

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
EN PLANTAS**

**Estudio del efecto de la acumulación de
 Pb^{2+} sobre la biosíntesis de
Fitoquelatinas y de Glutati3n en el
helecho acuático *Salvinia minima* Baker.**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias y
Biotecnología de Plantas

PRESENTA

Neyi Eloisa Estrella Gómez

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN A.C.**

Mérida, Yucatán, México 2008

A mis padres Francisco Estrella y Elena Gómez

A mi esposo José Luis Santiago

A mis hermanos Julio Cesar y Patricia

A mis sobrinos Julio Francisco y Ricardo Alexander

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y estuvo dirigido por el *Dr. Jorge M. Santamaría Fernández*.

La autora recibió una beca (No. 173394) para su formación doctoral por parte del *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT).

El trabajo experimental se financió a través del proyecto CONACYT Z-039, titulado "*Fitorremediación y bioadsorción para el uso sustentable del agua*"; así como también, por el proyecto CONACYT-UCMEXUS 2005; "*Characterization of genes expressed in response to lead in a Pb accumulator aquatic fern *Salvinia minima**".

AGRADECIMIENTOS

Sinceramente al *Dr Jorge M. Santamaría Fernández* por su confianza y apoyo para realizar el presente trabajo.

Además, a mi *comité tutorial* por el tiempo, correcciones y sugerencias realizadas para mejorar esta tesis.

Especialmente estoy muy agradecida con mis compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología Vegetal: *Francisco Espadas, Carlos Talavera, Yolanda Nava, Susana Cruz, Felipe Santamaría, David Uh, Fernando Contreras, Wendy Canal, Reyna Uc Can, Martha Comejo* por su apoyo, cariño y amistad invaluable.

A la *Dra. E. Olguin* del INECOL por la donación del material inicial de *S minima* en las primeras etapas de esta tesis.

Al *Dr. Norman Terry y Danika LeDuc* de la Universidad de California Berkley por la donación de estándares de fitoquelatinas 2,3 y 4.

Al Instituto Tecnológico de Mérida, laboratorio de instrumentación, *Dr Enrique Sauri Duch, Dr. Luis Cuevas, M. en C. José Manuel de los Santos, M. en C. Marilú González Martínez* por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Al CINVESTAV-Mérida, Laboratorio de Ecotoxicología Acuática: *Dr Omar Zapata Pérez, Dra María Teresa Pérez Núñez, Dr Daniel González Mendoza, Francisco, Verónica, Juan Luis, Mónica e Israel* por su colaboración, sugerencias, comentarios y amistad.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron los posibles efectos de la acumulación de plomo (Pb^{2+}) sobre la biosíntesis de fitoquelatinas (PC) y de glutatión (GSH) tanto en las hojas como en las raíces de *Salvinia minima*, ya que, se ha sugerido la participación de la ruta metabólica de azufre, como uno de los posibles mecanismos de desintoxicación de Pb^{2+} . Los estudios se basaron en: determinar la capacidad de acumulación de Pb^{2+} , la cuantificación del contenido de pigmentos clorofílicos, la identificación y la cuantificación de tioles (-SH) como PC y GSH; la realización de ensayos enzimáticos de fitoquelatina sintasa (PCS) y de glutatión sintetasa (GS); además, de los análisis en los cambios de expresión de los genes que codifican para estas enzimas. Los resultados confirmaron que el helecho acuático *Salvinia minima* al ser expuesto a $40 \mu M Pb(NO_3)_2$ durante un período de 120 h es capaz de capturar y acumular Pb^{2+} , encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tejidos los tejidos evaluados. El posible daño en la capacidad fotosintética de *S. minima* se evaluó indirectamente a través de la determinación de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y carotenoides totales (Ct) en hojas y en raíces. El análisis de tioles permitió la identificación y cuantificación de fitoquelatinas PC2, PC3 y PC4 en los tejidos expuestos a Pb^{2+} demostrando que existen cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en la producción de estos polímeros en relación con las plantas control (sin exposición a Pb^{2+}). Los ensayos de la actividad enzimática de fitoquelatina sintasa (PCS) mostraron que la acumulación de Pb^{2+} , modifica la actividad de esta enzima, tanto en las hojas como en las raíces. Posteriormente, el aislamiento de un fragmento de 397pb del gen de fitoquelatina sintasa (*SmPCS*) permitió analizar los posibles cambios en los niveles de expresión de este gen en los tejidos de *S. minima*. El estudio de la relación entre la acumulación de Pb^{2+} , la actividad

enzimática de PCS y la producción de PC en raíces, mostró que la actividad de la PCS y la producción de PC, incrementa con el aumento en la concentración del metal en ese tejido; sin embargo, en las hojas se encontró que la asociación entre estas variables, sugiere que la producción de PC puede ser limitada. Los análisis realizados al tiol glutatión (GSH) mostraron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en la concentración del tiol en ambos tejidos de la planta expuestos a Pb^{2+} , en relación con las plantas control. La actividad enzimática de la glutatión sintetasa (GS) se vió afectada en ambos tejidos por la presencia de Pb^{2+} . El aislamiento de un fragmento de 478 pb del gen que codifica para la enzima glutatión sintetasa (*SmGS*) permitió analizar los cambios de expresión de este gen en tejidos de *S. minima*. El estudio de la asociación relación entre la acumulación de Pb^{2+} , la actividad enzimática de GS y la producción de GSH, sugiere que la participación de GSH no esta directamente asociada con la acumulación de Pb^{2+} . En conclusión, la acumulación de Pb^{2+} en las raíces y hojas de *Salvinia minima* induce una serie de respuestas fisiológicas que implican la participación de tioles involucrados en el metabolismo de azufre como PC y GSH, ya sea de manera directa al modificar su concentración, o bien, afectando de forma indirecta las actividades enzimáticas y los cambios de expresión de los genes que codifican para las enzimas involucradas en su síntesis.

Abstract

The present study examined the possible effects of the accumulation of lead (Pb^{2+}) on the biosynthesis of phytochelatins (PC) and glutathione (GSH) in leaves and roots of *Salvinia minima*, as it has been suggested the metabolic pathway of sulphur as one of the possible mechanisms of detoxification Pb^{2+} . The studies were based on determining the Pb^{2+} accumulation capacity, the quantification of pigments content, identification and quantification of thiols (-SH) such as PC and GSH; phytochelatin synthase (PCS) and glutathione synthetase (GS) enzyme activities, as well as analyzing the changes in the expression of genes coding for these enzymes. The results confirmed that the aquatic fern *Salvinia minima* exposed to $40\mu M Pb(NO_3)_2$ for a period of 120 h is able to capture and accumulate Pb^{2+} , preferably in their roots. We indirectly evaluated the possible damage of lead on the photosynthetic capacity of *S. minima* through the determination of chlorophyll a (Ca) chlorophyll b (Cb), and total carotenoids (Ct) in leaves and roots. The analysis of thiols allowed the identification and quantification of phytochelatins PC2, PC3 and PC4 in the tissues exposed to Pb^{2+} . We found a higher content of PC4 in the Pb exposed tissues respect to the control ones. The accumulation of Pb^{2+} modifies the activity of PCS, both in leaves and roots. Subsequently the isolation of a fragment of 397pb gene phytochelatin synthase (*SmPCS*) allowed the analysis of changes in levels of gene expression in leaves and roots. The study of the relationship between the variables accumulation of Pb^{2+} , the enzyme activity of PCS and PC production in roots, suggests that the enzyme activity and production of PCS increases with the increase in the concentration of metal in that tissue. However, in the case of leaves it was found a lower association between these variables, suggesting that the production of PC may be limited. Regarding glutathione (GSH) statistically

significant changes ($p < 0.05$) in the concentration of GSH were found in the leaves and roots of plants exposed to Pb^{2+} respect with the control plants. The enzyme activity of glutathione synthetase (GS) was modified in both tissues by the presence of Pb^{2+} . The isolation of a fragment of 478bp of the gene coding for the enzyme glutathione synthetase (*SmGS*) allowed the analysis of changes in expression of this gene in tissues of *S. minima*. The study of the association between the accumulation of Pb^{2+} , the enzyme activity of GS and the production of GSH, suggests that the participation of GSH is not directly related to the accumulation of Pb^{2+} . In summary, the accumulation of Pb^{2+} on roots and leaves of *Salvinia minima* induces a series of physiological responses that involve the participation of thiols involved in the metabolism of sulfur such as PC and GSH, either directly by changes in their concentration, or indirectly affecting both the enzyme activities and the expression of genes involved in their synthesis.

CONTENIDO

<i>Resumen</i>	I
<i>Abstract</i>	III
<i>Indice de figuras</i>	VIII
<i>Lista de abreviatura</i>	X
Introducción general.....	1
Capítulo 1.....	4
1.1. Antecedentes	4
1.1.1. <i>Salvinia minima</i>	4
1.1.2. Mecanismo de desintoxicación de metales pesados.....	10
1.1.3. El plomo	22
1.2. Hipótesis.....	27
1.3 Objetivo general:.....	28
1.3.1 Objetivos particulares:.....	28
1.4 Estrategia experimental	29
1.5 Referencias Bibliográficas.....	30
Capítulo 2.....	40
Acumulación de Pb en las raíces y hojas de <i>Salvinia minima</i>	
Baker.	40
2.1. Introducción.....	40
2.2. Materiales y métodos.....	41
2.2.1. Cultivo y mantenimiento de <i>Salvinia minima</i>	41
2.2.2. Cuantificación de pigmentos Clorofílicos.....	42
2.2.3. Cuantificación de Pb en raíces y hojas de <i>Salvinia minima</i>	42
2.2.4. Análisis estadísticos.....	43
2.3. Resultados	43
2.4. Discusión.....	47
2.5. Conclusiones.....	50
2.6. Referencias Bibliográficas.....	50
Capítulo 3.....	54
Efecto del contenido de Pb sobre la biosíntesis de Fitoquelatinas en <i>Salvinia minima</i> Baker.	54
3.1. Introducción.....	54
3.2. Materiales y métodos.....	56
3.2.1 Cuantificación de Fitoquelatinas.....	56

3.3.2. Determinación de proteínas.....	57
3.2.3. Ensayo de actividad de Fitoquelatina sintasa (PCS)....	58
3.2.4. Análisis transcripcional del gen que codifica para SmPCS	59
3.3.5. Análisis estadísticos.....	61
3.3. Resultados	62
3.2. Discusión	74
3.3 Conclusiones	77
3.4. Referencias bibliográficas	77
Capítulo 4.....	81
Efecto del la acumulación de Pb²⁺ en la biosíntesis de GSH en plantas de <i>Salvinia minima</i> Baker.....	81
4.1. Introducción.....	81
4.2. Metodología.....	82
4.2.1. Cuantificación de Glutación (GSH).....	82
4.3.2. Determinación de proteínas.....	84
4.2.3. Ensayo enzimático Glutación Sintetasa (GS).....	84
4.2.4. Análisis transcripcional del gen que codifica para SmGS	85
4.2.5. Análisis estadísticos.....	88
4.3. Resultados	88
4.4. Discusión	98
4.6. Conclusión	100
4.7. Referencias bibliográfica.....	101
Capítulo 5.....	104
5.1. Discusiones generales	104
5.2. Referencias bibliográficas	108
Capítulo 6.....	110
6.1. Conclusiones generales.....	110
Perspectivas	111
Anexo I	112
Anexo II	113

