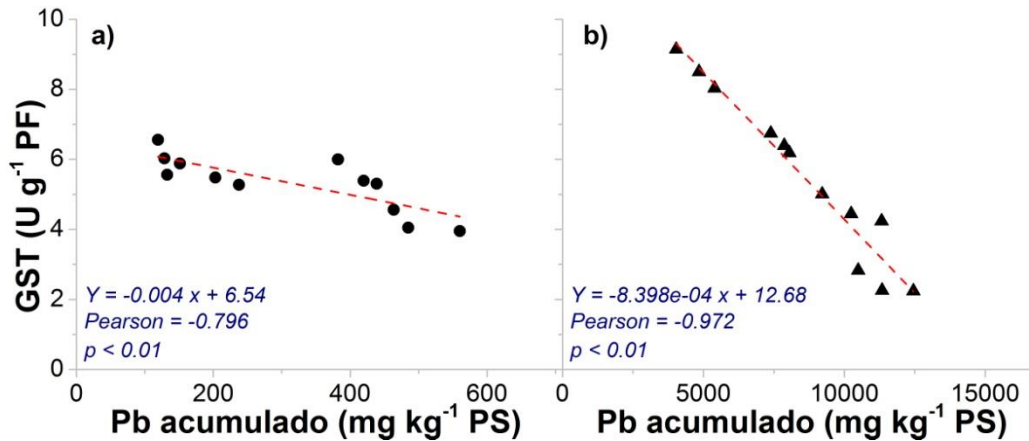
Estrechamente relacionadas con el GSH, las glutación S-transferasas (GST) son enzimas implicadas en procesos que ayudan a disminuir el estrés por Pb a través de: (i) la catálisis de la conjugación de los iones de  $Pb^{2+}$  con GSH; (ii) su papel como proteínas de unión de los iones de  $Pb^{2+}$ ; (iii) su función como peroxidasa dependiente de GSH que actúa contra el estrés oxidante (Reddy *et al.*, 2005; Zhang y Ge, 2008).

Se encontró que la actividad GST se estimuló significativamente por la presencia de Pb tanto en brotes como en raíces de *D. viscosa*, registrando niveles hasta 3.5 veces mayores con respecto a los controles. En estos últimos se encontró una actividad basal GST que se mantuvo, sin cambios significativos, entre 1.4 y 2.2  $U\ g^{-1}\ PF$  en brotes y entre 2.1 y 2.6  $U\ g^{-1}\ PF$  en raíces (Figura 27). El efecto del Pb en la actividad de esta enzima fue dependiente del tiempo y se correlacionó negativamente ( $r=-0.972$ ) con el aumento en el contenido de Pb brotes y raíces, respectivamente (Figura 28).



**Figura 27.** Actividad GST en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y 2000  $mg\ Pb\ kg^{-1}\ AS$  durante 105 días (medias  $\pm$  DE,  $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

En los brotes, la actividad GST fue  $\sim 41\%$  mayor en las raíces, órgano donde también se presentó la mayor tasa de acumulación de Pb durante los primeros 10 días de exposición (Tabla 4). Lo anterior sugiere una capacidad de detoxificación de Pb mayor en las raíces que en los brotes durante ese período. Posteriormente, la actividad GST en las raíces de plántulas tratadas con Pb empezó a disminuir hasta valores cercanos al nivel basal a los 105 días. En los brotes, la actividad se redujo sólo 33% en comparación con el nivel registrado día los 10 días de exposición y se mantuvo alrededor de dos veces por encima de los brotes de plántulas control.



**Figura 28.** Análisis de correlación entre el Pb bioacumulado y la actividad GST en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

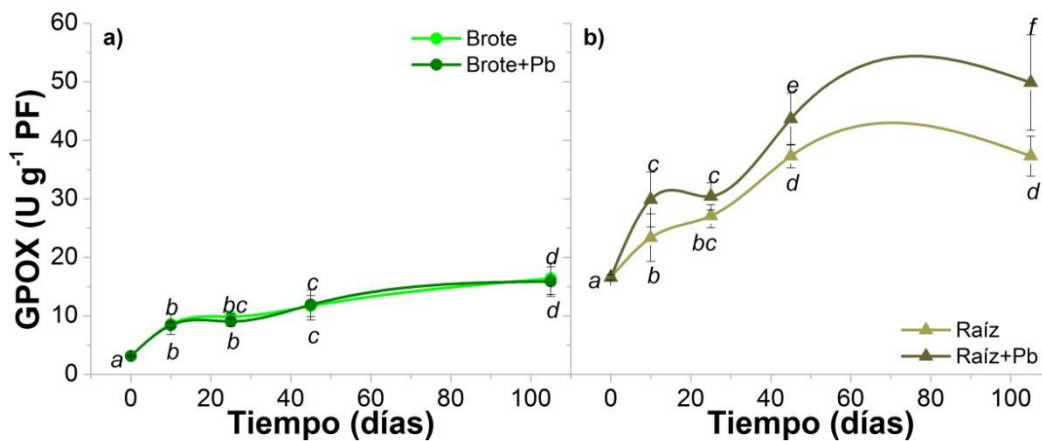
El aumento en la actividad GST durante el periodo inicial de exposición, en particular en las raíces de plántulas bajo estrés por Pb, sugiere que su actividad puede ser necesaria sólo cuando el Pb se acumula en tasas elevadas, o cuando la planta necesita adaptarse a tales condiciones. Por otra parte, el nivel basal de GST registrado en las plántulas control puede atribuirse al hecho de que desempeñan un papel importante en los procesos celulares normales, como el reconocimiento y transporte de un amplio espectro de compuestos reactivos electrófilos (Marrs, 1996). Esta actividad basal ha sido reportada en plántulas de *Zea mays* por Zhang y Ge (2008), quienes observaron la importancia de la actividad de diferentes isoenzimas de la GST que participan en varios procesos celulares normales.

Aunque la mayoría de los estudios de GST en plantas se relacionan con la detoxificación de xenobióticos, su participación en la tolerancia y detoxificación de EPT también ha sido demostrada. No obstante, el papel exacto que desempeñan en este aspecto aún no es del todo claro (Zhang y Ge, 2008). Varios estudios reportan un aumento en la actividad GST en diferentes especies por efecto del estrés por EPT. Por ejemplo, en plantas de *M. uniflorum* y *C. arietinum* cultivadas durante 12 días con 200 a 800 mg Pb L<sup>-1</sup> (Reddy *et al.*, 2005), *O. sativa* expuesta a 10 mg Cd L<sup>-1</sup> durante 10 días (Zhang y Ge, 2008), y en raíces de *Hordeum vulgare* tratadas durante 24 h con Cd (28 - 225 mg L<sup>-1</sup>) o con Ni, Co y Pb (176.13, 176.79 y 620 mg L<sup>-1</sup>) (Halušková *et al.*, 2009). En general, cuanto mayor es la actividad GST, mayor es la tolerancia de una especie al estrés provocado por EPT.

### 6.3.3 Guayacol peroxidasa

Junto con la producción de glutatión (GSH), la síntesis y actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y las peroxidasas (POX), se considera una de las defensas más importantes de las plantas contra la sobreproducción de ERO, ya que tienen la capacidad para reducir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se produce endógenamente. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma durante la reducción del dióxigeno en agua, gracias a la dismutación del radical superóxido y también por acción de algunas oxidasas (Hansberg, 2008). Es una ERO que tiene gran capacidad de difusión, que le permite atravesar fácilmente la membrana celular, reaccionando con metales de transición como  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  para formar  $\cdot\text{OH}$ , una de las ERO con mayor reactividad que se conoce (Hansberg, 2008).

El estudio de los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes como las POX y CAT permite conocer la capacidad de una planta para tolerar condiciones de estrés oxidante y mediar sus efectos (Kertulis-Tartar *et al.*, 2009). En particular, las guayacol peroxidasas (G-POX) son enzimas que desempeñan un papel importante en la defensa contra el estrés biótico al reducir el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizando donadores de electrones aromáticos como el guayacol o pirogalol (Ortiz-Moreno, 2010). En el presente estudio, desde los 10 días de cultivo, se registró un aumento (16 – 43%) en la actividad G-POX de raíces de plantas de *D. viscosa* por efecto de la exposición a Pb (Figura 29).

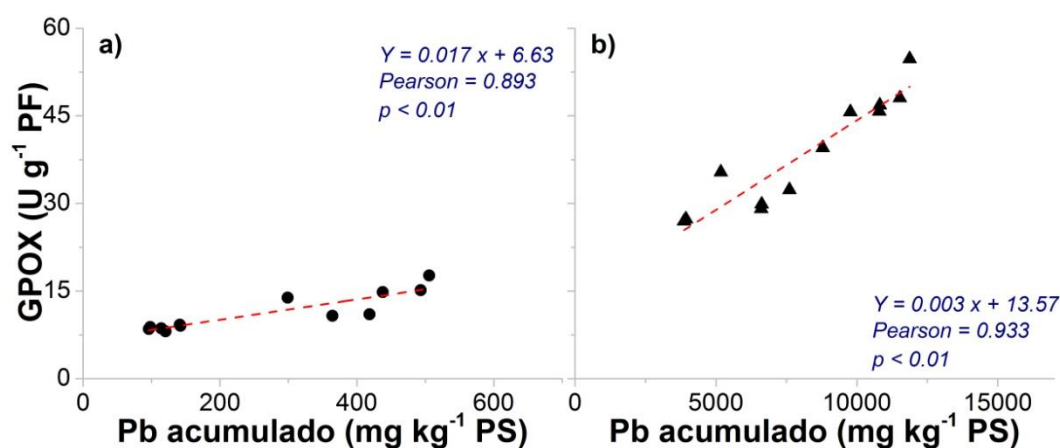


**Figura 29.** Actividad G-POX en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días (medias  $\pm$  DE, n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

Así mismo, se observa (Figura 29) que, independientemente de la exposición a Pb, el tiempo de cultivo estimuló la actividad G-POX tanto en brotes como en raíces, encontrando un efecto más marcado en éstas últimas, en donde se registró un aumento de hasta 3.2

veces a los 105 días, con respecto al tiempo inicial. La mayor actividad G-POX encontrada en las raíces con respecto a los brotes, podría relacionarse con su función como órgano de absorción. En este caso, se encontró una correlación positiva significativa entre la actividad G-POX en raíces y el Pb bioacumulado (Figura 30).

Aunque se ha demostrado la importancia de la actividad G-POX como parte del sistema de defensa antioxidante durante el metabolismo normal de las plantas, la función que desempeña esta enzima en la tolerancia a EPT aún no es del todo clara. Comúnmente, se reporta una respuesta variable en la actividad de esta enzima en plantas expuestas a EPT, los cuales pueden inducir o inhibir su actividad dependiendo de la forma química en que se encuentren (Tamás *et al.*, 2008).



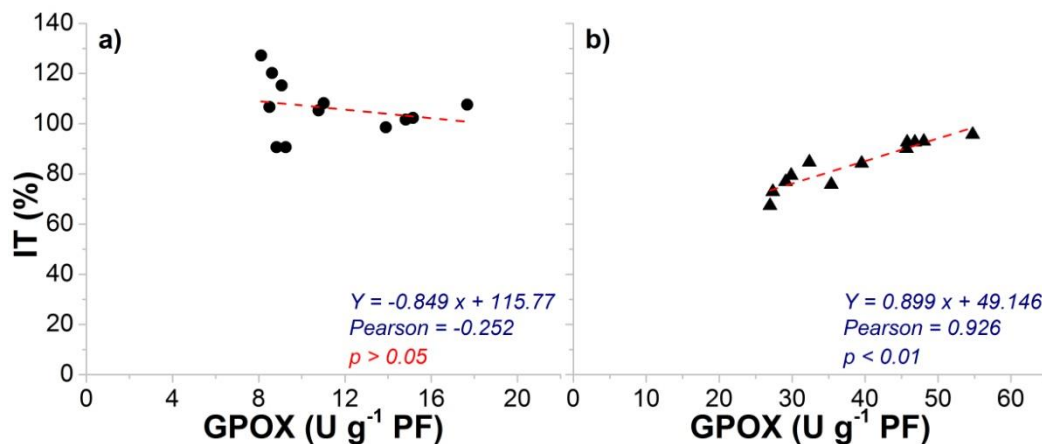
**Figura 30.** Análisis de correlación entre la actividad G-POX y la bioacumulación de Pb en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 0, 10, 25, 45 y 105 días.

Por ejemplo, Dey *et al.* (2007) observaron una disminución en la actividad G-POX en raíces de plantas de *Triticum aestivum* expuestas a concentraciones crecientes de Cd ( $\leq 37$  mg L<sup>-1</sup>); en ese mismo estudio encontraron un aumento en dicha actividad cuando las plantas se expusieron a Pb ( $\leq 400$  mg L<sup>-1</sup>). Gallego *et al.* (2002) reportaron un incremento de 20% en la actividad G-POX de plantas de *Helianthus annuus* expuestas a 16 mg Cd L<sup>-1</sup> y de 100% cuando se expusieron a Cr y Al. Candan y Tarhan (2003) demostraron que la acumulación de concentraciones altas de Ca y otros elementos esenciales en las raíces pueden provocar un aumento en la actividad G-POX en plántulas como *Mentha pulegium*.

La actividad elevada de G-POX registrada en las raíces de *D. viscosa* sugiere que su función es importante como parte de la respuesta antioxidante y, por lo tanto, en el nivel de tolerancia (IT) que mostró (Figura 20). De hecho se encontró una fuerte correlación entre el IT y la actividad G-POX durante 105 días de exposición a Pb (Figura 31).



Contrario a lo esperado, la mayor actividad de G-POX se presentó en las raíces de *D. viscosa*. Comúnmente, su actividad es mayor en los brotes, ya que es en éstos donde ocurre la fotosíntesis, un proceso que genera concentraciones altas de ERO, principalmente  $H_2O_2$ . Este resultado podría estar relacionado con la activación de mecanismos alternos de eliminación de  $H_2O_2$ , como la estimulación de la actividad catalasa (CAT), una enzima que puede actuar de forma coordinada con la G-POX al participar también en la transformación de esta ERO (Peraza, 2008).



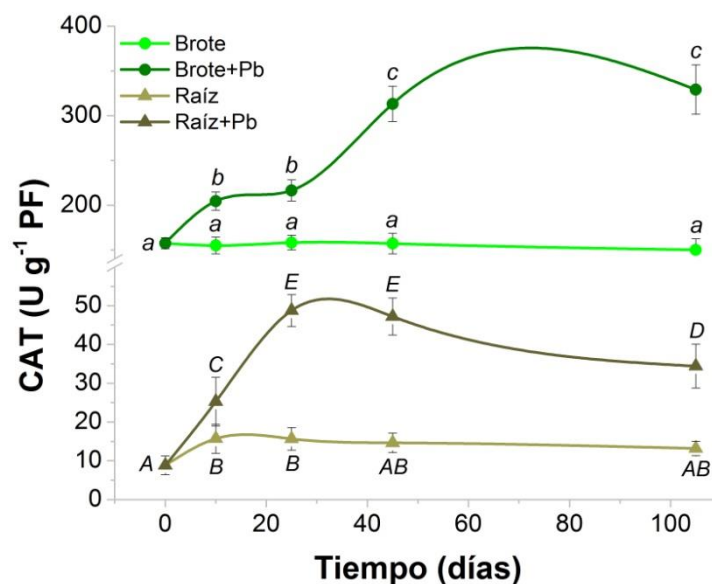
**Figura 31.** Análisis de correlación entre la actividad G-POX y el índice de tolerancia (IT) en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

### 6.3.4 Catalasa

Además de la función de las POX en la defensa antioxidante de las plantas, existen otras enzimas capaces de degradar al  $H_2O_2$  a través de un mecanismo alternativo. Estas enzimas antioxidantes, conocidas como catalasas (CAT), están presentes en la mayoría de los organismos aerobios y son consideradas como uno de los catalizadores más potentes que poseen las plantas. A diferencia de las POX, que requieren de un sustrato reducido, las CAT catalizan la dismutación directa del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  (Kertulis-Tartar *et al.*, 2009).

En el presente estudio no se observó un efecto significativo del tiempo de cultivo sobre la actividad CAT en las plántulas control, pues ésta se mantuvo en un nivel basal durante 105 días (~150 y ~14 U g<sup>-1</sup> PF en brotes y raíces, respectivamente) (Figura 32). La actividad CAT aumentó significativamente con el tiempo de exposición a Pb tanto en brotes como en raíces, encontrando en ambos casos valores máximos de actividad a los 45 días de exposición (307 y 49 U g<sup>-1</sup> PF, respectivamente). De forma similar, Hosseini *et al.* (2007)

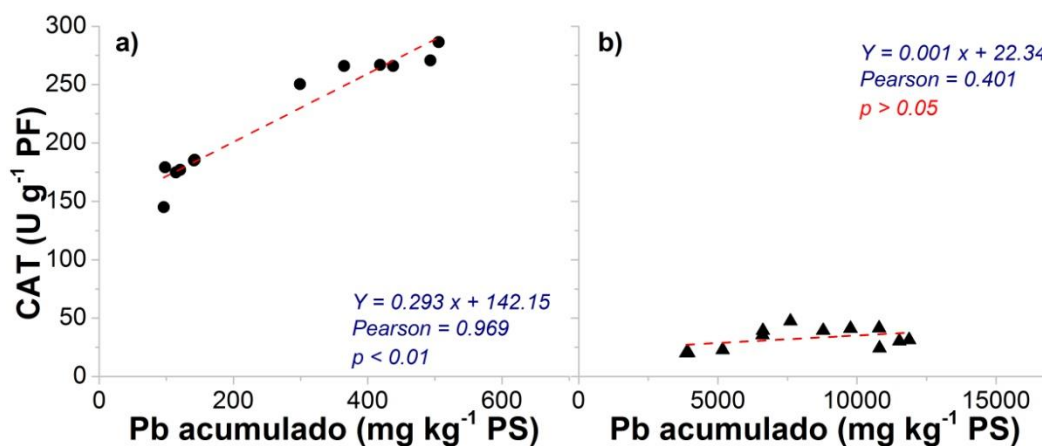
reportaron que plantas de *B. napus* expuestas a diferentes concentraciones de Pb, en un rango de 33 a 132 mg L<sup>-1</sup> de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, mostraron un aumento con respecto al control en la actividad CAT de brotes (58-63 %) y raíces (100-125 %) respectivamente.



**Figura 32.** Actividad CAT en brotes y raíces de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días (medias ± DE, n = 3). Letras diferentes en mayúsculas indican diferencias significativas en raíces y en minúsculas en brotes (Tukey, P < 0.05).

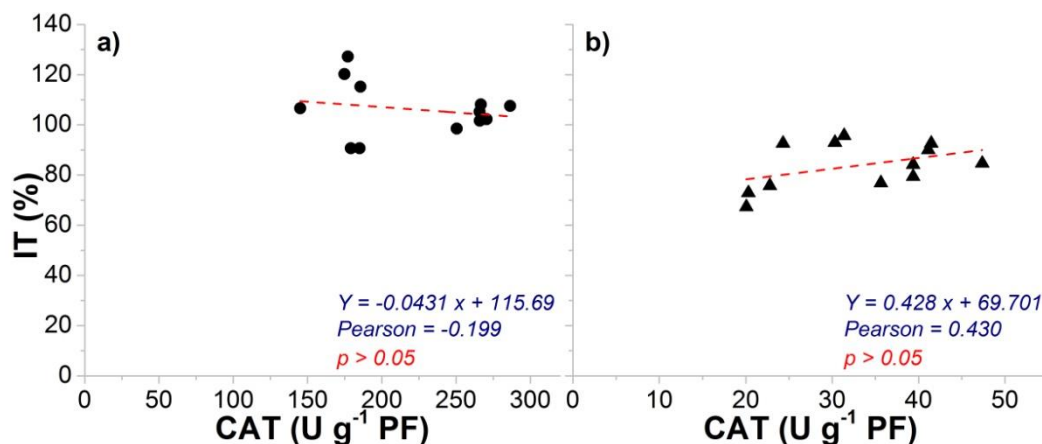
La mayor actividad CAT se presentó en los brotes y se encontró una correlación fuerte con la concentración de Pb bioacumulado (Figura 33). Es precisamente en los brotes en donde el Pb puede alterar procesos metabólicos importantes como la fotosíntesis y en donde se produce la mayor cantidad de ERO. Estos resultados sugieren su participación en el control de la sobreproducción de ERO.

De acuerdo con nuestros resultados, se registró una acción coordinada entre las actividades G-POX y CAT en *D. viscosa*, pues la baja actividad GPOX en los brotes fue compensada con una mayor actividad CAT. Pang *et al.* (2003), reportaron un resultado similar, al observar una mayor actividad G-POX en brotes y una mayor actividad CAT en raíces de *Vetiver zizanoides* expuestas a Pb. Youssef y Azooz (2013) relacionaron la capacidad de plantas de *Hibiscus esculentus* para tolerar concentraciones altas de Pb (1600-13000 mg L<sup>-1</sup> de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), con un aumento (20 - 50%) en la actividad CAT en brotes de plántulas expuestas a este elemento.



**Figura 33.** Análisis de correlación entre la actividad CAT y la bioacumulación de Pb en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

Los resultados sugieren que de las dos actividades enzimáticas estudiadas en *D. viscosa*, la G-POX desempeña una función más importante en la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la defensa contra el estrés oxidante generado por la exposición a Pb, debido a que la actividad CAT no se correlacionó significativamente con el IT (Figura 34).



**Figura 34.** Análisis de correlación entre la actividad CAT y el índice de tolerancia en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

### 6.3.5 Contenido proteico

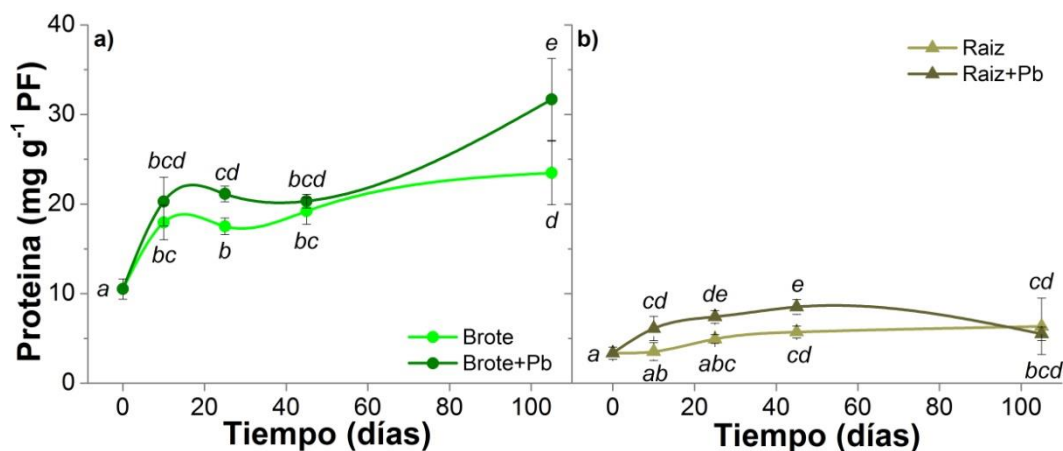
La presencia de mecanismos de detoxificación tanto constitutivos como inducibles en plantas tolerantes a EPT, implica una ventaja evolutiva importante que les permite soportar los efectos tóxicos producidos por su bioacumulación. Estos mecanismos se relacionan con la inmovilización, restricción de la acumulación y transporte, y con la quelación y secuestro de EPT. Los mecanismos intracelulares también se relacionan con la activación de la defensa antioxidante y con la producción de proteínas de estrés que contrarrestan los efectos generados por la sobreproducción de ERO (Yadav, 2010; Hossain *et al.*, 2011).

Desde la germinación hasta la reproducción, las proteínas desempeñan una función fundamental en muchas de las etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas. Las proteínas son macromoléculas importantes involucradas en muchos procesos entre los que se incluyen: la catálisis de reacciones bioquímicas (enzimas), el transporte a través de membranas, la estructura celular, la generación de energía y el transporte de electrones. A diferencia de otros organismos, las plantas contienen niveles relativamente bajos de proteínas, debido a que la mayor parte de su estructura está compuesta por carbohidratos estructurales como la celulosa (Larios, 2002).

Existen algunos EPT como el Cu y Zn, que son constituyentes de algunas enzimas y proteínas importantes para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Sin embargo, la presencia de EPT no esenciales o de elementos esenciales en concentraciones elevadas puede dar como resultado su unión a los grupos sulfhidrilo de proteínas y enzimas, lo que puede inhibir su actividad, modificar su estructura o reemplazar a otros elementos esenciales (Hall, 2002).