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la distribución de <i>S. minima</i> en la República Mexicana.....	5
Figura 2. <i>Salvinia minima</i> . Etapas de crecimiento en <i>S. minima</i> Baker.	7
Figura 3. Mecanismos de desintoxicación a metales pesados.....	13
Figura 4. Biosíntesis de Fitoquelatinas.....	19
Figura 5. Contaminación por Pb en la zona costera del Golfo de México.....	25
Figura 6. <i>S. minima</i> Baker durante la exposición a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.	44
Figura 7. Cuantificación del contenido de pigmentos en las hojas y raíces de <i>S. minima</i> Baker.....	45
Figura 8. Cuantificación del contenido de Pb^{2+} en hojas y en raíces de <i>S. minima</i> expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h.....	47
Figura 9. Cromatogramas de Fitoquelatina en <i>S. minima</i>	63
Figura 10. Cuadro de concentración de Fitoquelatinas PC2, PC3, PC4 y el total de Fitoquelatinas.....	65
Figura 11. Producción de Fitoquelatinas y actividad enzimática de Fitoquelatina Sintasa, en hojas de <i>S. minima</i> expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h.....	66
Figura 12. Producción de Fitoquelatinas y actividad enzimática de Fitoquelatina Sintasa en raíces de <i>S. minima</i> expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h.....	68
Figura 13. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) 18s y actina empleando ADNc de diferentes tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas y raíces de <i>S. minima</i>	71
Figura 14. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de PCS analizando varios tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas y raíces de <i>S. minima</i>	71
Figura 15. Alineamiento de la secuencia del fragmento amplificado y árbol filogenético.....	72
Figura 16. Análisis de correlación entre: la concentración endógena de Pb^{2+} y la actividad de Fitoquelatina Sintasa en hojas y en raíces de <i>S. minima</i> , la concentración de fitoquelatinas en hojas y en raíces de <i>S. minima</i> , la actividad de Fitoquelatina Sintasa y la acumulación de Fitoquelatinas.....	73
Figura 17. Alineamiento de secuencias de nucleótidos para el diseño de cebadores de GS.....	87
Figura 18. Producción de Glutatión y actividad enzimática de Glutatión Sintetasa, en hojas de <i>S. minima</i> expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h.....	90

Figura 19. Producción de glutatión y actividad enzimática de Glutatión Sintetasa en raíces de <i>S. minima</i> expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h.	91
Figura 20. Alineamiento y árbol filogenético de la secuencia del fragmento amplificado.	93
Figura 21. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de GS analizando varios tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas y raíces de <i>S. minima</i>	95
Figura 22. Análisis de correlación entre: la concentración endógena de Pb^{2+} y la actividad de Glutatión Sintetasa en hojas y raíces de <i>S. minima</i> ; la concentración de Glutatión en hojas y raíces de <i>S. minima</i> ; la actividad de Glutatión Sintetasa y la acumulación de Glutatión.	97
Figura 23. Modelo propuesto del mecanismo de respuesta a Pb^{+2} en raíces y hojas de <i>S. minima</i>	107

Listado de abreviaturas

μL	Microlitros
μM	Micromolar
pmol	Picomoles
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
ADN_{C}	Cadena sencilla Ácido desoxirribonucleico
Al^{3+}	Aluminio
ARN	Ácido ribonucleico
As^{5+}	Arsenico
AtGS	Gen de gluation sintetasa de <i>A. thaliana</i>
Au^{1+}	Oro
BCF	Factor de bioconcentración
Bs^{3+}	Bismuto
<i>Ca</i>	Clorofila <i>a</i>
<i>Cb</i>	Clorofila <i>b</i>
Cd^{2+}	Cadmio
Cr^{6+}	Cromo
<i>Ct</i>	Carotenoides Totales
CTAB	Cetyltrimethylammnium bromide(bromuro de cetilmetilamonio
Cu^{2+}	Cobre
EGTA	Etilenglicol
<i>g</i>	Gravedades
<i>g</i>	Gramos
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación
<i>h</i>	Horas
Hg^{2+}	Mercurio
hGS	Homoglutación sintetasa
HNO_3	Ácido nítrico
LiCl	Cloruro de litio
<i>mg</i>	miligramos
MgCl_2	Cloruro de magnesio
<i>mL</i>	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio

nm	nanometros
nmol	Nanomoles
Pb(NO ₃) ₂	Nitrato de plomo
Pb ²⁺	Plomo
PC	Fitoquelatinas
PCS	Fitoquelatina sintasa
PM	Peso molecular
Sb ³⁺	Antimonio
Se ⁴⁺	Selenio
-sH	Grupo tiol
SmGS	Gen glutatión sintetasa de <i>S.minima</i>
SmPCS	Gen fitoquelatina sintasa de <i>S.minima</i>
TCA	Ácido tricloroaceético
UV	Ultravioleta
v/v	vólumen /volumen
Zn ²⁺	Zinc
NI	Tiol no identificado

Introducción general

Las plantas crecen y sobreviven en ambientes con fluctuaciones de micronutrientes esenciales; además, son capaces de mantener la homeostasis de los mismos, ya sea censando la deficiencia o controlando los límites tóxicos de minerales esenciales o no esenciales. Una vez que han entrado los metales en la célula, empiezan a funcionar los mecanismos de tolerancia que permiten soportar altas concentraciones de metal, que facilitan el almacenamiento de los iones tóxicos en lugares no perjudiciales para las células. Esta capacidad ha sido estudiada en algunas especies capaces de sobrevivir en suelos o aguas con elevadas concentraciones de metales.

Estas especies utilizan mecanismos que les permiten acumular altas concentraciones de metales (0.1% de su peso seco) e instaurar una respuesta fisiológica, de tal forma que han recibido el nombre de hiperacumuladoras de metales (Baker, 1981).

Los metales absorbidos en la célula pueden ser eliminados del citoplasma por unión a los mismos ácidos que también están presentes en la pared, o mediante enlaces tiol a péptidos de bajo peso molecular ricos en el aminoácido cisteína. Por lo que, se ha sugerido que uno de los mecanismos que participan en la acumulación y desintoxicación de metales puede ser, la ruta de asimilación y metabolismo de azufre.

En 1985 se reportó la existencia de péptidos ricos en cisteína los cuales tienen gran afinidad por los metales (Grill, 1985), debido al grupo tiol (-SH) que poseen; dichos péptidos son derivados del metabolismo del azufre. Asimismo, las plantas expuestas a Pb^{2+} y otros metales

pesados altamente contaminantes como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} sintetizan cisteína y polipéptidos de bajo peso molecular llamados fitoquelatinas (Phytochelatin = PC) (Cobbet 2000).

La producción de PC se ha demostrado en cultivos de *Rauwolfia serpentina* a las que se añadió 1 mM de Pb^{2+} a su medio. Tal síntesis fue acompañada por la disminución del Glutatión (GSH) celular total (Grill *et al.*, 1987). Estos resultados demostraron que la síntesis de PC es parte del GSH, debido a la transpeptidación del dipéptido γ -glutamilcisteínil de GSH por acción enzimática (Chen *et al.*, 1997).

El glutatión (GSH) es considerado la principal reserva de azufre y se ha considerado como el principal metabolito dentro del balance redox de las células. Además de su papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas, está implicado en la desintoxicación de xenobióticos, en la tolerancia a perturbaciones ambientales, que promueven estrés oxidativo, y en la protección frente a metales pesados. Así mismo, los compuestos derivados del metabolismo de GSH también han sido considerados como una respuesta a diferentes formas de estrés debido a que contienen residuos de cisteína. Particularmente, se ha demostrado en algunas especies que la exposición a cadmio (Cd^{2+}) involucra cambios en la concentración de GSH (zanahoria: Di Toppi *et al.*, 1999; tabaco: Vögeli-Lange y Wagner, 1996; Maíz: Tukendorf *et al.*, 1996; pino: Schützendübel *et al.*, 2001).

Las fitoquelatinas (PC), que son polímeros de glutatión, han sido reportadas como metabolitos capaces de regular la cantidad de iones metálicos en hongos, plantas y algas (Rauser, 1995; Zenk, 1996); llegando a ser consideradas como un mecanismo de desintoxicación celular. Haag-

Kerwer en 1999, observó que en *Brassica juncea* la acumulación de Cd^{2+} estuvo acompañada de una rápida inducción en la biosíntesis de fitoquelatinas. En algunas especies acuáticas, tales como *Hydrilla verticillata*, también se ha demostrado que la producción de las fitoquelatinas son consecuencia del estrés por altas concentraciones de Cadmio (Tripani, 1996).

Tanto el glutatión como las fitoquelatinas han sido documentados como una respuesta de desintoxicación celular, debido a que son capaces de quelar metales, entre ellos el Pb^{2+} , formando complejos que pueden ser conducidos, para su compartimentalización, a diferentes partes de la célula, tales como las vacuolas o cloroplastos (Vögel-lange *et al.*, 1990).

El helecho acuático flotante *Salvinia minima* ha sido considerado una especie hiperacumuladora de metales principalmente Pb^{2+} ; además, es capaz de sobrevivir a elevadas concentraciones de este metal (Olguín *et al.*, 2002, Hoffman *et al.*, 2004). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que pueden estar involucrados en la acumulación de Pb^{2+} . Considerando los antecedentes de este helecho acuático y con el objetivo de conocer los efectos de la acumulación de Pb^{2+} sobre dos de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de azufre y su posible participación en la acumulación y detoxificación de Pb^{2+} , se estudio la acumulación de Pb^{2+} , los cambios en la producción de PC y GSH, los efectos sobre la actividad enzimática fitoquelatina sintasa (PCS) y Glutatión sintetasa (GS), así como también, las modificaciones en los niveles de expresión de los genes, que codifican para estas enzimas, en dos de los tejidos de *Salvinia minima*.

Capítulo 1

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Salvinia minima*

Salvinia minima es un helecho acuático flotante distribuido ampliamente en todo el continente Americano, tanto en climas tropicales como subtropicales (Madeira *et al.*, 2003). Se ha reportado su presencia en Norteamérica: sureste de los Estados Unidos, en Centroamérica: desde México hasta Panamá, y en Suramérica: en Brasil, Bermudas, Uruguay y Argentina (Stolze, 1983).

En México, *S. minima* se localiza en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Yucatán, Campeche y Quintana Roo (Pérez, 2002) (Figura 1). Esta planta se encuentra clasificada como perteneciente a la Clase Filicopsida, Orden Hidropteridales, Familia Salviniaceae, Genero *Salvinia*, Especie *minima*, por el Institute Natural Resources Conservation Service.



Figura 1. Mapa de la distribución de *S. mínima* en la República Mexicana (Pérez, 2002).

S. minima es una planta acuática flotante, cada unidad esta formada por 2 hojas ovaladas que miden de 4–30 mm de diámetro y están unidas por rizomas delgados que tienden a ramificarse. Además, es inconfundible por sus hojas flotantes pequeñas que se encuentran enlazadas formando redes, tratando de cubrir la mayor superficie de agua. Por otra parte, los soros (conjunto de esporangios) se hallan sobre la hoja sumergida, completamente con un indusio (plaquitas circulares, amarillentas), que puede contener megaesporangios o microesporangios con 64 esporas o con una solo espора respectivamente (Figura 2).