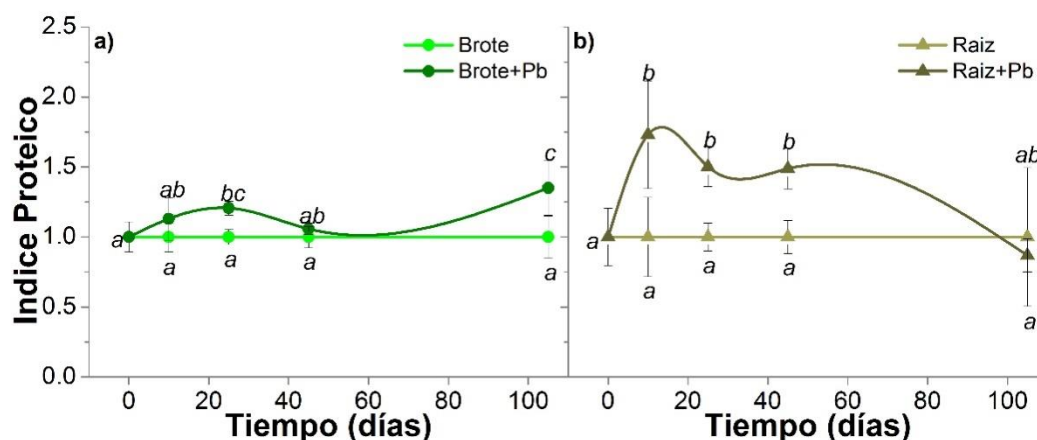
Con base en lo anterior, se cuantificó el efecto de la exposición a Pb sobre el contenido proteico en plántulas de *D. viscosa*. Se registró un estímulo significativo en el contenido de proteína tanto en brotes como en raíces de *D. viscosa* por efecto tanto de la presencia de Pb como del tiempo de cultivo. Como resultado de la exposición al Pb, los brotes de *D. viscosa* mostraron un incremento de 20% en la concentración de proteína a los 25 días de exposición, y de hasta 35% en tiempos de exposición más prolongados. En las raíces de las plántulas tratadas con Pb, la concentración de proteína aumentó significativamente (45 - 73%) con respecto a las plantas control desde los 10 hasta los 45 días. Tanto en brotes como en raíces, el contenido proteico de plantas expuestas a Pb se mantuvo por encima de las plantas crecidas sin Pb hasta los 105 días. En las plantas control, el contenido de

proteína se mantuvo sin cambios significativos ( $\sim 20$  y  $5 \text{ mg g}^{-1}$  PF en brotes y raíces, respectivamente) durante 105 días (Figura 35).



**Figura 35.** Contenido de proteína en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y  $2000 \text{ mg Pb kg}^{-1}$  AS durante 105 días (medias  $\pm$  DE,  $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Como una medida relativa del aumento en el contenido proteico en las plantas crecidas en presencia de Pb con respecto a las plantas control, se estimó el índice proteico (IP) (Figura 36). El IP se encontró en un rango de 1.6 a 2.4 en raíces y de 3.1 a 6.3 en los brotes tratados con Pb, lo cual indica que en los brotes el aumento en la concentración de proteínas fue mucho mayor que en las raíces.

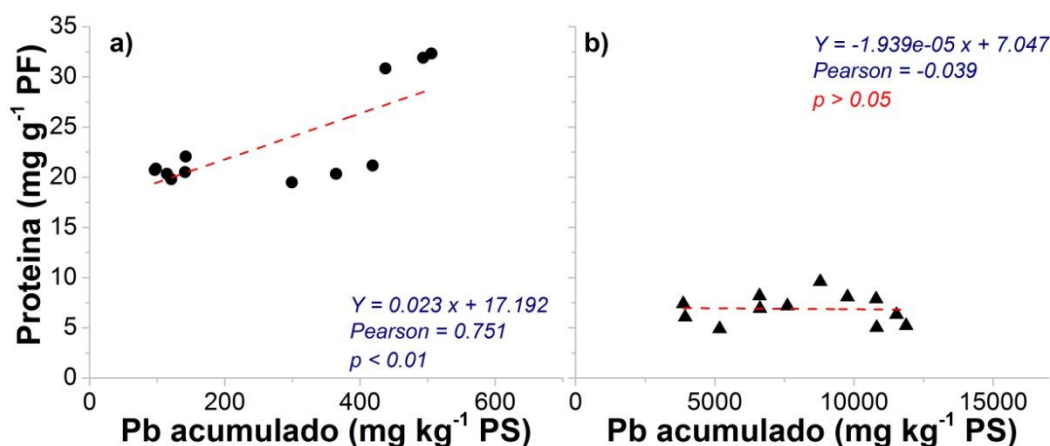


**Figura 36.** Índice proteico en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 0 y  $2000 \text{ mg Pb kg}^{-1}$  AS durante 105 días (medias  $\pm$  DE,  $n=3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Similar a nuestro estudio, Mishra et al. (2006) registraron una inducción significativa en el contenido de proteína (hasta 42%) en plantas de *C. demersum* expuestas durante 2 días a concentraciones de 2 mg Pb L<sup>-1</sup>, disminuyendo en tiempos de exposición más prolongados.

Przymusiński et al. (1991) reportaron la síntesis y acumulación de proteínas (PM=16 kDa) por efecto del Pb en plántulas de *Lupinus luteus* y demostraron un estímulo notable en la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis en todos los órganos de las plántulas tratadas con Pb. Lo anterior fue atribuido a funciones adicionales de ciertas proteínas en el sistema de defensa contra algunos tipos de estrés tanto biótico como abiótico.

El incremento en el contenido de proteína en plántulas de *D. viscosa* expuestas a Pb, podría atribuirse a la inducción de proteínas de estrés, entre las cuales pueden encontrarse enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH y de FQs, enzimas antioxidantes y proteínas de choque térmico (HSP) (Mishra et al., 2006). En los brotes, el contenido de proteína correlacionó ( $r=0.75$ ) con el aumento de la concentración de Pb bioacumulado (Figura 37). Esto podría estar relacionado con la inducción de la síntesis de enzimas y proteínas responsables de la translocación de Pb tanto hacia la parte aérea como ATP-asas, transportadores de metales NRAMP<sup>7</sup> y FQ (Manara, 2012).



**Figura 37.** Análisis de correlación entre el contenido de proteína y la bioacumulación de Pb en brotes (a) y raíces (b) de plántulas de *D. viscosa* tratadas con 2000 mg Pb kg<sup>-1</sup> AS durante 105 días.

Un ejemplo claro de la función que desempeñan las proteínas transportadoras de EPT puede encontrarse en *A. thaliana*, pues se ha reportado un incremento en la síntesis de

<sup>7</sup> Proteínas de macrófago asociada con la resistencia natural

proteínas NRAMP, ATP-ases y FQ que participan en la transporte, translocación raíz-brote, homeostasis y detoxificación de EPT como el Fe, Zn, Cd, Pb y otros iones divalentes (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2004; Wójcik y Tukiendorf, 2004; Morel *et al.*, 2009a).

Por lo tanto, el aumento constante y significativo ( $\geq 1.6$  veces) en el contenido de proteína en *D. viscosa* por efecto de Pb, nuevamente sugiere la activación de mecanismos de defensa que permiten a la planta resistir/tolerar su presencia. En este sentido, Baker (1987) y Mishra *et al.* (2006) sugieren la medición del contenido de proteína en las plantas como un indicador del desarrollo de plantas expuestas a EPT.

## **7 CONCLUSIONES**



*D. viscosa* es una especie con potencial para fitoestabilizar Pb, ya que presentó una capacidad de bioacumulación alta (hasta ~12000 mg Pb kg<sup>-1</sup> PS en 105 días) y una notable resistencia a concentraciones importantes del metal, con una CI<sub>50</sub> de 2228 mg kg<sup>-1</sup> AS. Del Pb total bioacumulado en 105 días, más del 90% fue retenido en raíces y el 41% se bioacumuló durante los primeros 10 días de exposición a una tasa máxima de ~0.68 µg planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

A partir de los 25 días de exposición a Pb, *D. viscosa* mostró la capacidad de recuperarse a una disminución inicial en el IT (~20%) provocada por la rápida bioacumulación de Pb. Esta respuesta se relacionó con un incremento en la producción de GSH (21-34%) y con un aumento en la actividad GST (hasta 3.5 veces) tanto en brotes como en raíces.

El estímulo en la producción de GSH por efecto del Pb mantuvo un ambiente intracelular reducido, pues la relación GSH/GSSG fue superior a 2 durante 105 días. Lo anterior, junto con el incremento en la actividad G-POX (hasta 1.3 veces) y CAT (hasta 3.3 veces) en plantas expuestas a Pb, indica que el sistema antioxidante de *D. viscosa* contribuye de forma importante a la tolerancia al Pb. Las diferencias observadas entre órganos en la actividad G-POX y CAT sugieren la activación coordinada de varias vías de eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en brotes y en raíces de *D. viscosa*.

*D. viscosa* resiste la presencia de Pb mediante la activación de mecanismos tanto de exclusión y retención en la raíz como de tolerancia. En cuanto a la tolerancia, la correlación negativa entre la producción de GSH y la actividad GST con la bioacumulación de Pb, indican su participación conjunta en la detoxificación. Las correlaciones positivas de las actividades G-POX y CAT con la bioacumulación de Pb, indican su participación en la defensa contra el estrés oxidante mediante la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **8 PERSPECTIVAS**

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se vislumbran las siguientes perspectivas para estudios posteriores:

- Evaluar el papel que desempeñan los mecanismos de exclusión en la resistencia a EPT por *D. viscosa*, a través de la cuantificación de la producción de ácidos orgánicos, y su efecto sobre la precipitación y/o disolución de estos elementos.
- Cuantificar la producción de compuestos derivados del glutatión (GSH), como metalotioneínas (MT) y fitoquelatinas (FQ), que desempeñan un papel importante en la tolerancia y acumulación de EPT a través de la acumulación y/o secuestro.
- Evaluar la actividad de otras enzimas antioxidantes involucradas en la transformación de ERO como la superóxido dismutasa (SOD).
- Estudiar la participación de proteínas involucradas en la tolerancia y acumulación de EPT en plantas, como las proteínas de choque térmico (HSP) y las proteínas transportadoras de la familia ZIP, ABC y NRAMP.
- Determinar la localización y distribución de complejos de Pb dentro de distintas fracciones celulares, mediante estudios histoquímicos y microscópicos.

## **9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abedin, M. J. y Meharg, A. A. 2002. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice *Oryza sativa* L. *Plant and Soil*, 243 (1): 57-66.
- Adriano, D. C. 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, Springer-Verlag. 31: 45.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Anjum, N. A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N., Iqbal, M. y Prasad, M. 2012. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review. *Environmental and Experimental Botany*, 75: 307-324.
- Apel, K. y Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Aravind, P. y Prasad, M. N. V. 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (2): 107-116.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10 (1): 2-18.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85 (2): 235-241.
- ATSDR. 2003. Agency for Toxic Substances and Disease Registry [en línea] [fecha de consulta: 22 junio 2010]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/>
- Audet, P. y Charest, C. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147 (1): 231-237.
- Azevedo, M. M., Carvalho, A., Pascoal, C., Rodrigues, F. y Cassio, F. 2007. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. *Science of the Total Environment*, 377 (2-3): 233-243.
- Baker, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3 (1-4): 643-654.
- Baker, A. J. M. 1987. Metal Tolerance. *New Phytologist*, 106: 93-111.
- Balestrasse, K. B., Gardey, L., Gallego, S. M. y Tomaro, M. L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Functional Plant Biology*, 28 (6): 497-504.
- Balmori, Y. S. 2008. Potencial antioxidante de los  $\alpha$ -tocoferoles. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 291-301. Manual Moderno: D.F.
- Baranowska-Morek, A. y Wierzbicka, M. 2004. Localization of lead in root tip of *Dianthus carthusianorum*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 46: 45-56.

- Bayramoğlu, G., Bektaş, S. y Arica, M. Y. 2003. Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 101 (3): 285-300.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D. y Chalot, M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254 (2): 173-181.
- Ben Ammar, W., Mediouni, C., Tray, B., Ghorbel, M. y Jemal, F. 2008. Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Biologia Plantarum*, 52 (2): 314-320.
- Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B. D. y Raskin, I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology*, 31 (3): 860-865.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, 91 (2): 179-194.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M. A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, 40 (2): 188-199.
- Boveris, A.; Repetto, M. G; Boveris, A. D. y Valdéz, L. B. 2008. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 319-328. Manual Moderno: D.F.
- Brunner, I., Luster, J., Günthardt-Goerg, M. S. y Frey, B. 2008. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environmental Pollution*, 152 (3): 559-568.
- Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 79-110.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N. et al. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222 (1): 122-128.
- Callahan, D., Baker, A., Kolev, S. y Wedd, A. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11 (1): 2-12.
- Camacho, F., Gonzáles, V. y Olivera, A. 1992. Germinación y Manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.) *Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación de la Región del Centro, Campo Experimental Coyoacán, México, D.F.*: 1-6.
- Candan, N. y Tarhan, L. 2003. The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> stress conditions. *Plant Science*, 165 (4): 769-776.

- Cañizares-Villanueva, R. O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 131-143.
- Cárdenas-Rodríguez, N.; Medina-Campos, O. N. y Pedraza-Chaverri, J. 2008. Glutación peroxidasas: una familia de enzimas. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 201-217. Manual Moderno: D.F.
- Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Spanevello, R. M., de Oliveira Jucoski, G., Battisti, V., Redin, M., Linares, C. E. B., Dressler, V. L., de Moraes Flores, E. M., Nicoloso, F. T., Morsch, V. M. y Schetinger, M. R. C. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65 (6): 999-1006.
- Carpene, E., Andreani, G., Isani, G. 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21 Suppl. 1: 35-39.
- Carrier, P., Baryla, A. y Havaux, M. 2003. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape *Brassica napus* after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta*, 216 (6): 939-950.
- Carrillo, N. y Valle, E. 2005. El lado oscuro del oxígeno [en línea]. Archivo de publicaciones SAFV: ¿Quién es quien en Fisiología Vegetal? [fecha de consulta: 17 Septiembre 2011]. Disponible en: <http://www.safv.com.ar/archivosafv.htm>.
- Carruyo, I., Fernández, Y., Marcano, L., Montiel, X. y Torrealba, Z. 2008. Correlation of toxicity with lead content in root tip cells (*Allium cepa* L.). *Biological Trace Element Research*, 125 (3): 276-285.
- Chaffai, R. y Koyama, H. 2011. Heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana*. En: Jean-Claude, K. y Michel, D. (Eds.). *Advances in Botanical Research*, 60: 1-49. Academic Press: USA
- Cheng, S. 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. A state-of-the-art report with special reference to literature published in Chinese journals. *Environmental Science and Pollution Research International*, 10 (4): 256-264.
- Cho, U.-H. y Seo, N.-H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168 (1): 113-120.
- Choudhuri, M. A. 1988. Free radicals and leaf senescence: a review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 15: 18-29.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M. y Davies, E. 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2 (4): 144-151.
- Cronquist, A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*, 2ª ed. NY: New York Botanical Garden. 555 pp.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2ª ed. London: Academic Press. 889 pp.

- Crist, R. H., Martin, J. R. y Crist, D. R. 2002. Heavy metal uptake by lignin: Comparison of biotic ligand models with an ion-exchange process. *Environmental Science & Technology*, 36 (7): 1485-1490.
- Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R. y Briat, J. F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *The Biochemical Journal*, 347: 749-755.
- De Vizcaya, R. A. M. G. y Del Razo, L. M. 2008. Daño oxidativo y enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la contaminación ambiental. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 459-474. Manual Moderno: D.F.
- Dey, S. K., Dey, J., Patra, S. y Pothal, D. 2007. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 53-60.
- Dietz, K. J., Baier, M. y Krämer, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En: Prasad, M.N.V. y Hagemeyer, J. (Eds.). *Heavy Metal Stress in Plants-Molecules to ecosystem: 73-97*. Springer: Berlin.
- Dirr, H., Reinemer, P. y Huber, R. 1994. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European Journal of Biochemistry*, 220 (3): 645-661.
- Dixit, V., Pandey, V. y Shyam, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52 (358): 1101-1109.
- Dixon, D. P., Laphorn, A. y Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3: 3004.3001–3004.3010.
- Duan, C. y Wang, H. 1992. Effects of heavy metals on the content of nuclear acids and nuclear enzymatic activities in the root tips of bean (*Vicia faba*). *Environmental Science*, 13 (5): 31-35.
- Ederli, L., Reale, L., Ferranti, F. y Pasqualini, S. 2004. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiologia Plantarum*, 121 (1): 66-74.
- Edwards, R., Dixon, D. P. y Walbot, V. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science*, 5 (5): 193-198.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1 (6): 529-539.
- Ernst, W. H. O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry*, 11 (1–2): 163-167.



- Foyer, C. H. y Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28 (8): 1056-1071.
- Gallego, S., Benavides, M. y Tomaro, M. 2002. Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 36 (3): 267-273.
- Gill, S. S. y Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909-930.
- Gilman, E. F. 1999. *Dodonaea viscosa* Varnish Leaf, Hopbush: Fact sheet FPS-181, University of Florida [en línea] [fecha de consulta: 3 Marzo 2010]. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/fp181>
- Göthberg, A., Greger, M., Holm, K. y Bengtsson, B. E. 2004. Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium, and lead in water spinach. *Journal of Environmental Quality*, 33 (4): 1247-1255.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. y Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32 (6): 481-494.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106 (1): 207-212.
- Grill, E., Winnacker, E. y Zenk, M. 1985. Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230 (4726): 674-676.
- Gutiérrez-Rojas, M., Volke-Sepúlveda, T. L., Ramírez-Islas, M. E. y Gómez-Santos, A. 2009. Informe técnico final del proyecto (GTO-2005-C04-18600): Selección de plantas del Estado de Guanajuato con capacidad para fitorremediar suelos contaminados con metales. Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica, CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato. 60 pp.
- Ha, S.-B., Smith, A. P., Howden, R., Dietrich, W. M., Bugg, S., O'Connell, M. J., Goldsbrough, P. B. y Cobbett, C. S. 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell Online*, 11 (6): 1153-1164.
- Habig, W. H. y Jakoby, W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*, 77: 398-405.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366): 1-11.
- Halušková, L., Valentovicova, K., Huttova, J., Mistrik, I. y Tamas, L. 2009. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1069-1074.

- Hansberg, T. W. 2008. El dióxígeno y sus especies reactivas. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 25-46. Manual Moderno: D.F.
- Hasan, S. A., Hayat, S., Ali, B. y Ahmad, A. 2008. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environmental Pollution*, 151 (1): 60-66.
- Ho, W. M., Ang, L. H. y Lee, D. K. 2008. Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings. *Journal of Environmental Sciences*, 20 (11): 1341-1347.
- Hossain, M. A., Silva, J. A. T. d. y Fujita, M. 2011. Glyoxalase System and Reactive Oxygen Species Detoxification System in Plant Abiotic Stress Response and Tolerance: An Intimate Relationship. En Arun, S. (Ed.), *Abiotic Stress in Plants: Mechanisms and Adaptations*: 235-266. InTech Publisher: Rijeka, Croatia.
- Hosseini, R. H., Khanlarian, M. y Ghorbanli., M. 2007. Effect of lead on germination, growth and activity of catalase and peroxidase enzyme in root and shoot of two cultivars of *Brassica napus* L. *Journal of Biological Sciences*, 7 (4): 592-598.
- Hsu, Y. y Kao, C. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42 (3): 227-238.
- Hsu, Y. y Kao, C. 2007. Heat shock-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant and Soil*, 300 (1-2): 137-147.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L. y Massacci, A. 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (11): 977-982.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R. y Sarkar, D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 65 (4): 591-598.
- Jarvis, M. D. y Leung, D. W. M. 2001. Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. *proliferus* var. *palmensis* (H. Christ): an ultrastructural study. *Plant Science*, 161 (3): 433-441.
- Jomova, K. y Valko, M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283 (2-3): 65-87.
- Kertulis-Tartar, G. M., Rathinasabapathi, B. y Ma, L. Q. 2009. Characterization of glutathione reductase and catalase in the fronds of two *Pteris* ferns upon arsenic exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (10): 960-965.
- Khan, N. A., Singh, S. y Nazar, R. 2007. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193 (6): 435-444.

- Kim, Y. H. y Yoo, Y. J. 1996. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (7): 531-535.
- Klassen, S. P., McLean, J. E., Grossl, P. R. y Sims, R. C. 2000. Fate and Behavior of lead in soils planted with metal-resistant species (River Birch and Smallwing Sedge). *Journal of Environmental Quality*, 29 (6): 1826-1834.
- Klotz, L.-O. 2002. Oxidant-induced signaling: effects of peroxyxynitrite and singlet oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 383 (3-4): 443-456.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. y Sheen, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (6): 2940-2945.
- Larios, H. M. 2002. *Biología Celular Y Molecular*, Pearson Educación.
- Leon, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Mateos, R. M., del Rio, L. A. y Sandalio, L. M. 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (10): 813-820.
- Liu, D., Jiang, W., Meng, Q., Zou, J., Gu, J. y Zeng, M. 2009. Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of *Allium sativum* L. *Biocell*, 33: 25-32.
- Liu, D., Li, T.-Q., Jin, X.-F., Yang, X.-E., Islam, E. y Mahmood, Q. 2008. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (2): 129-140.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275.
- Ma, C. y Hong, F. 1998. Preliminary studies on the effects of Hg on the germination and growth of wheat seedlings. *Acta Botanica Ecologica*, 22 (4): 373-378.
- Ma, J. F., Ueno, D., Zhao, F.-J. y McGrath, S. P. 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, 220 (5): 731-736.
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. y Kennelley, E. D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409 (6820): 579.
- Machado, S. E. y Fernandes, A. S. 2008a. Potencial antioxidante de los carotenoides. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 269-278. Manual Moderno: D.F.
- Machado, S. E. y Fernandes, A. S. 2008b. Potencial antioxidante del ácido ascórbico. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 279-289. Manual Moderno: D.F.

- Maehly, A. C. y Chance, B. 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1: 357-424.
- Mahmood, T., Islam, K. R. y Muhammad, S. 2007. Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. *Pakistan Journal of Botany*, 39 (2): 451-462.
- Maldonado, M. A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F. y Volke-Sepulveda, T. 2011. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil*, 339 (1-2): 377-389.
- Manara, A. 2012. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. En Furini, A. (Ed.). *Plants and Heavy Metals*: 27-53. Springer: New York.
- Mannervik, M. B., Danielson, U.H. 1988. Glutathione transferases: Structure and catalytic activity. *CRC critical reviews in biochemistry*, 23: 281-334.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E. y Marmioli, N. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution*, 134 (2): 217-227.
- Marrs, K. A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47 (1): 127-158.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press. 889 pp.
- Martínez-Pérez, G., Orozco-Segovia, A. y Martorell, C. 2006. Efectividad de algunos tratamientos pregerminativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta Oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 79: 9-20.
- Meinhard, M. y Grill, E. 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 508 (3): 443-446.
- Meinhard, M., Rodriguez, P. L. y Grill, E. 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, 214 (5): 775-782.
- Meister, A. 1994. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research*, 54 (7 Suppl): 1969s-1975s.
- Mendez, M. O. y Maier, R. M. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments-an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116 (3): 278-283.
- Messer, R. L. W., Lockwood, P. E., Tseng, W. Y., Edwards, K., Shaw, M., Caughman, G. B., Lewis, J. B. y Wataha, J. C. 2005. Mercury (II) alters mitochondrial activity of monocytes at sublethal doses via oxidative stress mechanisms. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75 (2): 257-263.
- Meyer, A. J. y Hell, R. 2005. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, 86 (3): 435-457.

- Miller, G., Begonia, G. y Begonia, M. F. T. 2011. Selected morphological characteristics, lead uptake and phytochelatin synthesis by coffee weed (*Sesbania exaltata* Raf.) grown in elevated levels of lead-contaminated soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 (6): 2401-2417.
- Mills, R. F., Krijger, G. C., Baccarini, P. J., Hall, J. L. y Williams, L. E. 2003. Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 35 (2): 164-176.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S. y Gupta, D. K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65 (6): 1027-1039.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9): 405-410.
- Mobin, M. y Khan, N. A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164 (5): 601-610.
- Molina, A. S., Nievas, C., Chaca, M. V. P., Garibotto, F., González, U., Marsá, S. M., Luna, C., Giménez, M. S. y Zirulnik, F. 2008. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L. *Plant Growth Regulation*, 56 (3): 285-295.
- Møller, I. M., Jensen, P. E. y Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459-481.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A. y Richaud, P. 2009a. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149 (2): 894-904.
- Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P. y Gelhaye, E. 2009b. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (23): 3711-3725.
- Morelli, E., Ferrara, R., Bellini, B., Dini, F., Di Giuseppe, G. y Fantozzi, L. 2009. Changes in the non-protein thiol pool and production of dissolved gaseous mercury in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* under mercury exposure. *Science of the Total Environment*, 408 (2): 286-293.
- Mulier, B., Rahman, I., Watchorn, T., Donaldson, K., MacNee, W. y Jeffery, P. 1998. Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH). *European Respiratory Journal*, 11 (2): 384-391.

- Mullen, M. D., Wolf, D. C., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Flemming, C. A. y Bailey, G. W. 1989. Bacterial sorption of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (12): 3143-3149.
- Naumann, B., Eberius, M. y Appenroth, K. J. 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 (12): 1656-1664.
- Nishizono, H., Ichikawa, H., Suzuki, S. y Ishii, F. 1987. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant and Soil*, 101 (1): 15-20.
- Niyogi, K. K. 1999. Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 333-359.
- Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F. y De Bellis, L. 2006. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Reports*, 25 (9): 997-1005.
- Ortiz-Moreno, M. L. 2010. Evaluación preliminar de la abundancia de hongos lignolíticos cultivables y su actividad peroxidasa, obtenidos a partir de suelos con diferentes usos agrícolas en zona rural de Villavicencio. *Orinoquia*, 14 (1): 171-177.
- Öztetik, E. 2008. A Tale of Plant Glutathione S -Transferases: Since 1970. *The Botanical Review*, 74 (3): 419-437.
- Pal, R. y Rai, J. P. 2010. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (3): 945-963.
- Pang, J., Chan, G. S. Y., Zhang, J., Liang, J. y Wong, M. H. 2003. Physiological aspects of vetiver grass for rehabilitation in abandoned metalliferous mine wastes. *Chemosphere*, 52 (9): 1559-1570.
- Patocka, J. y Cerný, K. 2003. Inorganic lead toxicology. *Acta Medica*, 46 (2): 65-72.
- Peng, M. y Wang, H. 1991. The variation of cell ultrastructure of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *China Environmental Science*, 11 (6): 426-431.
- Peralta-Videa, J. R., de la Rosa, G., Gonzalez, J. H. y Gardea-Torresdey, J. L. 2004. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research*, 8 (3-4): 679-685.
- Peraza, R. L. 2008. Catalasa. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 183-200. Manual Moderno: D.F.
- Pessarakli, M. 2001. *Handbook of Plant and Crop Physiology*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1000 pp.
- Peuke, A. D. y Rennenberg, H. 2005. Phytoremediation. *EMBO Reports*, 6 (6): 497-501.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D. y Malecka, A. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*, 60 (2): 153-162.