Esta planta pertenece a una familia que esta conformada por alrededor de 11 especies. Estas plantas se caracterizan por su estructura vegetativa y su alto índice de reproducción (Davidse, 1995) presentando una índice elevado de biomasa. La mayoría de las especies de *Salvinia* tienen papilas (pequeñas prominencias) con tricomas que están unidos en sus apéndices, la unión se puede determinar generalmente porque las células terminales de los tricomas son relativamente gruesas y oscuras. Por otra parte, en *S. minima* estos tricomas se encuentran libres.

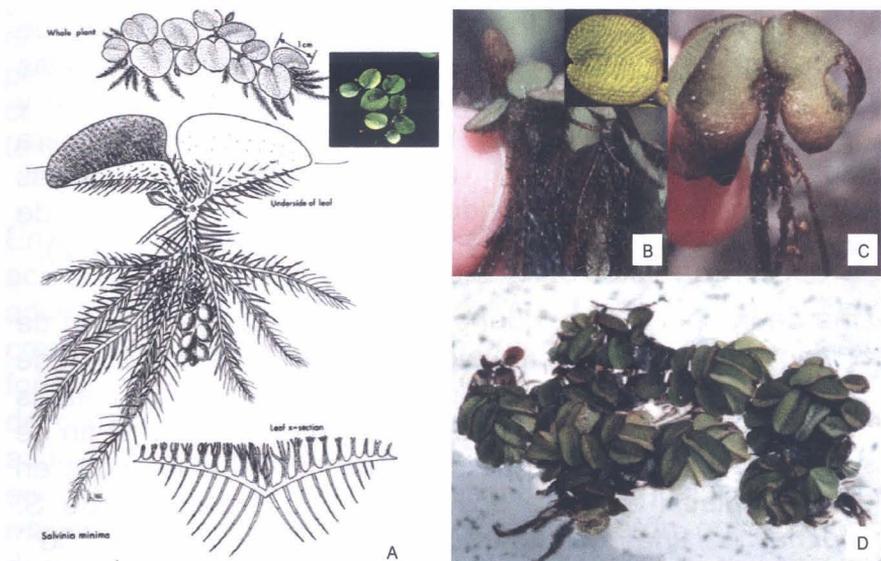


Figura 2. *Salvinia minima*. Etapas de crecimiento en *Salvinia minima*, las hojas de las plántulas juveniles tienen una tendencia mas redondeada y están recubiertas de tricomas, las cuales en la punta están divididas en 3 o 4 segmentos característicos de *S. minima* (A). Las hojas del adulto se alargan y ensanchan, luego se doblan verticalmente a lo largo del nervio central (B). Los esporo carpios están unidos en espirales dispuestos a lo largo del eje principal sumergidos por debajo de las hojas (C). El género *Salvinia* responde a altas condiciones de luz, temperatura y nutrientes con altas tasas de reproducción capaces de cubrir extensas superficies de agua (D) (Haynes y Jacono, 2000).

Las características particulares de *S. minima* son: su crecimiento en aguas dulces de baja profundidad estancadas o con flujo lento ricas en nutrientes, su velocidad de crecimiento, su alto índice de producción de biomasa, su capacidad para tolerar aguas contaminadas con grandes cantidades de materia orgánica (Banerjee y Sarkes, 1997), así como también, su capacidad para capturar y acumular metales pesados. Dichas características han sugerido su uso para procesos de tratamientos de aguas contaminadas (Olguín *et al.*, 2002).

Una de las primeras evidencias acerca de la capacidad de *S. minima* para tolerar metales, fue reportado por Outridge en 1991. El estudio consistió en la exposición de plantas adultas a diferentes concentraciones de Cd^{2+} , con el fin de comprobar la formación de péptidos con residuos ricos en grupos tioles (-SH). Se observó que la exposición de *S. minima* a una concentración de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd^{2+} involucraban cambios en la fisiología de la planta, así como también, un aumento en la concentración de tioles, disminución en los niveles de Magnesio e incremento en los niveles de Cobre, Zinc y Azufre. Además, las plantas expuesta a altas concentraciones de Cd^{2+} aumentaban un 35% los niveles de tioles con respecto a las plantas controles (Outridge, 1991).

En 1997, Gardner realizó estudios con *Salvinia minima* sobre los efectos fisiológicos provocados por el Aluminio (Al^{3+}) y la presencia de sustancias húmicas (materia orgánica de los suelos) como posible amortiguador de pH en los medios de crecimiento. Encontró que en la mayoría de los casos, el tratamiento con Al^{3+} , en ausencia de sustancias húmicas, era capaz de reducir el crecimiento y el índice de biomasa, de igual forma, reportó una disminución tanto en las concentraciones de clorofilas *a* y *b* como en el contenido total de carotenoides en *Salvinia*

minima. Además, reportó la acumulación de azúcares solubles, almidón y carbohidratos totales no estructurales (TNC) como consecuencia de la acumulación de Al^{3+} . Por el contrario, la presencia de las sustancias húmicas permitió reducir algunos de estos efectos, aún a concentraciones muy elevadas de Al^{3+} , evitando así su toxicidad (Gardner, 1997).

En el 2001, se evaluó la capacidad de *S. minima* para acumular Cromo (Cr^{6+}). En este estudio se demostró que la acumulación de Cr^{6+} reduce significativamente el crecimiento de *Salvinia* y la captura de CO_2 . De igual forma, los niveles de las clorofilas (*a* y *b*) y la concentración de carotenoides se vieron disminuidos. Mientras que, los azúcares solubles, almidón y carbohidratos totales no estructurales, fueron representativamente altos. La mayoría de estos efectos fisiológicos fueron observados durante la segunda semana de exposición a Cromo, concluyendo que el helecho posee una fuerte tolerancia a Cr^{6+} (Brent *et al.*, 2000).

En un estudio comparativo realizado por Oliveira en el 2001, entre las especies *Eichhornia crassipes* (Solms) (El jacinto del agua) y *Salvinia minima* se examinó la capacidad de absorción y acumulación de Cd^{2+} . Se encontró que la velocidad de absorción y la acumulación de Cd^{2+} fueron mayores para *S. minima* y, además, para ambas especies el índice de biomasa disminuyó relativamente hasta en un 25% debido a la sensibilidad al metal (Oliveira *et al.*, 2001).

Olguín (2002), evaluó la capacidad de *S. minima* para capturar y remover metales, tales como: Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cr^{6+} de soluciones acuosas, bajo condiciones controladas (pH=7 a 30°C). Bajo estas condiciones encontró que la

concentración del Cd^{2+} en el tejido de la planta completa era de 10.93 g/kg, con un factor de bioconcentración (BCF) de 2.718. Además, reportó que la captura de Pb^{2+} bajo las mismas condiciones fue de 9,78 g/kg y su BCF de 3.304. Por otra parte, la capacidad de remoción de *S. minima* para el Cd^{2+} y Pb^{2+} fue de 82,59% y 97,44% respectivamente; sin embargo, el porcentaje de remoción de Cr^{6+} no fue determinado (Olguín *et al.*, 2002). En 2003, Hoffmann analizó el comportamiento de *S. minima* ante la exposición a As^{5+} y Pb^{2+} . En este estudio se reportó nuevamente que *S. minima* tiene la capacidad para remover y acumular Pb^{2+} en tejidos, no obstante, la acumulación de arsénico en este helecho acuático se vio limitada (Hoffmann *et al.*, 2003).

En base a lo anterior, *Salvinia minima* es considerada una candidata para ser usada en el área de la fitorremediación de metales pesados, en especial en aguas contaminadas con plomo (Pb^{2+}). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales, este helecho acuático acumula y tolera metales pesados; de igual forma, se carece de información sobre la distribución del metal en diferentes tejidos, de tal manera que permita diferenciar entre adsorción y absorción de metales, así como también, hace falta conocer los metabolitos involucrados en la desintoxicación.

1.1.2. Mecanismo de desintoxicación de metales pesados.

El ambiente de los organismos vivos experimenta gradualmente cambios inducidos por las fuerzas selectivas naturales. A pesar de tales cambios, las plantas y los animales aprenden a adaptarse al ambiente a través de los mecanismos fundamentales de la evolución. La adaptación

es un proceso evolutivo por el cual, las plantas con la ayuda de respuestas genéticas específicas determinarán rasgos que conducen a la capacidad de existir bajo condiciones ambientales persistentes (Shaw y Joules, 1994).

La contaminación por metales pesados es uno de los ejemplos más significativos provocados por las actividades antropocéntricas. Esta contaminación puede ser una fuerza de selección que propicie cambios evolutivos rápidos en los organismos, manifestados como tolerancia a metales, lo cual ocurre en una escala de tiempo desde décadas hasta centenares de años (Shaw, 1994). Uno de los metales que más ha sido estudiado es el plomo (Pb^{2+}), que al igual que otros metales, es un producto indirecto de la extracción de cobre, el cual es considerado altamente tóxico, por lo que numerosas plantas han desarrollado tolerancia a éste metal.

Las plantas tienen mecanismos constitutivos (presente en la mayoría de los fenotipos) y adaptantes (presente solamente en tipos tolerantes) para hacer frente a la contaminación por metales pesados (Mehrag, 1994). Así, las plantas resistentes son cualquier especie que se adapta a las diferentes condiciones nocivas de los suelos o aguas contaminados; mientras que los individuos tolerantes pueden crecer en ambientes con alta concentración de metales, dando como resultado organismos altamente competitivos. Este patrón parece ser una regla generalmente aplicable que indica que la tolerancia a metales pesados se desarrolla a través de un costo fisiológico (Linhart y Grant, 1996).

La tolerancia a los metales pesados generalmente se encuentra bajo un control importante de respuestas fisiológicas, que parece depender de la presencia de los

genes de baja expresión en poblaciones normales, que ante el agente selectivo aumentan su expresión (Macnair *et al.*, 1992; Macnair *et al.*, 2000).

Actualmente, se han descrito algunos mecanismos que pueden estar involucrados en la desintoxicación y tolerancia a metales pesados tales como Cu, Cd, Ni, Zn y Pb; aunque dichos mecanismos han sido estudiados de manera particular, no obstante, no cubren en su totalidad el funcionamiento completo de una planta.

Dentro de los mecanismos mejor estudiados se encuentran, por ejemplo, la asociación de metales con micorrizas, las uniones de metales a la pared celular, los exudados extracelulares (ácidos orgánicos), la disminución entre el intercambio de metales en la membrana plasmática, la presencia de proteínas de bajo peso molecular, para contrarrestar los daños del estrés por metales, y la biosíntesis de péptidos ricos en cisteína (Glutación, Fitoquelatinas) en el citosol, los cuales quelan el metal conduciéndolo a su compartimentalización en vacuolas y organelos, entre otros (Clemens *et al.*, 1999; Hall, 2002; Lasat, 2002) (Figura 3).