- Pilgrim, W. y Hughes, R. N. 1994. Lead, cadmium, arsenic and zinc in the ecosystem surrounding a lead smelter. *Environmental Monitoring and Assessment*, 32 (1): 1-20.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56 (1): 15-39.
- Pocsi, I., Prade, R. A. y Penninckx, M. J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49: 1-76.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B. y Barceló, J. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants?. *Plant Science*, 212: 15-25.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. y Pinelli, E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213: 113-136.
- Przymusiński, R., Banaszak, A. y Gwóźdź, E. 2001. Organospecific responses of lupin seedlings to lead I. Localization of lead ions and stress proteins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23 (1): 109-116.
- Przymusiński, R., Sychała, M. y Gwóźdź, E. A. 1991. Inorganic Lead Changes Growth and Polypeptide Pattern of Lupin Roots. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 187 (1): 51-57.
- Rabie, G. H. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, 4 (4): 332-345.
- Radotic, K., Ducic, T. y Mutavdzic, D. 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 44 (2): 105-113.
- Raven, P. H. y Johnson, G. B. 2002. *Biology*, 6<sup>th</sup>. ed. Boston, MA: McGraw-Hill. 1238 pp.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press. 889 pp.
- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S. y Sudhakar, C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60 (1): 97-104.
- Rivera, C. F.; Volante, B. B.; Díaz de León, S. F. y Pérez-Flores, L. J. 2008. Especies reactivas de oxígeno en las plantas. En: Konigsberg, F. M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 501-524. Manual Moderno: D.F.
- Rivera-Becerril, F., Metwally, A., Martin-Laurent, F., Tuinen, D., Dietz, K.-J., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 2005. Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum Sativum* L. *Water, Air, and Soil Pollution*, 168 (1-4): 171-186.
- Rojas-Loria, C. C., Peralta-Perez, M. D. R., Buendia-Gonzalez, L. y Volke-Sepulveda, T. L. 2012. Effect of a saprophytic fungus on the growth and the lead uptake, translocation and

- immobilization in *Dodonaea viscosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 14 (5): 518-529.
- Rouhier, N., Lemaire, S. D. y Jacquot, J.-P. 2008. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*, 59 (1): 143-166.
- Ryan, P. R., Delhaize, E. y Jones, D. L. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52 (1): 527-560.
- Saleh, M. y Al-Garni, S. 2006. Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogenfixer *Rhizobium bacterium*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (2): 133-142.
- Salt, D. E., Kato, N., Krämer, U., Smith, R. D. y Raskin, I. 2000. The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non accumulator species of *Thlaspi*. En: Terry, N. y Bañuelos G.S. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 189-200.
- Scarpa, M., Rigo, A., Maiorino, M., Ursini, F. y Gregolin, C. 1984. Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 801 (2): 215-219.
- Schröder, P. 2002. The role of glutathione and glutathione S-transferases in plant reaction and adaptation to xenobiotics. En Grill, D., Tausz, M., y Kok, L. (Eds.). *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment*, 2: 155-183. Springer: Dordrecht, Boston, London.
- Sengar, R. S., Gautam, M., Sengar, R. S., Garg, S. K., Sengar, K. y Chaudhary, R. 2008. Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196: 73-93.
- Sharma, P. y Dubey, R. S. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 35-52.
- Sharma, S. S. y Dietz, K.-J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14 (1): 43-50.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. y Dowd, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360 (Pt 1): 1-16.
- Silva, E. C., Albuquerque, M. B., Neto, A. D. y Junior, C. D. S. 2013. Drought and Its Consequences to Plants – From Individual to Ecosystem. En Akinci, S. (Ed.) *Agricultural and Biological Sciences: Responses of Organisms to Water Stress*: 17-47. InTech Publisher: Rijeka, Croatia.



- Singh, N., Ma, L. Q. y Rathinasabapathi, B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, 170 (2): 274-282.
- Singh, S., Khan, N. A., Nazar, R. y Anjum, N. A. 2008. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology*, 3: 25-32.
- Standley, P. C. 1982. Trees and Shrubs of México. Contributions from the United States National Herbarium, 23: 1721 p
- Sun, Q., Ye, Z. H., Wang, X. R. y Wong, M. H. 2005. Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: A Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry*, 66 (21): 2549-2556.
- Sun, Q., Ye, Z. H., Wang, X. R. y Wong, M. H. 2007. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology*, 164 (11): 1489-1498.
- Tamás, L., Dudíková, J., Ďurčková, K., Huttová, J., Mistrík, I. y Zelinová, V. 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environmental and Experimental Botany*, 62 (1): 86-91.
- Thomas, J. A. 1999. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress [en línea] [fecha de consulta: 4 mayo 2010]. Disponible en: <http://www.bb.iastate.edu/~jat/glutchp.html>
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M. y Schroeder, J. I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (9): 4991-4996.
- Thurman, D. A. 1981. Metals in the environment. En Lepp, N. W. (Ed.). *Effect of heavy metal pollution on plants*: 239-247. Applied Science Publishers: New Jersey.
- Townsend, D. M. y Tew, K. D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22 (47): 7369-7375.
- U.S. EPA. 2000. Introduction to Phytoremediation [en línea] [fecha de consulta: 3 Marzo 2010]. Disponible en: <http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>
- U.S. EPA. 2006. Air quality criteria for lead. Final Report [en línea] [fecha de consulta: 3 Marzo 2010]. Disponible en: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=158823#Download>
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12 (10): 1161-1208.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. y Richaud, P. 2004. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, 576 (3): 306-312.

- Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A. y de la Rosa-Pérez, D. A. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. 144 pp.
- Von Carlowitz, P., Wolf, G. y Kemperman, R. 1991. The multipurpose and shrub database: an information and decision-support system. ICRAF, Nairobi Kenya [en línea] [fecha de consulta: 14 marzo 2010]. Disponible en: <http://www.ciesin.org/IC/icraf/ICRAF.html>
- Wang, K. 1996. Effects of cadmium on the growth of different genetic rice. *Rural Ecological Environment*, 12 (3): 18–23.
- Wilce, M. C. y Parker, M. W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205 (1): 1-18.
- Winkler, B. S., Orselli, S. M. y Rex, T. S. 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 17 (4): 333-349.
- Wójcik, M. y Tukiendorf, A. 2004. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 44 (1): 71-80.
- Wójcik, M. y Tukiendorf, A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biologia Plantarum*, 49 (2): 237-245.
- Wong, S. C., Li, X. D., Zhang, G., Qi, S. H. y Min, Y. S. 2002. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Pollution*, 119 (1): 33-44.
- Wuana, R. A. y Okieimen, F. E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 2011: 1-20.
- Xiong, Z. T. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60 (2): 285-291.
- Yadav, S. K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76 (2): 167-179.
- Yang, D., Xu, C. y Zhang, F. 1989. Effects of Cd on the photosynthetic system II of chloroplast of spinach. *Acta Botanica Sinica*, 31 (9): 702-707.
- Yang, J. L., Zheng, S. J., He, Y. F. y Matsumoto, H. 2005. Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *Journal of Experimental Botany*, 56 (414): 1197-1203.
- Yang, J. y He, J. 1995. Effects of Cd on the physiological biochemistry of plants. *Agroenvironmental Protection*, 14 (5): 193-197.

- Young, C. C., Chang, C. H., Chen, L. F. y Chao, C. C. 1998. Characterization of the nitrogen fixation and ferric phosphate solubilizing bacteria isolated from a Taiwan soil. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 35: 201-210.
- Youssef, M. M. y Azooz, M. M. 2013. Biochemical Studies on the Effects of Zinc and Lead on Oxidative Stress, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Okra (*Hibiscus esculentus* cv. Hassawi). *Science International*, 1: 29-38.
- Zeng, F., Chen, S., Miao, Y., Wu, F. y Zhang, G. 2008. Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environmental Pollution*, 155 (2): 284-289.
- Zhang, C. y Ge, Y. 2008. Response of glutathione and glutathione S-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress. *Rice Science*, 15 (1): 73-76.
- Zheng, S. J., Ma, J. F. y Matsumoto, H. 1998. High aluminum resistance in Buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*, 117 (3): 745-751.
- Zou, T., Li, T., Zhang, X., Yu, H. y Luo, H. 2011. Lead accumulation and tolerance characteristics of *Athyrium wardii* (Hook.) as a potential phytostabilizer. *Journal of Hazardous Materials*, 186 (1): 683-689.

# **ANEXO I. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)**

**Tabla A1.** Cargas de las variables dentro de los Componentes Principales 1 y 2 (CP)

Variable	CP1	CP2
BM_Brote (Biomasa Brote)	0.40474	0.1009
<b>BM_Raíz</b> <b>(Biomasa Raíz)</b>	<b>0.43112</b>	<b>0.08909</b>
BM_Total (Biomasa Total)	0.40714	0.10374
L-Brote (Elongación Brote)	0.39164	-0.27692
L-Raíz (Elongación Raíz)	0.35101	0.43268
RB <sub>B</sub> Relación raíz-brote (biomasa)	0.39972	0.04854
RB <sub>L</sub> Relación raíz-brote (elongación)	-0.21953	0.83956

**Tabla A2.** Cargas de las variables dentro de los Componentes Principales 1 y 2 (CP)

Variable	CP1	CP2
L-Brote (Longitud Brote)	0.4226	0.13321
L-Raíz (Longitud Raíz)	0.42635	-0.09016
BM_Brote (Biomasa Brote)	0.42169	0.18031
<b>BM_Raíz</b> <b>(Biomasa Raíz)</b>	<b>0.3833</b>	<b>0.31</b>
BM_Total (Biomasa Total)	0.42027	0.20214
RB <sub>B</sub> Relación raíz-brote (biomasa)	-0.32628	0.50825
RB <sub>L</sub> Relación raíz-brote (elongación)	0.17835	-0.73915

## **ANEXO II. PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

## EFFECT OF A SAPROPHYTIC FUNGUS ON THE GROWTH AND THE LEAD UPTAKE, TRANSLOCATION AND IMMOBILIZATION IN *DODONAEA VISCOSA*

Cesar C. Rojas-Loria,<sup>1</sup> Maria Del Rosario Peralta-Perez,<sup>2</sup>  
Leticia Buendia-Gonzalez,<sup>3,4</sup> and Tania L. Volke-Sepulveda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco, Col. Vicentina, Iztapalapa, México

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Circuito No. 1, Nuevo Campus Universitario. Chihuahua, Chihuahua, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco, Col. Vicentina, Iztapalapa, México

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Toluca, Estado de México, México

*Phytoremediation is a feasible alternative to remediate soils polluted with toxic elements, which can be enhanced by manipulating plant-microbe interactions. Regarding this, free-living saprophytic fungi that interact beneficially with roots have been scarcely studied. Thus, the aim of this study was to assess the effect of a saprophytic fungus, Lewia sp., on the plant growth and the ability of Dodonaea viscosa to phytoaccumulate or phytostabilize soluble and insoluble sources of lead in a solid support.*

*The growth of D. viscosa was influenced by both Pb and Lewia sp. While seedlings exposed to Pb showed a decrease in biomass production, in seedlings grown without Pb the biomass was stimulated by Lewia sp. The fungus strongly stimulated the weight-to-length ratio in roots. Regardless of the treatment, D. viscosa accumulated 4.4–6.5 times more Pb in roots than in shoots, conducting to low translocation factors (<0.2). The presence of Lewia sp. significantly improved Pb accumulation, achieving high bioconcentration factors (>22), which was attributed to an increased bioavailability and uptake of Pb due to the fungus. This study demonstrated that Lewia sp. could improve Pb-phytostabilization by D. viscosa in soils polluted with soluble and insoluble forms of Pb.*

**KEY WORDS:** *Dodonaea viscosa*, *Lewia* sp., lead phytostabilization, free-living saprophytic fungi, plant-fungi interaction

## INTRODUCTION

Soil pollution by toxic elements currently affects about 235 million hectares, being Cd and Pb among the most widespread pollutants (Seregin and Ivanov 2001). Since metals

Address correspondence to T. L. Volke-Sepulveda, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa 09340, México, D.F. E-mail: tvs@xanum.uam.mx

cannot be eliminated by physicochemical or biological processes, once released into the soil, remediation can only be achieved through changes in their redox state, modifying their solubility, mobility, and/or toxicity (Barkay and Schaefer 2001). Phytoremediation is one of the few technically and economically feasible alternatives to remediate metal-polluted soils through various processes that use plants and their associated microorganisms. Metal phytoremediation can be achieved through: (1) metal removal by its accumulation in aerial tissues (phytoextraction); or (2) metal stabilization by its transformation, solubility reduction or its accumulation in roots (phytostabilization) (Mench et al. 2009).

The role of microorganisms in phytoremediation is not yet fully understood (Zhuang et al. 2007), which creates a need to improve the understanding of mechanisms involved in tolerance, accumulation, exclusion and mobilization of metals by rhizosphere microorganisms and their relation with phytoremediating plants. Rhizospheric microorganisms are known to modify the solubility, mobility and availability of metals in the soil, directly affecting their uptake and/or exclusion by plants (Zhuang et al. 2007; Kidd et al. 2009). Microorganisms can affect the success of phytoremediation in two ways: (1) reducing the metal's toxicity by decreasing its accumulation in the aerial plant tissues, or (2) enhancing plant growth and/or metal accumulation by a decrease in the stress due to metal toxicity (Lebeau et al. 2008). The success of rhizospheric associations on the remediation of a polluted soil depends on the plant-microbe-metal combination and is influenced by the particular soil conditions (Göhre and Paszkowski 2006; Gadd 2007).

Although high metal concentrations can adversely affect the microbial population density in the rhizosphere of plants growing in polluted soils, usually there are microorganisms with mechanisms that allow them to deal with such pollutants, which may promote phytoremediation processes (Khan et al. 2009). The most studied microbial groups have been plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi. Among them, it has been shown that fungi are generally more tolerant than bacteria (Kidd et al. 2009). Besides these groups, some free-living saprophytic fungi can also form stable associations with roots, approaching a mutualistic relationship (Lynch and Moffat, 2005). In fact, there are studies (Adams et al. 2007; Arriagada et al. 2007; Cao et al. 2008; Jiang et al. 2008) reporting the beneficial effect of non-mycorrhizal fungi on plant growth and phytoremediation. *Trichoderma* and *Fusarium* are among the most commonly studied genera. However, metal phytoremediation studies related to these fungi are still scarce.

The fungal hyphae can trap metals found in the roots or the rhizosphere, thus limiting their translocation from roots to shoots and improving the tolerance of plants (Zafar et al. 2007). Several studies (Adams et al. 2007; Arriagada et al. 2007) have shown that the inoculation of certain plant species with saprophytic fungi such as *T. harzianum* and *F. concolor*, besides stimulating plant growth also promotes metal accumulation in roots (phytostabilization). In other cases, this kind of fungi may also significantly increase the metal translocation to shoots in tolerant plants, which implies an important potential for their application in phytoextraction (Cao et al. 2008; Jiang et al. 2008).

*Lewia* is a fungus genus (*Ascomycota*) with *Altenaria* anamorph, including 10 described species (Simmons 2002; Kwasna and Kosiak 2003; Vieira and Barreto 2005; Kwasna et al. 2006). The genus includes many species of plant pathogens, particularly of grasses. For instance, *L. avenicola* and *L. infectoria* occur on cereal grains of reduced quality (Kwasna et al. 2006). *L. chlamidosporiformans* has been found to be associated with *Euphorbia heterophylla*, causing inflorescence necrosis, foliage blight and stem canker, so it has been proposed as a mycoherbicide for this weed (Vieira and Barreto 2010). Nevertheless, some species of *Lewia* have also been found as endophytes in healthy tissues of trees.



Kwasna et al. (2008) isolated *L. infectoria* from the roots of *Betula pendula*, and Thomas et al. (2008) isolated *L. eureka* from healthy stems and pods of *Theobroma gileri*.

On the other hand, trees have been reported as suitable species for metal phytostabilization purposes (Mertens et al. 2007) and their use could have significant potential, since they produce high amounts of biomass. However, studies to date on this topic are relatively insufficient. *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (hopbush) is a perennial woody shrub in the *Sapindaceae* family, and is widely distributed in tropical, subtropical and temperate Africa, America and Asia. This species is tolerant to drought, flooding, wind and frost and it is commonly used for erosion control, as a windbreak and as a soil restorer (Camacho et al. 1992).

In this context, the aim of the present study was to assess the effect of a free-living saprophytic fungus, *Lewia* sp., on the plant growth and the capability of *Dodonaea viscosa* to phytoaccumulate and/or phytostabilize soluble ( $(\text{PbNO}_3)_2$ ) and insoluble (PbS) sources of Pb, using perlite as a solid support.

## METHODS AND MATERIALS

### Plant Material

Seeds of *D. viscosa* were collected from mature wild trees growing surrounded by mining wastes in Guanajuato, Mexico. Seeds were air-dried and stored at room temperature in paper bags until their utilization. For all assays, seeds were heat-scarified by immersion in distilled water at 75°C during 3 min. Then, they were surface-sterilized with 2% commercial detergent (30 min), 70% ethanol (30 sec) and 1.8% sodium hypochlorite (25 min) followed by repeated rinses with sterile deionized water.

### Fungal Inoculum

A fungal strain of the genus *Lewia* was isolated from surface-sterilized seeds of *Festuca arundinacea* (Schreber) collected from mature wild plants growing at a polluted site in Queretaro, Mexico. The strain was identified in our lab by Cruz-Hernandez (personal communication) by comparing its nucleotide sequence (*GenBank* GU296022) with published fungal sequences through standard nucleotide–nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) homology search. The fungus was maintained at 4°C in potato-dextrose-agar (PDA) medium, after 10 days of growth (25°C).

Since spores of this strain of *Lewia* sp. are not produced over a long time period in PDA medium, the fungal inoculum was prepared as follows. After 10 days of growth on PDA plates (25°C), pieces (5 × 5 mm) of the peripheral mycelia were disaggregated by thorough agitation in sterile distilled water with glass beads. By this means, a homogeneous suspension with a concentration of  $1.21 \pm 0.18$  mg biomass mL<sup>-1</sup> was obtained.

### Growth Conditions

To determine the effect of *Lewia* sp. on the growth and lead bioaccumulation ability of *D. viscosa*, trials with perlite (3–5 mm) contaminated with two lead salts with different water solubility (Liley et al. 1997) were conducted:  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (38.8 g in 100 g H<sub>2</sub>O (0°C)) and PbS (0.00009 g in 100 g H<sub>2</sub>O (18°C)). For that purpose, one treated seed was aseptically sown into each culture tube (25 × 150 mm, *Pyrex*) containing 2 g of dry perlite as a solid

support. Each tube was moistened (75% moisture) with Murashige & Skoog medium (MS, *Sigma*) added with sucrose (10 g L<sup>-1</sup>, *Sigma*) and lead (250 mg kg<sup>-1</sup> of dry perlite, *J.T. Baker*) supplied as Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or PbS. All media were adjusted to pH 5.7 with 0.5 N NaOH before autoclaving (121°C, 15 min).

Seeds were maintained in the dark at 25°C until their germination, which implies the radicle emergence through the seed coat (Bewley 1997). Fifteen days after seed germination, seedlings were separated into two groups, one to be inoculated with 0.5 mL of the fungal cell suspension prepared as described above, and the other to be used as uninoculated controls. Seedlings grown in the absence of both lead and fungus were used as controls. Seedlings were maintained under a light intensity of 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for a 16 h photoperiod at 25 ± 1°C, during a total period of 45 days.

### Determination of Growth Parameters

Forty-five days after sowing, *D. viscosa* seedlings were carefully harvested, washed with tap water and separated into roots and shoots in order to record growth measurements. For this purpose, the biomass and length of the roots and shoots (the distance from the surface to the upper end of the longest leaf) were measured for each condition. The plant biomass was measured on dry weight (DW) basis after drying the tissue at 60°C up to a constant weight. Growth measurements were used to estimate the growth ratio (GR) (Baker 1987) and the weight-to-length ratio (W-LR), which were calculated as follows:

$$\text{GR (\%)} = \frac{\text{Total plant biomass with Pb}}{\text{Total plant biomass without Pb}} \times 100$$

$$\text{W - LR (mg} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Root biomass (DW)}}{\text{Root length}}$$

**Analysis of the lead content in plant tissues.** For lead analysis, roots were washed with 10 mM ethylene-diamine-tetra-acetic (EDTA) acid to remove the adsorbed Pb<sup>2+</sup> (Göthberg et al. 2004). Then, roots and shoots were oven-dried (60°C, 24–48 h) and about 100 mg of dry tissue were completely digested after 10 min in a microwave digestion system (*CEM, MARSXpress*) with 5 mL of 69% HNO<sub>3</sub> (*J.T. Baker, ACS Reagent Grade*) and 4 mL of deionized water (18 MΩ cm<sup>-1</sup>, *Milli-Q Millipore*). All samples were filtered (0.45 μm, *GN-6Metricell*) and the final sample volume was adjusted to 10 mL with deionized water. The lead concentration in the extracts was analyzed by flame atomic-absorption spectrometry (AAS) (*Shimadzu, AA-6300*). Standard curves were made with a Pb<sup>2+</sup> standard solution (1000 μg mL<sup>-1</sup> *J.T. Baker, Instra-analyzed*). All the laboratory ware was prepared by soaking for 12 hours in a 10% HNO<sub>3</sub> solution.

Lead concentration determinations were used to estimate the bioconcentration (BCF) and the translocation factors (TF). BCF was defined as the ratio of the lead concentration in the entire plant ([Pb<sup>2+</sup>]<sub>plant</sub>) to the lead concentration in perlite ([Pb<sup>2+</sup>]<sub>soil</sub>). TF was defined as the ratio of the lead concentration in shoots ([Pb<sup>2+</sup>]<sub>shoots</sub>) to the lead concentration in roots ([Pb<sup>2+</sup>]<sub>roots</sub>) (Audet and Charest 2007):

$$\text{BCF} = \frac{[\text{Pb}^{2+}]_{\text{plant}}}{[\text{Pb}^{2+}]_{\text{soil}}} \quad \text{TF} = \frac{[\text{Pb}^{2+}]_{\text{shoots}}}{[\text{Pb}^{2+}]_{\text{roots}}}$$

### Perlite Analyses

The extraction of water-soluble lead from the perlite was performed using water in equilibrium with CO<sub>2</sub> (meteoric water), according to the procedure described in the Official Mexican Standard NOM-147 SEMARNAT/SSA1–2004. This procedure allows the leaching of the bioavailable fraction of lead in the perlite by an extracting solution that simulates rain. The meteoric water was prepared by bubbling air through distilled water for 12 h until a pH of  $5.5 \pm 0.2$  was reached. For the extraction procedure, 2.2 g (DW) of perlite were mixed with 10 mL of meteoric water and shaken at 120 rpm for 24 h. The aqueous phase was separated from the perlite by filtration (*Whatman* 42) and used to measure the bioavailable fraction of lead by AAS.

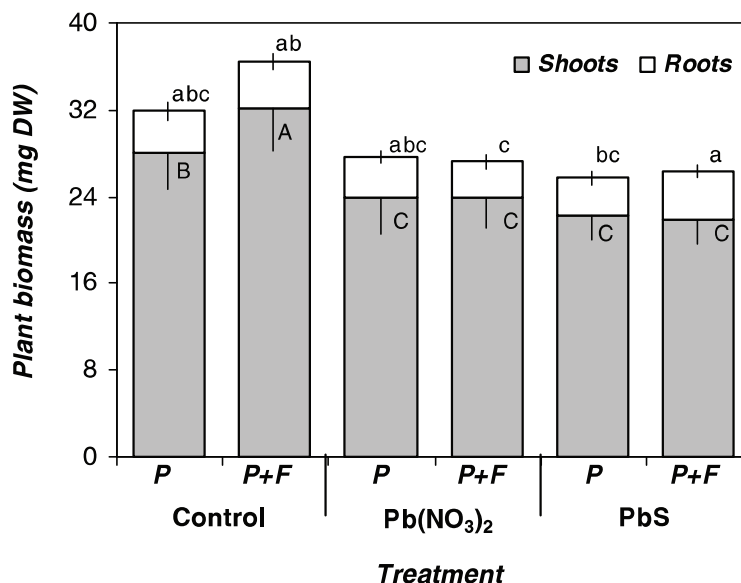
### Statistical Analysis

Significant treatment effects for plant growth parameters and for Pb accumulation data were determined by one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ). Statistical analysis was performed using the SAS software (SAS Institute Inc. Cary, NC). All results are expressed as means obtained from six replicates with their corresponding standard errors. Significant differences are indicated by different letters.

## RESULTS

### Effect of the Fungus and Lead on the Plant Growth

*D. viscosa* growth was influenced by the presence of both lead and *Lewia* sp., which was quantitatively proven by the measurements of biomass (Figure 1) and length (Table 1)



**Figure 1** Plant biomass dry weight of uninoculated (*P*) and inoculated (*P+F*) seedlings of *Dodonaea viscosa* grown 45 days with 250 mg Pb kg<sup>-1</sup> supplied as Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or PbS. Vertical bars denote the SE and different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). Upper-case and lower-case indicate independent testing for roots and shoots.