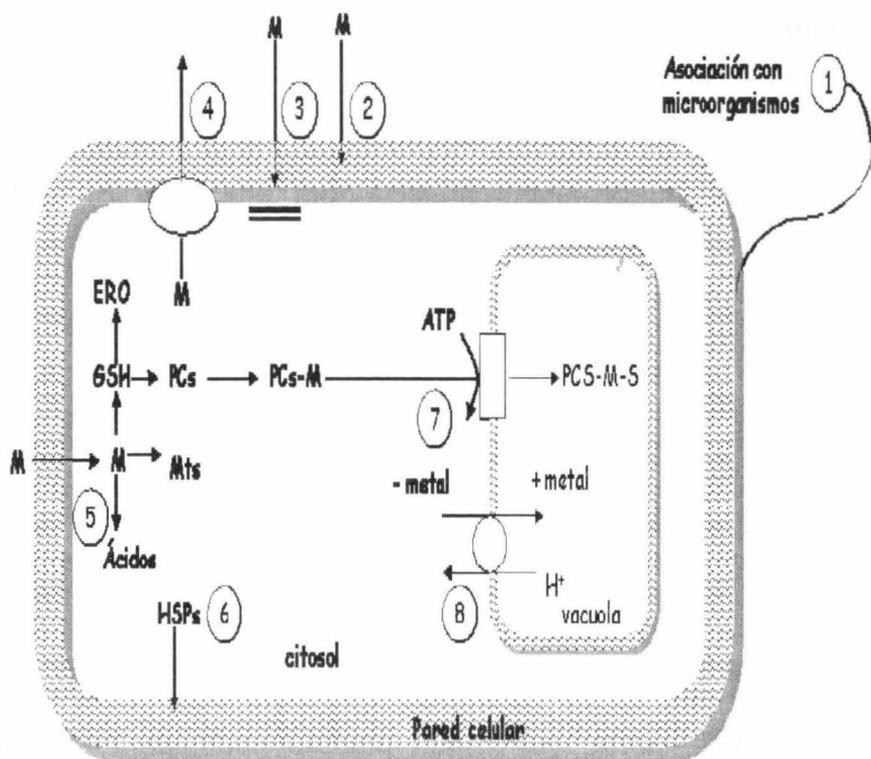


Figura 3. Mecanismos de desintoxicación a metales pesados. 1.- Asociación con microorganismos, 2.- Pared celular, 3.- Reducción de flujo a través de membrana plasmática, 4.- Aumento de flujo apoplástico hacia fuera de la célula, 5.- Respuestas en citosol, 6.- Reparación y protección de proteínas a membrana, 7.- Transportador de complejos fitoquelatina-metal a vacuola, 8.- Transporte y acumulación de metales a vacuola.

La simbiosis entre microorganismos y las raíces de las plantas incrementa la tolerancia a metales pesados, de tal forma que los microorganismos, tales como micorrizas y ectomicorriza restringen la entrada del metal a la planta huésped; en la mayoría de los casos de asociación, el hongo que forma parte de esta comunidad, es capaz de acumular el metal disminuyendo su concentración y

toxicidad hacia la planta huésped, tal como ha sido reportado para maíz (Weissenhorn *et al.*, 1995).

La pared celular de las raíces participa como una barrera física ante la selección de metales, aún cuando esta propiedad puede estar limitada. Sin embargo, Bringezu reportó que *Selene vularis* ssp *humilis*, es capaz de acumular un porcentaje significativo de metales pesados en la epidermis de la pared celular enlazados a proteínas y a silicatos (Bringezu *et al.*, 1999).

Existe otro proceso presente en las raíces, que consiste en la producción de exudados, los cuales tienen funciones importantes en la quelación de metales, reduciendo de una manera significativa la toxicidad del metal, tal es el caso del ácido oxálico que es exudado en respuesta al estrés por Al^{3+} , éste ácido forma un complejo no tóxico denominado "Al-oxalato", mismo que es acumulado en las hojas de las plantas (Ma *et al.*, 2001).

Por otra parte, en las plantas consideradas no hiperacumuladoras de Ni, se ha observado que las raíces producen exudados ricos en histidina y citrato capaces de quelar Ni, participando así como una estrategia de tolerancia a Ni (Salt y Baker, 2000).

La función de la membrana plasmática es rápidamente afectada en presencia de altas concentraciones de metales. El daño puede presentarse en la oxidación de los lípidos de membrana, en los grupos -SH de las proteínas de transporte, así como también, en la composición y fluido de la membrana o en la inhibición de las proteínas de transporte H^+ ATPasas.

Sin embargo, la disminución en la funcionalidad de proteínas de transporte de metales está considerada como un mecanismo de tolerancia, tal es el caso de la disminución en la actividad de la ATPasa en raíces de trigo al ser expuestas a Cd^{2+} (Fodor *et al.*, 1995).

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína y se encuentran presentes tanto en plantas como en bacterias. Entre sus funciones está controlar la homeostasis de Cu y Zn; recientemente, se han descrito a las metalotioneínas como agentes protectores contra altas concentraciones de Cadmio (Cd), Mercurio (Hg) y Arsénico (As) ya que poseen dominios ricos en cisteína, lo que les permite enlazar metales pesados (Robinson *et al.*, 1993).

Entre los mecanismos involucrados en la tolerancia a metales pesados, también podemos encontrar a las proteínas de choque térmico, que son abundantes en las plantas; dichas proteínas participan en el desarrollo de tejidos y en la adaptación a temperaturas elevadas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado su participación como una respuesta a un gran número de condiciones de estrés, incluyendo a metales pesados (Lewis *et al.*, 1999).

Las vacuolas constituyen uno de los principales mecanismos de detoxificación celular, debido a que en el interior de este organelo se lleva a cabo la compartimentalización de los metales, lo que permite reducir la concentración y los efectos tóxicos de los mismos. Se ha reportado que en algunas especies la presencia de metales, tales como Ni, Mo, Cd y Zn, dentro de las vacuolas, sugiere la presencia de un sistema de transportadores citosólicos o de membrana, relacionados con la tolerancia a estos metales (Hall, 2002).

Por otra parte, las rutas de asimilación y metabolismo de azufre han sido reportados como uno de los mecanismos más importantes de desintoxicación de metales pesados.

El azufre es capturado activamente por las células de la raíz en derivados de sulfito. El sulfito pasa a través de la epidermis de la raíz y de la corteza hasta llegar al xilema para ser traslocado hacia las hojas. En las hojas, el sulfito sufre una serie de reducciones hasta convertirse finalmente en sulfato (Wilfried, 1998). El sulfato es fijado en su forma reducida a aminoácidos como metionina y cisteína; esta última forma parte del tripéptido biológico más importante: el glutatión (GSH) (Kleppinger-Sparace *et al.*, 1990).

El Glutatión (GSH) es un tripéptido de bajo peso molecular que se encuentra prácticamente en todos los organismos. Se sintetiza en el citosol y en los cloroplastos; además, se exporta desde las hojas hacia frutas, semilla y raíces a través del floema (Leustek, 2000).

El GSH tiene como función principal ser la reserva principal de azufre y cisteína; además, participa como transportador de aminoácidos, así como también, en la formación de metabolitos y en el procesamiento e inactivación de especies reactivas de oxígeno, ya que es un componente importante en el balance redox de la célula (Mendoza *et al.*, 2001; Schützendübel y Polle, 2002). Su biosíntesis se lleva a cabo por la condensación entre γ -L-glutamil-L-cisteína y la L-glicina en presencia de Glutatión sintetasa (GS EC 6.3.2.3) con consumo de ATP.

La actividad enzimática de GS puede ser inhibida por la formación de GSSG (Glutatión oxidado) y por un aumento en la concentración de γ -L-glutamil-L-cisteína (Meister, 1995).

Actualmente se ha conseguido el aislamiento de 1650 pb en *Arabidopsis thaliana* que codifica para la enzima GS, la cual traduce para una proteína de 550 aminoácidos, aproximadamente, y que muestra dominios conservados ricos en glicina presentes en otras proteínas de GS de otros organismos eucariontes (Ullman *et al.*, 1996) como *Brassica juncea* L (Schäfer *et al.*, 1998) o *Xenopus laevis* (Habenicht *et al.*, 1993).

El glutatión es el precursor de las fitoquelatinas y es considerado un componente vital para la desintoxicación de los metales pesados (Grill, 1989; Xiang *et al.*, 2001). La participación de este metabolito fue evidenciada al incrementar sus niveles debido a la exposición a diferentes metales, en cultivos de células de tomate (Chen y Goldsborough, 1994), este comportamiento también fue observado en raíces de maíz y en cultivos celulares de tabaco (Rüegsegger y Brunold, 1993; Schneider y Bergmann, 1995).

Los efectos de la acumulación de metales sobre la regulación de expresión del gen de GS ha sido documentada en levaduras, donde la exposición a Cd^{2+} involucra cambios transcripcionales del gen (Su-Jung *et al.*, 2003).

Además, se ha encontrado que la síntesis transcripcional del gen del glutatión sintetasa en *A. thaliana* (*AtGS*), incrementa dos veces en presencia de cadmio, sugiriendo que el incrementó en la transcripción del gen *AtGS* proporciona una fuente mayor de Glutatión para la biosíntesis de las fitoquelatinas, lo cual está correlacionado con su tolerancia al metal (Harada, 2001).

Por el contrario, las plantas mutantes de *A. thaliana*, deficientes en GSH, son sensibles a Cd^{2+} (Howden *et al.*, 1995b).

En algunas leguminosas se ha reportado la presencia de otro tripéptido, denominado homoglutiación (hGSH), el cual puede reemplazar total o parcialmente la función del GSH (Matamoros *et al.*, 1999). Este péptido es sintetizado a partir de γ -L-glutamil-L-cisteína y β -alanina, específicamente por homoglutiación sintetasa (hGS) codificada por el gen hGS (Moran *et al.*, 2000).

La biosíntesis de Fitoquelatinas constituye una de las rutas metabólicas del azufre, donde se involucra la participación de las enzimas γ -L-glutamil-L-cisteína sintetasa (γ -ECS), glutatiación sintetasa (GS) y fitoquelatina sintasa (PCS), las cuales desempeñan papeles muy importantes en la resistencia a metales y/o metaloides pesados (Figura 5).

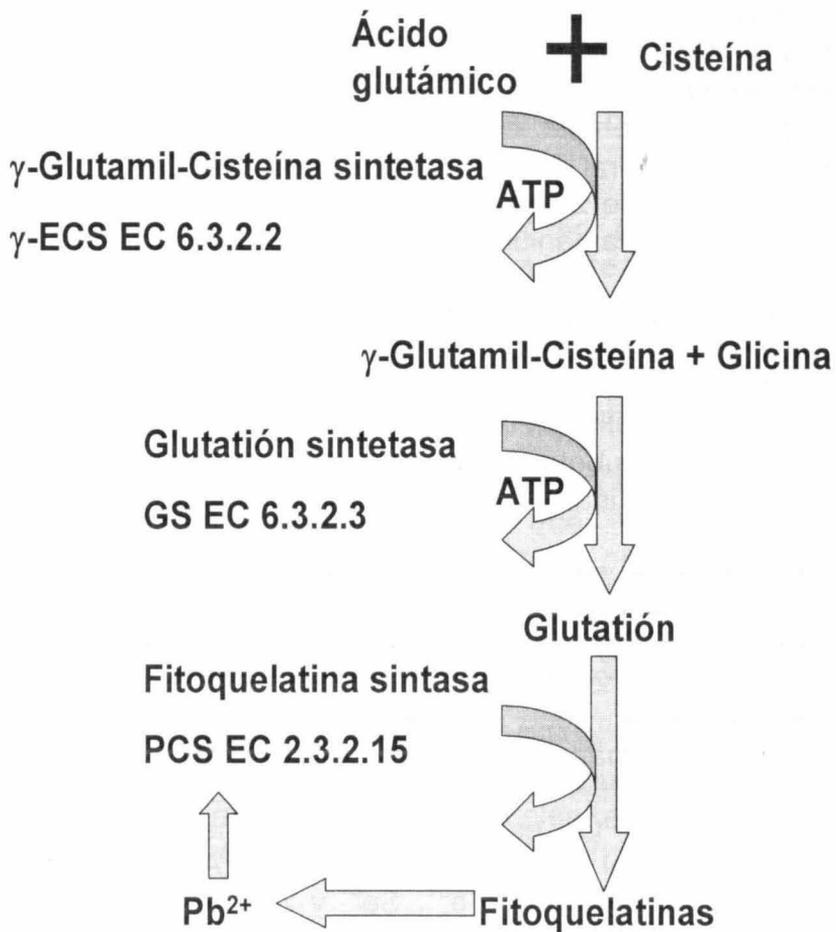


Figura 4. Biosíntesis de Fitoquelatinas (Rausser, 1990).