**Table 1** Shoots and roots elongation, growth ratio and weight-to-length ratio of roots measured in uninoculated (P) and inoculated (P+F) seedlings of *D. viscosa* after 45 days of growth with 250 mg Pb kg<sup>-1</sup> supplied as Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or PbS

Treatment	Elongation (mm)		Growth ratio (%)	Weight-to-length ratio (mg·cm <sup>-1</sup> )
	Shoots	Roots		
<b>P</b>				
—	80.0 ± 6.7 <sup>b</sup>	79.3 ± 7.9 <sup>abc</sup>	100.0 ± 12.6 <sup>b</sup>	0.474 ± 0.066 <sup>d</sup>
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	80.7 ± 9.8 <sup>b</sup>	81.7 ± 7.5 <sup>ab</sup>	86.3 ± 12.9 <sup>c</sup>	0.519 ± 0.121 <sup>cd</sup>
PbS	101.1 ± 9.6 <sup>a</sup>	87.0 ± 17.2 <sup>a</sup>	79.3 ± 7.9 <sup>c</sup>	0.362 ± 0.025 <sup>e</sup>
<b>P+F</b>				
—	78.1 ± 6.3 <sup>b</sup>	67.5 ± 11.7 <sup>bc</sup>	116.3 ± 11.6 <sup>a</sup>	0.697 ± 0.035 <sup>a</sup>
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	73.7 ± 12.5 <sup>b</sup>	66.0 ± 12.9 <sup>c</sup>	82.5 ± 10.9 <sup>c</sup>	0.602 ± 0.067 <sup>b</sup>
PbS	74.2 ± 6.6 <sup>b</sup>	80.0 ± 11.8 <sup>abc</sup>	83.0 ± 8.4 <sup>c</sup>	0.570 ± 0.039 <sup>bc</sup>

Data with different letter by column show significant differences ( $P \leq 0.05$ )

of the roots and shoots, as well as the seedlings growth ratio (GR) (Table 1). Particularly, in seedlings grown without lead, the plant biomass production was significantly stimulated by *Lewia* sp., reaching a GR 16% higher than uninoculated controls, which corresponded to 100%. Conversely, seedlings exposed to soluble and insoluble sources of Pb showed a significant decrease (14–21%, respectively) in the GR, independent of the presence of the fungus.

Root and shoot elongation in uninoculated seedlings was particularly increased in the presence of PbS, reaching up to 10 and 26% longer roots and shoots, respectively, compared to controls grown without lead. Conversely, root elongation showed a significant reduction (2–17%) as an effect of the fungus, compared to uninoculated seedlings. Nevertheless, *Lewia* sp. strongly stimulated (up to 50%) the weight-to-length ratio of roots grown with or without Pb (Table 1).

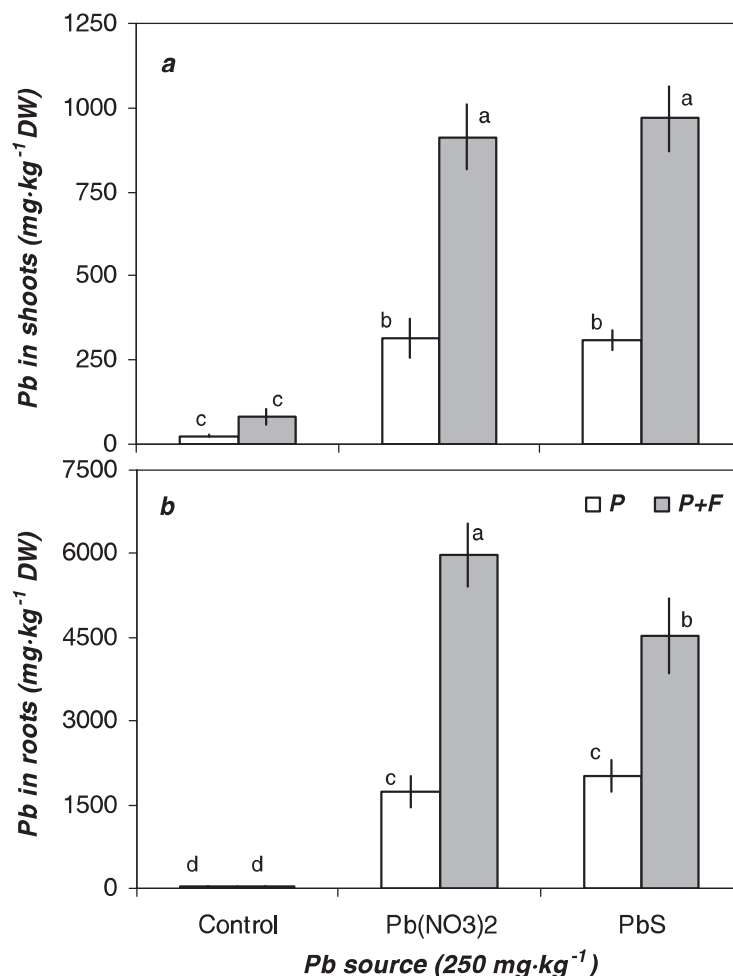
### Lead Uptake and Accumulation

The Pb source solubility did not have a significant effect on its uptake and accumulation by *D. viscosa*, obtaining Pb concentrations 4.4 to 6.5-fold higher in roots than in shoots, regardless of both the presence of *Lewia* sp. and lead solubility (Figure 2). These results were related to low TF values (below 0.21), independently of the Pb source tested (Table 2). However, while in roots of uninoculated seedlings, Pb concentrations of about 1900 mg

**Table 2** Translocation (TF) and bioconcentration (BCF) factors of uninoculated (P) and inoculated (P+F) seedlings of *D. viscosa* after 45 days of growth with 250 mg Pb kg<sup>-1</sup> supplied as Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or PbS

Treatment	TF	BCF
<b>P</b>		
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	8.2 ± 1.3 <sup>c</sup>
PbS	0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>	9.3 ± 1.3 <sup>c</sup>
<b>P+F</b>		
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.15 ± 0.03 <sup>b</sup>	28.0 ± 2.7 <sup>a</sup>
PbS	0.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	22.1 ± 3.0 <sup>b</sup>

Data with different letter by column show significant differences ( $P \leq 0.05$ )



**Figure 2** Lead uptake and bioaccumulation in shoots (a) and roots (b) of uninoculated (P) or inoculated (P+F) seedlings of *Dodonaea viscosa*, after 30 days of exposure to different lead sources. Vertical bars denote the SE and different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

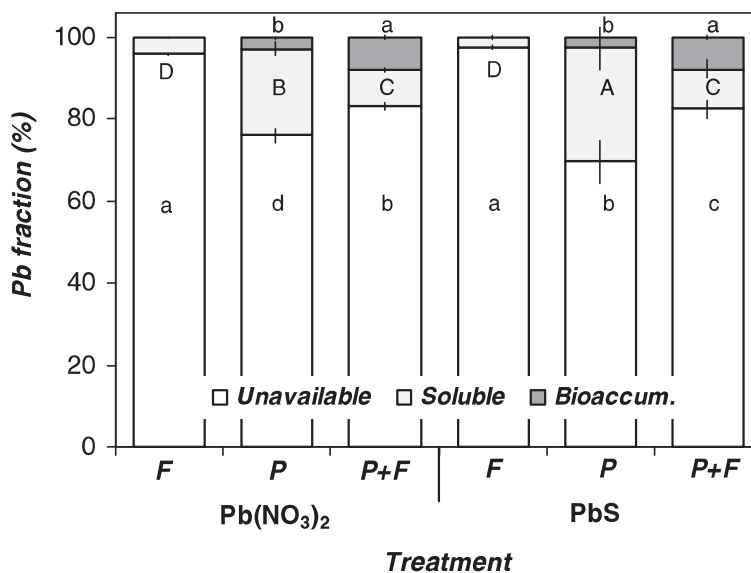
kg<sup>-1</sup> DW were registered, in roots grown in the presence of *Lewia* sp., the Pb accumulation reached values higher than 4500 mg kg<sup>-1</sup> DW (Figure 2). This result is associated with a high BCF, obtaining values below 9.3 for uninoculated seedlings and reaching values higher than 22.0 when the plant was grown with *Lewia* sp. (Table 2).

The distribution of the Pb fractions in the perlite after the growth period of the fungus, the plant and of the plant-fungus is shown in Figure 3. Fungal growth slightly increased (2- to 4-fold) the water-soluble fraction of Pb compared to abiotic controls. In the perlite obtained from the inoculated seedlings, the amount of this fraction of Pb reached about 9%. In uninoculated seedlings, a significant increase (>20%) in the water-soluble Pb fraction was registered, especially in the case of PbS (28%).

## DISCUSSION

### Effect of the Fungus and Lead on Plant Growth

Total biomass, growth rate and the length of roots and shoots are variables usually used as indicators of the growth performance in plants exposed to toxic metals, such as lead



**Figure 3** Distribution of Pb fractions in the model soil after 45 days of growth of *Lewia* sp. (F), *D. viscosa* (P) and *D. viscosa* - *Lewia* sp. (P+F) exposed to different Pb sources. Vertical bars denote the SE and different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). Upper-case and lower-case indicate independent testing for each plant organ.

(Baker 1987). The significant increase in the length of both roots and shoots of *D. viscosa* grown with PbS (Table 1) could be attributed to a phenomenon known as *hormesis*, an adaptive feature characterized by increased responses at low concentrations of a pollutant. As a result, the tested PbS concentration could induce low levels of stress in *D. viscosa* and then activate existing cellular mechanisms that enhance its ability to withstand more severe stress (Calabrese et al. 2007).

On the other hand, the decrease in the GR (Table 1) and biomass production of roots and shoots (Figure 1) of inoculated seedlings in presence of Pb could be attributed to the fact that interacting environmental factors (such as Pb) may modify the effect of *Lewia* sp. in this plant species (Müller and Krauss 2005). Nonetheless, the strong enhancement in the weight-to-length ratio of bioaugmented roots regardless of Pb indicates that the fungus stimulated root biomass production. Similarly, Adams et al. (2007) observed enhanced biomass production in *Salix fragilis*, compared to uninoculated plants, when grown with *T. harzianum* T22 for 12 weeks in metal-polluted soil. Cao et al. (2008) found an increase (up to 70%) in both plant biomass and Ni accumulation in shoots (24%) of *Brassica juncea* by the effect of inoculation with *T. atroviridae* F6. Jiang et al. (2008) observed that the co-inoculation of *B. juncea* with *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp. significantly stimulated plant growth, also increasing the Ni and Cd translocation to shoots, as compared to uninoculated plants.

The beneficial effects of various microorganisms on plant health care well known. However, the effect of free-living saprophytic fungi that can interact with plants, such as *Lewia* sp., on plant fitness is still not clear. Some of these fungi can establish a mutualistic symbiosis with the host plant during its asexual life cycle, while in its sexual form can be parasitic. For instance, the endophytic fungus *Ephialloe*, which has a sexual parasitic form for grasses, may be positively associated with *Lolium perenne* in its asexual form (*Neotyphodium*) (Müller and Krauss 2005). Similarly, our results suggest that this strain of

*Lewia* can establish a beneficial relationship with *D. viscosa*, at least in the early stage of its growth period.

### Lead Uptake and Accumulation

Under the tested conditions, the solubility of the Pb source had no significant effects on metal accumulation by *D. viscosa*, which might be attributed to the ability of this plant species to increase the solubility of Pb. This was demonstrated in trials where the plant grew alone (Figure 3) and can also be related to non-significant effects on metal translocation due to Pb solubility/phytoavailability (Figure 2). In a similar way, Ho et al. (2008) found that *Hibiscus cannabinus* roots were able to take up Pb found in not readily bioavailable forms. In fact, the translocation and accumulation of lead by plants depends on metal bioavailability and plant uptake capability, which differs significantly between species (Liu et al. 2003).

Independently of both Pb solubility and *Lewia* sp., *D. viscosa* accumulated up to 6.5-fold more Pb in roots than in shoots, which indicates Pb immobilization in the roots and hence a restricted transport to the shoots, conducting to low TF values (Table 2). Although only 12–17% of the total plant biomass corresponded to the roots (Figure 1), about 50% of the total Pb accumulated was retained in them. The retention of Pb in roots (an exclusion mechanism) can be attributed to some extent of metal tolerance developed among those populations at the sampling site (Brunner et al. 2008). In fact, metal exclusion is by far the most common strategy in metal-tolerant species (McGrath et al. 2001). Deng et al. (2006) found that species with a high ability for metal exclusion showed a high Pb tolerance, while species with a poor ability for root exclusion were more sensitive. However, the fact that *D. viscosa* grew normally even when Pb was accumulated at levels above 300 and 900 mg·kg<sup>-1</sup> DW in the shoots of inoculated and uninoculated plants, respectively, also suggests tolerance mechanisms that prevent the harmful effects of metal accumulation (Baker 1987).