Las fitoquelatinas (PC) son péptidos ricos en cisteína derivados del glutatión, se sintetizan a partir de la transpeptidación del dipéptido γ -L-glutamil-L-cisteína (γ -EC) hacia otra molécula de GSH o PC, por la acción de la enzima fitoquelatina sintasa (PCS EC 2.3.2.15), utilizando como energía la ruptura del enlace entre el dímero γ -EC y la glicina (Chen *et al.*, 1997; Rea *et al.*, 2004). La estructura general de las PC es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$; donde n puede ser desde 2 hasta 11 residuos (Grill, 1985; Rauser, 1990; 1995; Vatamaniuk *et al.*, 2000).

En algunas plantas la glicina terminal de las PC, también puede ser sustituida por otros aminoácidos como serina (Hidroximetilfitoquelatinas, Klapheck *et al.*, 1994), ácido glutámico (Isofitoquelatinas, Meuwly *et al.*, 1995), glutamina (Kubota *et al.*, 2000) y β -alanina (Homofitoquelatinas, Klapheck *et al.*, 1988).

Recientemente, se ha reportado que en algunas plantas, la biosíntesis de fitoquelatinas representa un mecanismo de desintoxicación y de tolerancia a metales pesados (Zenk, 1996; Cobbett, 2000; 2002). Grill en 1985, identificó una proteína con actividad enzimática en un cultivo de células de *Silene cucubatis*, que sintetizaba polímeros a partir del glutatión. Además, se ha reportado que la actividad enzimática de PCS es influenciada por metales pesados, siendo el Cd^{2+} el más potente seguido por Ag^{1+} , Bs^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Au^{1+} , As^{5+} , Sb^{3+} , Se^{4+} y Zn^{2+} . (Kneer y Zenk, 1992; Mendoza *et al.*, 2001).

El incremento en la biosíntesis de fitoquelatinas ha sido reportado en raíces y en hojas de varias especies de plantas (Rauser *et al.*, 1990); sugiriendo una posible relación entre la acumulación y la tolerancia a Cd^{2+} (Obata y Umebayashi, 1993) con un incremento proporcional en los niveles las PC, tal como ha sido estudiado en *Zea mays*

(Rüegsegger y Brunold, 1993), *Brassica juncea* (Haagerwer et al., 1999), *Pisum sativum* (Rüegsegger y Brunold, 1990), *Arabidopsis thaliana* (Howden et al., 1995a,b), *Hydrilla verticillata* (Tripani et al., 1996) y otras plantas (Inohue et al., 1994). Estos resultados permitieron demostrar que la tolerancia a los metales pesados puede depender de la habilidad de las plantas para producir PC (Inouhe, 2005).

Por otra parte, la síntesis de PC no es exclusiva de plantas, ya que se ha encontrado presente en cultivos de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* expuestos a Pb y Cd, observándose la producción de fitoquelatinas del tipo PC3 hasta PC6, los cuales forman complejos estables con los metales evaluados (Scarano et al., 2002).

En años recientes se ha logrado la clonación y caracterización de los genes que codifican PCS. Originalmente se aisló de *A. thaliana*, *S. pombe* y *Triticum aestivum*, (nombrándolos *AtPCS1*, *SpPCS* y *TaPCS1*) y codifican polipéptidos de entre 50 y 55 kDa similares a lo reportado en otras especies en un 40 y 50 % (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999). Recientemente, se han reportado que la transcripción del gen de la fitoquelatina sintasa (PCS) puede incrementar después de la exposición a Cd^{2+} en plántulas de *A. thaliana* y de *T. aestivum* (Lee y Korban; 2002; Clemens et al., 1999).

1.1.3. El plomo

Los metales pesados son elementos con elevados pesos atómicos, superiores a 44,956 y una densidad superior a 5 gr/cm³, excluyendo a los grupos Alcalino y Alcalinotérreo. Aunque algunos son imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de los organismos, los denominados esenciales como cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, vanadio y estroncio, no obstante, en cantidades excesivas son perjudiciales e incluso letales para los seres vivos. Los metales pesados no esenciales comúnmente implicados en problemas de contaminación de las aguas subterráneas son: cromo, cadmio, mercurio, plomo, arsénico y antimonio (Kennish, 1992).

La acumulación de metales pesados en plantas es un fenómeno que obedece al uso indiscriminado de éstos en procesos industriales, destruyendo rápidamente la integridad del medio ambiente, contaminando los suelos y el agua con sustancias altamente tóxicas.

En las aguas superficiales, los metales pesados existen en forma de coloides, partículas y como fases disueltas; aunque, debido a su baja solubilidad estas últimas suelen presentar concentraciones muy bajas en forma iónica o complejos órgano metálicos. En las formas coloidales y partículas pueden encontrarse como hidróxidos, óxidos, silicatos y sulfuros; o adsorbidos en minerales del grupo de las arcillas, sílice y materia orgánica.

La solubilidad de los metales pesados en las aguas superficiales está controlada por diversos factores, tales como: el pH, el tipo de quelantes en los que se encuentran adsorbidos, el estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente redox del sistema (Connell *et al.*, 1984).

El plomo (PM 207.2) es uno de los principales metales empleados en varios procesos industriales. Este metal al ser no biodegradable persiste en el suelo, en el aire y en el agua; por lo que se almacena y puede permanecer ahí durante cientos de años, ocasionando un problema de salud pública.

En los humanos, el plomo puede ser ingerido, inhalado o absorbido por la piel produciendo diversos trastornos fisiológicos, incluyendo el desarrollo de hemáties, nefropatías, disfunción del sistema cardiovascular, daño en el aparato reproductor y, probablemente, el aspecto de mayor gravedad son las fallas en el desarrollo del sistema nervioso central (Sanín *et al.*, 1998).

La naturaleza de las manifestaciones de toxicidad depende no sólo de la magnitud de la exposición sino también de las características de la persona expuesta; la neurotoxicidad del plomo es más severa en el feto en desarrollo y en el niño en crecimiento, que para los adultos (Sanin *et al.*, 1998). De acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-EM-004-SSA1-1999) promulgada en junio de 1999, el límite permisible de Plomo para el agua potable es de 0.02 mg/L; sin embargo, se han reportado niveles mucho más altos en diversas zonas del país.

En la mayoría de las plantas, la captura de Pb se lleva a cabo a través de un sistema radicular y muy poco a través de las hojas. Esto implica que primeramente existe una acumulación en las raíces para posteriormente ser traslocado hacia la parte aérea de la planta.

Existen diversos factores que influyen en la capacidad para capturar plomo, entre los cuales podemos mencionar el pH, las partículas del suelo, la capacidad de intercambio de cationes con el área superficial de las raíces, los exudados

radicales, la pared celular y la asociación con hongos micorrízicos, que constituyen una barrera para la difusión del metal hacia otros tejidos vegetales.

La presencia de Pb en el interior celular puede modificar la función de muchas enzimas, afectando la nutrición mineral, el balance hídrico, la permeabilidad y la estructura química de la membrana. Además, es capaz de disminuir la tasa fotosintética, disminuyendo la síntesis de clorofila, transporte de electrones e inhibición de la actividad enzimática del ciclo de Calvin (Sharma y Dubey, 2005).

En humanos se sabe que los altos niveles de Pb, en la sangre de niños y de adultos, dan como resultado un cuadro severo de anemia, problemas de desarrollo óseo y malformaciones congénitas.

Actualmente, aún cuando no existen cifras oficiales que indique el grado de contaminación en los estados del país, se ha reportado a través de comunicados científicos un incremento significativo en las concentraciones de algunos metales pesados no esenciales (Hg, Pb, Cd y Cr) en los sedimentos, en algunos organismos y en cuerpos de agua de las zonas costeras del Golfo de México, incluyendo lagunas costeras y ríos de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche; este incremento es consecuencia de las diversas actividades humanas e industriales en la zona costera del Golfo de México.

Asimismo, los resultados revelaron que los estados que presentan mayor contaminación por Pb^{2+} son Veracruz (Laguna de Pueblo Viejo y Río Coatzacoalcos), Tabasco (Laguna de las Ilusiones) y en menor magnitud Campeche (Laguna de Términos) (Villanueva y Botello, 1992). (Figura 5).

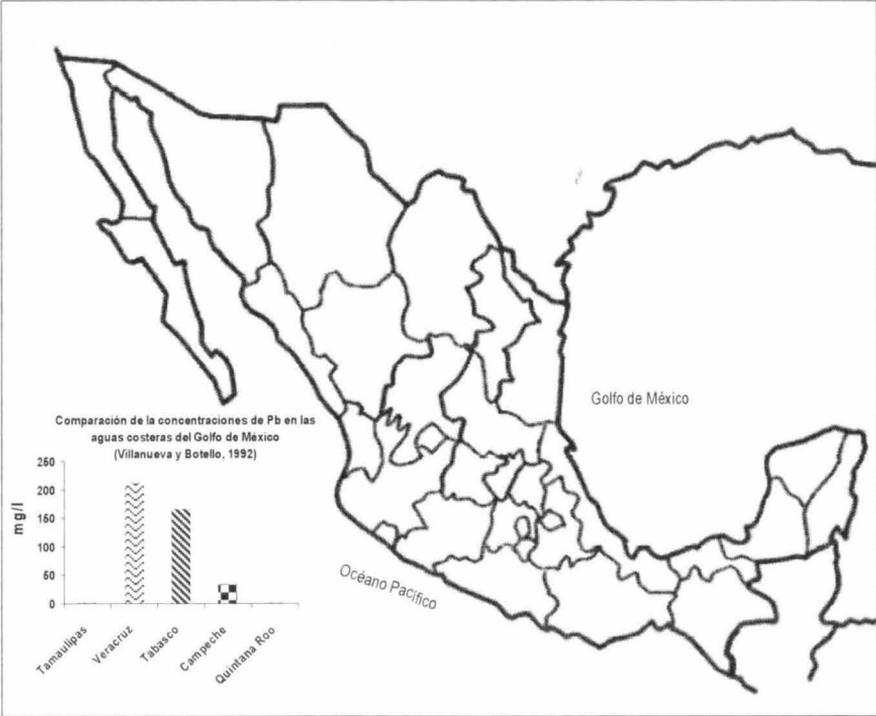


Figura 5. Contaminación por Pb en la zona costera del Golfo de México

En el Estado de Yucatán, el incremento en la actividad industrial ha generado un deterioro en los ecosistemas costeros. Por ejemplo, el crecimiento de las flotas pesqueras y navieras, incrementan el uso indiscriminado de pinturas, combustibles fósiles y otros productos derivados del petróleo, que contienen elevadas concentraciones de plomo, contribuyendo a una mayor concentración de metales. Este impacto se ha visto reflejado en la presencia de Pb tanto en sedimentos como en algunas especies marinas de *Holothuria floridana*, *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus* localizadas en las costas de la Península de Yucatán (Medina *et al.*, 2004).

1.2. Hipótesis

La biosíntesis de tioles como fitoquelatinas (PC) y glutatión (GSH) ha sido reportada como una respuesta fisiológica ante la exposición a Pb^{2+} , por lo que la presencia de Pb^{2+} en los tejidos del helecho acuático *Salvinia minima* posiblemente modifique la biosíntesis de PC y GSH, mostrando alteraciones en su producción, afectando la actividad enzimática o modificando la expresión de los genes que codifican para fitoquelatina sintasa (PCS) y glutatión sintetasa (GS).

1.3. Objetivo general:

Estudiar los efectos de la acumulación de Pb^{2+} sobre la biosíntesis de fitoquelatinas y glutatión en el helecho acuático *Salvinia minima* Baker.

1.3.1. Objetivos particulares:

1.3.1.1. Cuantificar la acumulación de Pb^{2+} tanto en raíces como en hojas de *Salvinia minima* expuestas y no expuestas a este metal.

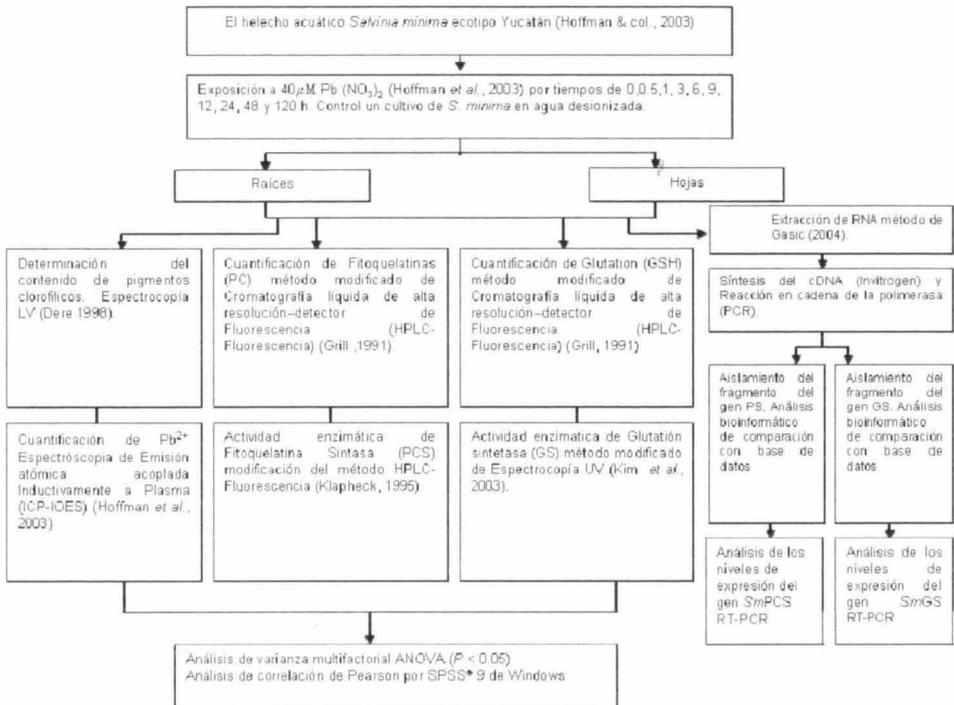
1.3.1.2. Identificar y Cuantificar la producción de fitoquelatinas (PC2, PC3 y PC4) y glutatión (GSH) en raíces y hojas de *Salvinia minima* expuestas y no expuestas a Pb^{2+} .

1.3.1.3. Evaluar los efectos del Pb^{2+} sobre las actividades enzimáticas de fitoquelatina sintasa (PCS) y glutatión sintetasa (GS) en raíces y hojas de *S. minima*.

1.3.1.4. Analizar los cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas PCS y GS en raíces y hojas de *Salvinia minima* expuestas y no expuestas a Pb^{2+} .

1.3.1.5. Determinar la correlación que existe entre la acumulación del plomo, con la producción de fitoquelatinas y glutatión, con los cambios en las actividades enzimáticas de las proteínas PCS y GS y con los cambios de expresión de los genes *SmPCS* y *SmGS* en raíces y hojas de *S. minima*

1.4 Estrategia experimental



1.5 Referencias Bibliográficas

- Baker A.J.M. (1981) Accumulators and excluders-strategies in the response of plant to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3: 643-654.
- Banerjee G. and Sarker S. (1997) The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb (II) pollution: a case study. *Bioprocess Engineering* 17: 295-300.
- Brent P., Couch J., Al-Hamdani S. (2000). Selected Physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany* 68: 313-319.
- Bringezu K., Lichtenberger O., Leopold I., Neumann D. (1999) Heavy metals tolerance of *Silene Vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 154: 536-546.
- Chen J. and Goldsbrough P. (1994) Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant physiology* 106: 233-239.
- Chen J., Zhou P. B., Goldsbrough P. (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum* 101: 165-172.
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.L. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthase from plants and yeast. *The European Molecular Biology Organization* 18: 3325-3333.
- Cobbett C. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxification. *Journal Plant Physiology* 123: 825-832.
- Cobbett C. and Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-82.

- Connell D.W. and Miller G.J. (1984) Chemistry and Ecotoxicology of Pollution. ed John Wiley & Sons, New York USA. 288-332.
- Davidse G., Sousa M., Knapp S. (1995) Flora Mesoamericana. Vol. 1: Psilotaceae a Salviniaceae (editores generales). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 470: 1-2.
- Dere S., Günes T., Sivaci R. (1998) Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. Turkish Journal of Botany 22: 13-17.
- Fodor E., ZSabo-Nagy A., Erdei L. (1995) The effects of Cadmium on the fluidity and H⁺ATPase activity in plasma membrane from sunflower and wheat roots. Journal Plant Physiology 147: 87-92.
- Gardner J. and Al-Hamdani S. (1997) Interactive effects of Aluminum and Humic Substances on *Salvinia*. Journal of Aquatic Plant Management 35: 30-34.
- Gasic K., Hernández A., Korban S. (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. Plant Molecular Biology Reporter 427a-437g.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). The Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 6838-6842.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1987) Phytochelatins, a class of heavy heavy-metal-binding peptides from plant, are functionally analogous to

- metallothioneines. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 439-443.
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1991) Phytochelatin. Methods in Enzymology 205: 333-341.
- Ha S-B, Smith A.P, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11: 1153-1163.
- Habenicht, A., Hille S. and Knochel W. (1993) Molecular cloning of the large subunit of glutathione synthetase from *Xenopus laevis* embryos. Biochimica et Biophysica Acta 1174: 295-298.
- Haag-kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C., Raush T. (1999) Cadmium exposure in *Brassica Juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. Journal of Experimental Botany 50:1827-1835.
- Hall J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53: 1-11.
- Harada E., Kusano T., Sano H. (2001) Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. Journal Plant Physiology 156: 272-276.
- Haynes R.R. and Jacono C.C. (2000) Status of *Salvinia* (Salviniaaceae) in Alabama. Journal Castanea 65: 225-227.
- Hoffman T., Kutter C., Santamaría J. (2004) Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. Engineering in Life Sciences 4: 61-65.
- Howden R., Andersen C.R., Goldsbrough P.B., Cobbett C.S. (1995b). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 107: 1067-1073.

- Schäfer H., Haag-Kerwer A., Rausch T. (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* 37: 87–97.
- Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S. (1995a) Cadmium-sensitive *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* 107: 1059-1066.
- Inouhe M. (2005) Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 65-78.
- Inouhe M., Ninimiya S., Tohyama H., Jobo M., Murayama T. (1994) Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono and dicotyledonous plant. *Journal of Plant Research* 107: 201-207.
- Kennish M.J. (1992) Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects. Eds. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida USA: 494.
- Kim S., Shin Y., Kim K., Park E., Sa J., Lim C. (2003) Regulation of the Gene Encoding Glutathione Synthetase from the Fission Yeast. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 326-331.
- Klapheck S. (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiologia Plantarum* 74: 727-732.
- Klapheck S., Fliegner W., Zimmer I. (1994) Hydroxymethyl-phytochelatins [$(\gamma$ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiology* 104: 1325-1332.
- Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. (1995) Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 107: 515-521.

- Kleppinger-Sparace K.F., Sparace S.A., Mudd J.B. (1990) Plant sulfolipids. In: Rennenberg H, Brunold C, DeKok LJ & Stulenl Eds. Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects SPB. Academic Publishing. The Hague, Netherlands 77–88.
- Kneer R. and Zenk H. (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 31: 2663-2667.
- Kubota H., Sato K., Yamada T., Maitani T. (2000) Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53: 239-245.
- Lasat M. (2002) Phytoextracction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- Lee S. and Korban S. (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* 215: 689-693.
- Leustek T., Martin M., Bick J., Davies J. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 141–165.
- Lewis S., Handy R.D., Cordi B., Billingshurt Z., Depledge M.H. (1999) Stress proteins (HSPs): method of detection and their use as environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8: 351-368.
- Linhart Y.B. and Grant M.C. (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237-277.
- Ma J.F., Ryan P.R., Delhaize E. (2001) Aluminium tolerance in plant and the complexing role of organic acid. *Trends in Plant Science* 6: 273-278.

- Macnair M.R., Cumbes Q.J., Meharg A.A. (1992) The genetics of arsenic tolerance in Yorkshire Fog, *Holcus lwatus* L. *Heredity* 69: 325-335.
- Macnair M.R., Tilstone G.H.R., Smith S.E. (2000) The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In: Terry, N. and G. Banueoles Eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers: London, U K 235-248.
- Madeira P., Jacono C., Tipping P., Van T., Center T. (2003) A genetic survey of *Salvinia minima* in the southern United States. *Aquatic Botany* 76: 127-139.
- Medina R., Zetina C., Comas M., Pat R. (2004) Concentración de Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos y en tres especies de Pepino de mar (clase holothuroidea) de las costas del estado de Yucatán, Méx. *Ingeniería* 8: 7-19.
- Meharg, A. (1994) Integrated tolerance mechanisms—constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell & Environment* 17: 989–993.
- Meister A. (1995) Glutathione. *Methods in Enzymology* 251: 3-13.
- Mendoza D., Avilés C., Hernández A., Loza H., Moreno R. (2001) Metabolismo de glutatión en microorganismos y plantas. *Boletín de Educación Bioquímica* 20: 213-221.
- Meuwly P., Thibault P., Schwan A.L., Rauser W.E. (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant Journal* 7: 391-400.
- NOM-EM-004-SSA1-1999. Salud ambiental. Criterios para la determinación de los niveles de concentración de plomo en la sangre. Acciones para proteger la salud de la población no expuesta ocupacionalmente. México: Comité Consultivo de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. SSA. *Diario Oficial de la Federación* 1999: 71-81.