The high efficiency of *D. viscosa* to accumulate Pb was associated with the BCF. Since this ratio relates the metal concentration in the whole plant (both roots and shoots) to the concentration in the soil (Audet and Charest 2007), the high BCF values found for *D. viscosa* (>8), especially when grown with *Lewia* sp. (>22), were mainly due to the high concentration of Pb accumulated in the roots (Figure 2). Metal-tolerant plant species with high BCF and low TF values have been suggested for phytostabilization purposes (Yoon et al. 2006; Maldonado-Magaña et al. 2010) and can be used for revegetation of mine tailings, hence reducing the dispersion of pollutants (Deng et al. 2006). It is important to highlight that the presence of *Lewia* sp. significantly increased the BCF but not the TF values, indicating that *D. viscosa* shrubs inoculated with *Lewia* sp. could be used to increase the rate of revegetation and phytostabilization of metal-polluted sites.

The increased Pb accumulation by *D. viscosa* in the presence of *Lewia* sp. could indicate that the fungus played a filtering/sequestering role for the water-soluble Pb fraction (Arriagada et al. 2009). Actually, that fraction of Pb in the perlite where the inoculated seedlings grew was significantly lower (~9%) than that found in the perlite from uninoculated seedlings (>20%), suggesting that the fungus favored the sorption of soluble Pb in the root zone, also leading to a subsequent increase in Pb translocation. Similar to our results, Adams et al. (2007) showed that *T. harzianum* T22 effectively promoted the immobilization of Cd, Pb, Mn, Ni, and Zn in roots of *Salix fragilis*.

Furthermore, there have been studies demonstrating that fungi can be highly efficient accumulators of soluble and particulate forms of metals by mechanisms including extra and intracellular precipitation, such as cell-wall adsorption, precipitation as secondary minerals, metal binding by extracellular metabolites or intracellular sequestration by metal-binding peptides and proteins (Gadd 2007; Zafar et al. 2007). This kind of processes may contribute to enhancing Pb immobilization in the roots of *D. viscosa* by the influence of *Lewia* sp.

## CONCLUSIONS

The present study demonstrates that *D. viscosa* can be potentially used for phytoremediation of metal-polluted sites, particularly for lead phytostabilization purposes, since high BCF values ( $>8.2$ ) and low TF values ( $\leq 0.2$ ) were attained, regardless of the bioavailability of the Pb source.

The growth of *D. viscosa* was influenced by both Pb and *Lewia* sp. While Pb decreased (14–21%) biomass production, the fungus favored ( $\sim 16\%$ ) such variable. *Lewia* sp. also caused a reduction in root elongation, but significantly stimulated ( $\leq 50\%$ ) its weight-to-length ratio. This particular plant–fungus pair significantly improved (2.2–3.4 times) Pb phytostabilization, achieving up to  $5985 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  in dry roots and high BCF values ( $>22$ ).

To our knowledge, this is the first study reporting that a saprophytic fungus, such as *Lewia* sp., significantly improves the efficiency of Pb phytostabilization by *D. viscosa* in a solid support polluted with soluble and insoluble forms of Pb. This is of great importance because *Lewia* sp. is a rhizospheric microorganism that can be easily grown and cultured, and could potentially be developed as an inoculum for enhancing the Pb phytostabilization process. However, although the data are promising, more research is still required to examine the long-term effects of *Lewia* sp. on *D. viscosa* growth in the field.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for its partial financial support of this research. C. Rojas-Loria also acknowledges the financial support from CONACyT (scholarship 12104).

## REFERENCES

- Adams P, De-Leij F, Lynch JM. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295–22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb Ecol.* 54(2):306–313.
- Arriagada C, Aranda E, Sampedro I, Garcia-Romera I, Ocampo JA. 2009. Interactions of *Trametes versicolor*, *Corioloopsis rigida* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on the copper tolerance of *Eucalyptus globulus*. *Chemosphere.* 77(2):273–278.
- Arriagada CA, Herrera MA, Ocampo JA. 2007. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* in soil contaminated with heavy metals. *J Environ Manage.* 84(1):93–99.
- Audet P, Charest C. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environ Pollut.* 147(1):231–237.
- Baker AJM. 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* 106(s1):93–111.
- Barkay T, Schaefer J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr Opin Microbiol.* 4(3):318–323.
- Bewley DJ. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9(7):1055–1066.



- Brunner I, Luster J, Günthardt-Goerg MS, Frey B. 2008. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. *Environ Pollut.* 152(3):559–568.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chieh CC, Clarkson TW. 2007. Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol.* 222(1):122–128.
- Camacho F, González V, Olivera A. 1992. Germinación y manejo en vivero del Chapulixtle (*Dodonea viscosa* (L.) Jacq.). In: *Memorias de la Reunión Científica Forestal y Agropecuaria*. Centro de Investigación de la Región del Centro, Campo Experimental Coyoacán, Mexico, D.F.
- Cao L, Jiang M, Zeng Z, Du A, Tan H, Liu Y. 2008. *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere.* 71(9):1769–1773.
- Deng H, Ye ZH, Wong MH. 2006. Lead and zinc accumulation and tolerance in populations of six wetland plants. *Environ Pollut.* 141(1):69–80.
- Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 111(1):3–49.
- Göhre V, Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta.* 223(6):1115–1122.
- Göthberg A, Greger M, Holm K, Bengtsson BE. 2004. Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium, and lead in water spinach. *J Environ Qual.* 33(4):1247–1255.
- Ho WM, Ang LH, Lee DK. 2008. Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings. *J Environ Sci.* 20(11):1341–1347.
- Jiang M, Cao L, Zhang R. 2008. Effects of *Acacia* (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn)-associated fungi on mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) growth in Cd- and Ni-contaminated soils. *Lett Appl Microbiol.* 47(6):561–565.
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett.* 7(1):1–19.
- Kidd P, Barceló J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R, Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ Exp Bot.* 67(1):243–259.
- Kwasna H, Bateman GL, Ward E. 2008. Determining species diversity of microfungus communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Appl Soil Ecol.* 40(1):44–56.
- Kwasna H, Kosiak B. 2003. *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycol Res.* 107(3):371–376.
- Kwasna H, Ward E, Kosiak B. 2006. *Lewia ordeicola* sp. nov. from barley grain. *Mycologia.* 98(4):662–668.
- Lebeau T, Braud A, Jézéquel K. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ Pollut.* 153(3):497–522.
- Liley PE, Thomson GH, Friend DG, Daubert TE, Buck E. 1997. Physical and chemical data. In: Perry RH, Green DW, Maloney JO, eds. *Perry's Chemical Engineers Handbook*, 7th edn. New York: McGraw-Hill. p. 2-1–2-204.
- Liu JG, Li KQ, Xu JK, Zhang ZJ, Ma TB, Lu XL, Yang JC, Zhu, QS, 2003. Lead toxicity, uptake, and translocation in different rice cultivars. *Plant Sci.* 165(4):793–802.
- Lynch JM, Moffat AJ. 2005. Bioremediation—prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann Appl Biol.* 146(2):217–221.
- Maldonado-Magaña A, Favela-Torres E, Rivera-Cabrera F, Volke-Sepulveda T. 2010. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant Soil.* 339(1–2):377–389.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant Soil.* 232(1–2):207–214.

- Mench M, Schwitzguébel JP, 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. *Environ Sci Pollut Res.* 16(7):876–900.
- Mertens J, Van Nevel L, De Schrijver A, Piesschaert F, Oosterbaan A, Tack FMG, Verheyen K. 2007. Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environ Pollut.* 149(2):173–181.
- Müller CB, Krauss J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Curr Opin Plant Biol.* 8(4):450–456.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1–2004 (Official Mexican Standard). Published in the “Diario Oficial de la Federación” (DOF) on March 2, 2007.
- Seregin IV, Ivanov VB. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol.* 48(4):523–544.
- Simmons EG. 2002. *Alternaria* themes and variations. *Lewia/Alternaria* revisited. *Mycotaxon.* 83(1):127–145.
- Thomas SE, Crozier J, Aime MC, Evans HC, Holmes KA. 2008. Molecular characterisation of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycol Res.* 112(7):852–860.
- Vieira BS, Barreto RW. 2005. *Lewia chlamidosporiformans* sp. nov. from *Euphorbia heterophylla*. *Mycotaxon.* 94(1):245–248.
- Vieira BS, Barreto RW. 2010. Liquid culture production of chlamydo spores of *Lewia chlamidosporiformans*, a mycoherbicide candidate for wild poinsettia. *Australas Plant Path.* 39(2):154–160.
- Yoon J, Cao XD, Zhou QX, Ma LQ. 2006. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ.* 368(2–3):456–464.
- Zafar S, Aqil F, Ahmad I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol.* 98(13):2557–2561.
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int.* 33(3):406–413.

# XXXIII Encuentro Nacional y II Congreso Internacional de la AMIDIQ



San José del Cabo, BCS, México. Del 01 al 04 de Mayo del 2012.

## “LA INGENIERÍA QUÍMICA Y LA SUSTENTABILIDAD”

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química, A.C. Otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

Rojas-Loria Cesar, Favela-Torres Ernesto, González-Márquez Humberto, Volke-Sepúlveda Tania.

*Por la presentación del trabajo titulado:*

*“ACUMULACIÓN DE PLOMO POR DODONAEA VISCOZA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
GLUTATION”*

Dr. Rubén González Núñez  
PRESIDENTE AMIDIQ

Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández  
VICE-PRESIDENTE AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia  
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

**AMIDIQ**

Academia Mexicana de Investigación y  
Docencia en Ingeniería Química, A.C.



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Otorga la presente

# Constancia

César Cuahutémoc Rojas Loria, Humberto  
González Márquez, Ernesto Favela Torres, Tania  
Volke Sepúlveda

Por la presentación **Oral** del trabajo " Tolerancia y acumulación  
de plomo por *Dodonaea viscosa* "

En el

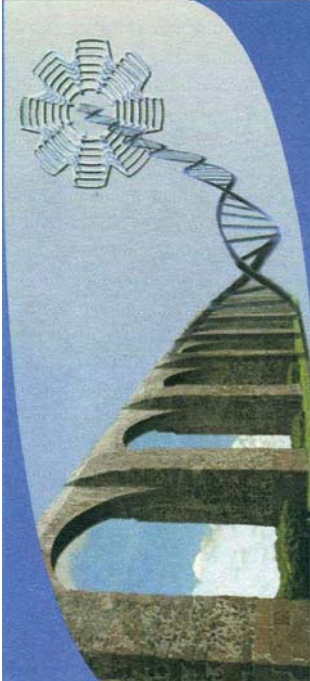
**XIV** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

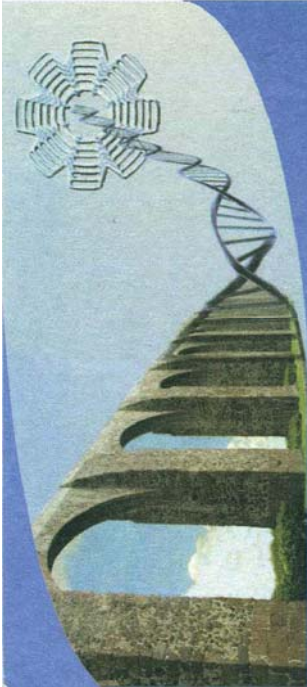
Juriquilla, Querétaro, 19 al 24 de Junio, 2011

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Presidente de la SMBB

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda  
Presidente del Comité Organizador

Dr. Octavio Loera Corral  
Presidente del Comité Científico





Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Otorga la presente

# Constancia

César Cuahutémoc Rojas Loria, Leticia Buendía González,  
María del Rosario Peralta Pérez, Tania Volke Sepúlveda

Por la presentación del Cartel "Biosorción de plomo por biomasa del hongo *Lewia* sp."

En el

**XIV** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Juriquilla, Querétaro, 19 al 24 de Junio, 2011

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Presidente de la SMBB

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda  
Presidente del Comité Organizador

Dr. Octavio Loera Corral  
Presidente del Comité Científico



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Otorga la presente

# Constancia

Diana Tania Velazquez Osornio, Cesar Rojas  
Loria, Maria del Rosario Peralta Perez, Tania  
Volke Sepulveda

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFITOS PARA SU  
POTENCIAL USO EN FITORREMEDIACION DE  
SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO

En el

**XIV** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Juriquilla, Querétaro, 19 al 24 de Junio, 2011

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Presidente de la SMIBB

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda  
Presidente del Comité Organizador

Dr. Octavio Loera Corral  
Presidente del Comité Científico



Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería, A.C.

OIV-24

Otorga la presente

# CONSTANCIA

a

**César Rojas Loria, Daniel Lopez Pérez,  
Leticia Buendía González, Tania Volke Sepúlveda**

Por la presentación de su trabajo **SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA SU USO EN FITORREMEDIACIÓN** del área de Biotecnología Ambiental como Trabajo Libre en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y el VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras (SIPAL).



**Congreso Nacional**  
de Biotecnología y Bioingeniería



21 a 26 de junio, 2009 · Acapulco, Guerrero

Dr. María Luisa Villarreal  
Presidente de la SMBB

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Presidente del Comité Organizador

Dr. Maricarmen Quirasco Baruch  
Presidente del Comité Científico