- Obata H. and Umebayashi M. (1993) Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. In: Barrow NJ, Eds. Plant nutrition—from genetic engineering to field practice Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Amsterdam, Neth 4-791.
- Olguín E.J., Hernández E., Ramos I. (2002) The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for Removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnológica* 22: 121-131.
- Oliveira J.A., Cambraia J., Oliva M.A., Pereira C. (2001) Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de *Salvinia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 329-341.
- Outridge P.M., Rauser W.E., Hutchinson T.C. (1991) Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. *Oecologia* 88: 109-115.
- Pérez-García B., Mendoza A., Riba B. (2002) Pteridofitas: Familia Salviniaceae. *Flora de México* 6: 9–19.
- Rauser W.E. (1990) Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* 59: 61-86.
- Rauser W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides. *Plant physiology* 109: 1141-1149.
- Rauser W.E. and Meuwly P. (1995) Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiology* 109: 195-202.
- Rea P., Vatamaniuk O.K., Rigden D.J. (2004) Weeds, Works and More Papain's long-lost cousin, Phytochelatin Synthase. *Plant Physiology* 136: 2463-2474.

- Robinson N.J., Tommey A.M., Kusk C., Jackson P.J. (1993) Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal* 295: 1-10.
- Rüegsegger A. and Brunold C. (1993) Localization of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activity in Maize seedlings. *Plant Physiology* 101: 561-566.
- Rüegsegger A., Schmutz, D., Brunold C. (1990) Regulation of Glutathione Synthesis by Cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 94: 1579-1584.
- Salt D.E. and Baker A.J.M. (2000) Phytoremediation of metals. In: *Biotechnology* Vol. 11B Edition 2nd, H-J Rehm, G Reed Eds. Wiley-VCH. Weinheim, Germany 86-397.
- Sanín L.H., González-Cossío T., Romieu I., Hernández-Ávila M. (1998) Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Pública. México* 40: 359-368.
- Scarano G. and Moreli E. (2002) Characterization of Cadmium and Lead Phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biometals* 15: 145-151.
- Schneider S. and Bergmann L. (1995) Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco. *Botanic Acta* 108: 34-40.
- Schützendübel A. and Polle A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal Experimental Botany* 53: 1351-1365.
- Sharma P. and Shanker D.R. (2005) Lead toxicity in plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 17: 35-52.
- Shaw J. and Joules E. (1994) Adaptation to Metal-Contaminated Soils in Populations of the Moss, *Ceratodon purpureus*: Vegetative Growth and Reproductive Expression. *American Journal of Botany* 81: 791-797.

- Stolze R.G. (1983) *Equisetaceae*. in Ferns and Fern Allies of Guatemala, Part III: *Marsileaceae* , *Salviniaceae* and the Fern Allies. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Su-Jung K., Shin Y., H., Kyunghoon K., Eun-Hee P., Jae-Hoon S., Chang J.L. (2002) Regulation of the Gene Encoding Glutathione Synthetase from the Fission Yeast. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 326-331.
- Tripiani R.D., Rai U.N., Gupta M. Chandra P. (1996) Induction of Phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (if royle under Cadmium stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 505-512.
- Ullmann P., Gondet L., Potier S., Bach T.J. (1996) Cloning of *Arabidopsisthaliana* glutathione synthetase (*GSH2*) by functional complementation of a yeast *gsh2* mutant. *European Journal of Biochemistry* 236: 662–669.
- Vatamaniuk O. and Mari S. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31451-31459.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA. (1999) *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana*: isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 7110–7115.
- Villanueva F.S. y Botello V.A. (1992) Metales pesados en la zona costera del golfo de mexico y caribe mexicano: una revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 8: 47-61.
- Weissenhorn I., Leyval C., Belgy G., Berthelin J. (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture whit contaminated soil. *Mycorrhiza* 5: 245-251.

- Wilfried H.O.E. (1998) Sulfur metabolism in higher plants: potential for phytoremediation. *Biodegradation* 9: 311–318.
- Xiang C, Werner B.L, Christensen E.M, Oliver D.J. (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* 126: 564–574.
- Zenk M. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-review. *Gene* 179: 21-30.

Capítulo 2

Acumulación de Pb en las raíces y hojas de *Salvinia minima* Baker.

2.1. Introducción

El plomo es un elemento no esencial y potencialmente nocivo para los seres vivos. En las plantas, provoca la disminución de la fotosíntesis; asimismo, se le atribuye la reducción en el crecimiento, la biomasa y la transpiración; además, puede provocar lesiones cromosómicas, inhibición de la división celular y alteración de las enzimas ligadas al metabolismo del nitrógeno.

Existen aproximadamente 400 especies de plantas que son capaces de acumular y tolerar altas concentraciones de metales en sus tejidos (Baker y Brooks, 1989; Brooks, 1998), sin mostrar signos aparentes de toxicidad. Entre estas especies, podemos mencionar a los helechos, tal es el caso de *Athyrium yokoscense*, un helecho terrestre, capaz de acumular elevadas concentraciones de Pb^{2+} en hojas, pecíolo, rizomas y raíces (Honjo, 1984, Karachi *et al.*, 2005).

Salvinia minima es un helecho acuático que por su morfología y características particulares ha sido considerada como un modelo de estudio en la acumulación de metales pesados. Existen estudios donde se han evaluado los efectos de diferentes parámetros (como temperaturas y pH) sobre la capacidad de diferentes plantas acuáticas para capturar y remover diferentes metales como: Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cr^{6+} de soluciones acuosas, encontrando que *S. minima* fue una de las especies más sobresalientes en la tolerancia y remoción de estos

metales (Olguín *et al.*, 2002). Esto condujo a estudios acerca de la superficie de absorción y acumulación celular de Pb^{2+} en *S. minima*, que crece en lagunas artificiales influenciadas por fluctuaciones de nutrientes y condiciones ambientales (Olguín *et al.*, 2005). Por otra parte, en el 2003, Hoffmann analizó el comportamiento de *S. minima* ante la exposición a As^{5+} y Pb^{2+} , demostrando la capacidad del helecho para remover y acumular Pb^{2+} (Hoffmann *et al.*, 2003).

Con el objetivo de determinar la capacidad para acumular Pb^{2+} y su efecto sobre la concentración de pigmentos clorofílicos en los tejidos de *S. minima*, se analizaron dos estructuras morfológicas (raíces y hojas) de este helecho acuático. Para ello, las plantas de *S. minima* fueron expuestas a una sola concentración de Pb^{2+} durante diferentes tiempos de exposición, evaluando el contenido de Pb^{+2} presente en ambos tejidos utilizando un espectrómetro de emisión atómica acoplado inductivamente a Plasma.

2.2. Materiales y métodos.

2.2.1. Cultivo y mantenimiento de *Salvinia minima*.

El helecho acuático *Salvinia minima* ecotipo Yucatán se mantuvo durante un año en una solución hidropónica modificada de Hoagland (Hoffman *et al.*, 2003). Las condiciones ambientales fueron: temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 55 ± 3.6 % y un periodo de luz natural de 13 ± 2 h, aproximadamente, con un flujo fotónico que osciló entre 25 y $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Data logger spectrum 450). Bajo estas condiciones, se expusieron 10 g de biomasa de *S. minima* en 250 mL de una solución de $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Hoffman *et al.*, 2003) por un periodo de 120

h, empleando como control un cultivo de *S. minima* en agua desionizada bajo las mismas condiciones ambientales.

2.2.2. Cuantificación de pigmentos clorofilicos.

La determinación del contenido de clorofilas se realizó de acuerdo al método descrito por Dere (1998). Se pesó un gramo de tejido fresco y se trituró en un mortero con la ayuda de un pistilo, inmediatamente después, se le agregó 20 mL de acetona (Sigma) al 99.9% para extraer pigmentos. Posteriormente, con el fin de separar el tejido celular de los pigmentos, la solución de extracción se filtró usando un filtro Whatman #1, el filtrado fue recuperado y aforado a 50 mL con acetona. Por último, se leyeron las absorbancias a 662, 645 y 470 nm con una lámpara de luz visible usando un espectrómetro DU 650 (Beckman Coulter). La concentración de cada pigmento se reportó como $\text{mg}\cdot\text{g ps}^{-1}$ y se calculó con las siguientes fórmulas:

$$Ca = 11.75 (A662) - 2.350(A645)$$

$$Cb = 18.61 (A645) - 3.960 (A662)$$

$$Ct = 1000 (A470) - 2.270 (Ca) - 81.4 (Cb)/227$$

Donde Ca = Clorofila *a*, Cb = clorofila *b*, Ct = carotenoides totales y A662, A645 y A470 nm = lecturas de las absorbancias a esas longitudes de onda.

2.2.3. Cuantificación de Pb en raíces y hojas de *Salvinia minima*.

El contenido de Pb en *Salvinia minima* se determinó, usando 20 mg de tejido liofilizado (hoja o raíz) expuestos a una solución de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, empleando diferentes tiempos de exposición de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 120 h. El tejido liofilizado fue digerido con 200 μL de HNO_3 (Sigma) al 69.9% durante 4 horas a una temperatura de 80 °C

utilizando un baño de arena. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar toda la noche. Posteriormente, a todas las muestras se les agregaron 1.8 mL de agua desionizada y se agitaron con un vortex (Thermolyne) durante 5 min. Después, las muestras fueron centrifugadas a 15,700 g durante 5 min en una centrifuga Eppendorf 5415D. Por último, el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

La cuantificación de Pb^{2+} se realizó en un espectrómetro de emisión atómica acoplado inductivamente a Plasma (ICP-IOES 400 PERKIN ELMER). La detección de Pb^{2+} se llevó a cabo leyendo a una emisión a 220.353 nm usando HNO_3 al 1% como blanco y para la calibración del espectrómetro se emplearon estándares de 100, 10.0, 1.0 y 0.1 p.p.m de Pb^{2+} (Merck) (Hoffman *et al.*, 2003).

2.2.4. Análisis estadísticos

Todas las muestras analizadas pertenecen a 2 experimentos independientes con sus tres réplicas, mismas que fueron sometidas a análisis de varianza multifactorial ANOVA ($P < 0.05$)

2.3. Resultados

En esta primera etapa se evaluó la capacidad de *Salvinia minima* para acumular Pb^{2+} , tanto en raíces como en hojas, después de ser expuesta a una concentración de 40 μ M de $Pb(NO_3)_2$ a diferentes intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 120 h. Se observó que durante los tiempos muestreados las plántulas de *S. minima* no mostraron síntomas visibles de toxicidad, además, las hojas y las raíces se mantuvieron firmes y sin necrosis (Figura 6). Por otra parte, para evaluar indirectamente un posible daño de la capacidad

fotosintética de *S. minima* se realizó la determinación del contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales, tanto en hojas como en raíces. Los resultados obtenidos mostraron que las hojas de *S. minima* expuestas a plomo no presentaban cambios significativos en la concentración de *Ca*, *Cb*, mientras que el contenido de *Ct* mostró un ligero decremento. Sin embargo, en las raíces se observó una disminución de 1.7 veces en *Ca*, 1.8 veces en *Cb* y 1.54 veces en *Ct*, con respecto a las raíces de plántulas no expuestas a Pb^{2+} (Figura 7).

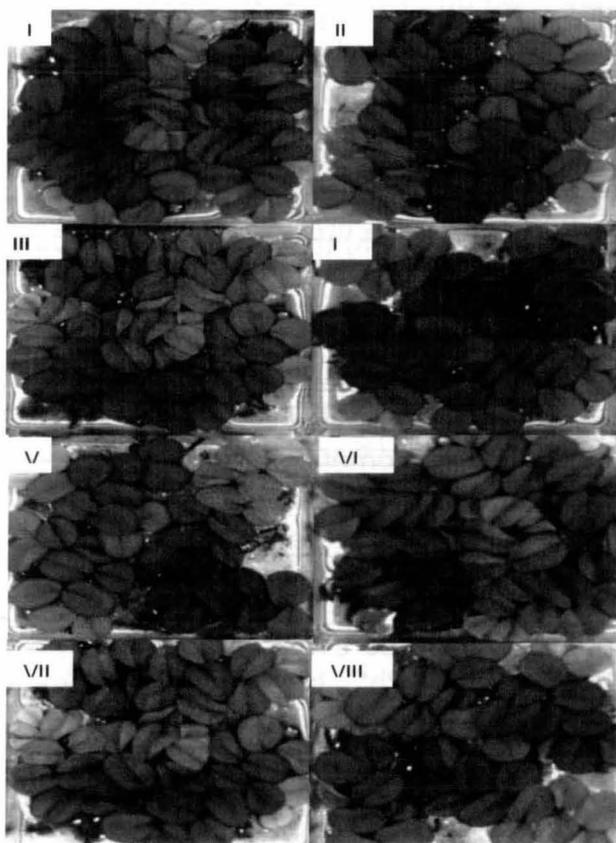


Figura 6. *Salvinia minima* Baker durante la exposición a 40 μM $Pb(NO_3)_2$. I=0 h, II=30min, III=3 h, IV=9 h, V=12 h, VI=24 h, VII=48 h y VIII=120 h.

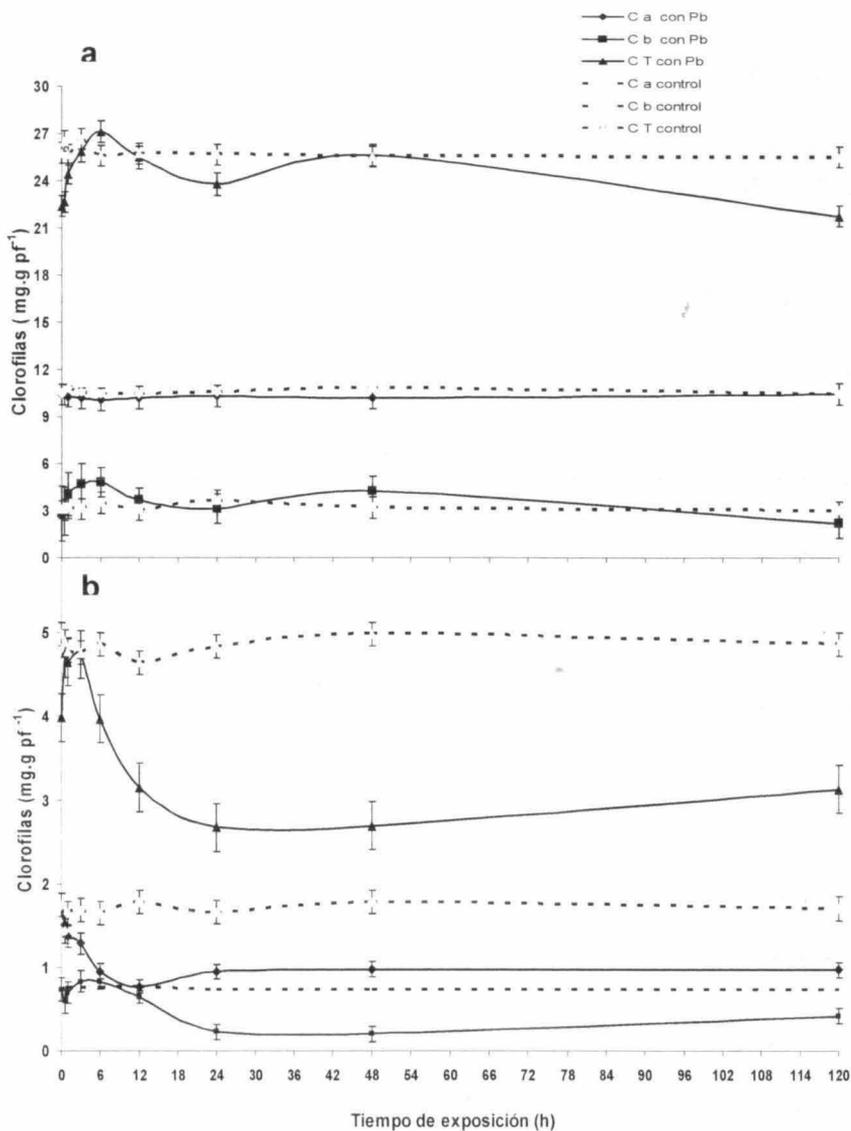


Figura 7 Cuantificación del contenido de pigmentos en las hojas (a) y raíces (b) de *S. minima* Baker. Ca=clorofila a, Cb= Clorofila b y Ct Clorofilas totales (B).

Con el fin de confirmar la presencia de plomo en los tejidos de *S. minima* se llevó a cabo la cuantificación del metal tanto en hojas como en raíces. Los resultados de este experimento mostraron que la concentración del metal, en ambos tejidos, incrementaba significativamente ($\rho < 0.05$) conforme trascurría el tiempo de exposición, asimismo, se observó que entre ambos tejidos existen diferencias significativas en la capacidad de acumulación del metal ($\rho < 0.05$), encontrándose que las raíces son los tejidos con mayor acumulación de Pb^{2+} (Figura 8).

El curso temporal de la captura de Pb^{2+} en los tejidos de *S. minima* evaluados, mostraron comportamientos diferentes (Figura 8). En las hojas, la acumulación Pb^{2+} fue detectada a las 9 h, alcanzando su punto máximo de $1.43 \text{ nmol Pb}^{2+}(\text{mg ps})^{-1}$ en 12 h, manteniendo esta concentración sin ningún cambio significativo ($\rho = 0.98$) hasta finalizar el experimento. Por otra parte, en las raíces de *S. minima* la acumulación del metal, reveló una tendencia de dos fases al ser expuestas a $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$.

La primera captura alcanzó un punto máximo de $1.34 \text{ nmol Pb}^{2+}(\text{mg ps})^{-1}$ durante las primeras 6 h, el cual se mantuvo sin cambios significativos ($\rho = 0.77$) hasta por 9 h. Posteriormente, la acumulación de Pb^{2+} se incrementó nuevamente, hasta alcanzar un segundo punto máximo a las 24 h con un valor máximo de $3.5 \text{ nmol Pb}^{2+}(\text{mg ps})^{-1}$, esta segunda meseta de la curva, se mantuvo sin diferencias significativas ($\rho = 0.41$) hasta las 120 h de exposición a Pb^{2+} .

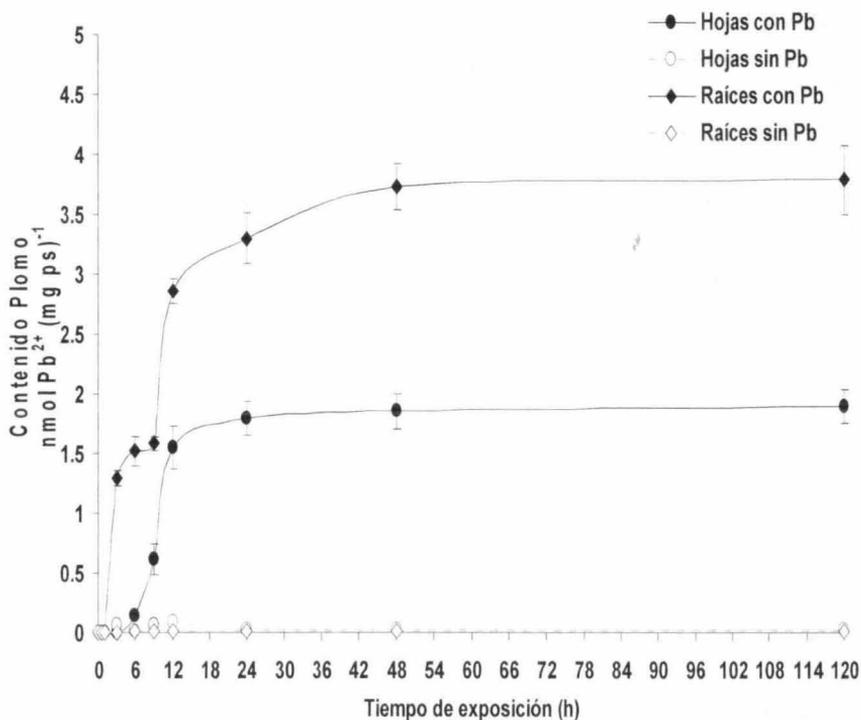


Figura 8. Cuantificación del contenido de Pb^{2+} en hojas y en raíces de *Salvinia minima* expuestas a $40 \mu M Pb(NO_3)_2$ durante 120 h.

2.4. Discusión

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de *S. minima* para acumular Pb^{2+} según lo reportado anteriormente (Olguín *et al.*, 2002; Hoffman *et al.*, 2004). Además, se encontró que en las raíces se acumula más metal a diferencia de las hojas, similar a lo reportado en plantas terrestres.

Los estudios relacionados con la captura de Pb^{2+} en plantas terrestres han demostrado que las raíces son más participativas en la toma significativa de Pb^{2+} disminuyendo su traslocación hacia la parte aérea (Lane y Martin, 1977; Kumar *et al.*, 1995).

Se ha reportado que la retención del Pb^{2+} en las raíces está basada en los enlaces que este metal forma con los sitios de intercambio iónico presentes en la pared celular, en donde se almacena en forma de $PbCO_2$ (Sharma y Dubey, 2005). Además, se ha sugerido que los ácidos galacturónico y glucurónico presentes en la pared celular restringen el transporte de este metal vía apoplástica, debido a que son capaces de formar un enlace iónico entre el Pb^{2+} y sus grupos carboxílicos (Rudakova *et al.*, 1988).

De igual forma, se ha demostrado que los metales pueden acumularse cerca de la endodermis, la cual actúa como barrera física en el movimiento de Pb^{2+} desde las raíces hacia las hojas, donde aparentemente las bandas de Caspari representan los principales factores de restricción del metal (Seregin e Ivanov, 1997), sugiriendo la existencia de otras posibles rutas de transporte de Pb^{2+} hacia el interior de la célula, por ejemplo, a través de canales de calcio presentes en la membrana plasmática, tal y como ha sido referido en las membranas plasmáticas de las células de raíz de trigo y maíz (Marshall *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994).

Estos antecedentes pueden explicar por qué las raíces de *S. minima* son capaces de acumular dos veces más Pb^{2+} que las hojas. Sin embargo, de acuerdo con los datos observados en el presente estudio, las raíces presentan dos fases de acumulación de Pb^{2+} ; lo cual implicaría la posibilidad de que *S. minima* este empleando dos mecanismos de captura de Pb^{2+} que podrían ser a través

de la vía apoplástica y por canales de calcio, como ha sido reportado para los elementos esenciales como Fe^{2+} y Cu^{1+} durante el estrés nutricional (Welch *et al.*, 1993).

Por otra parte, en las hojas, la presencia de Pb^{2+} fue detectada después de 9h de iniciado el experimento, confirmando que la captura de Pb^{2+} primero se lleva a cabo en las raíces y probablemente ocurra un desplazamiento del metal de éste tejido hacia las hojas a través de un mecanismo de transporte, como sucede en *S. auriculata* con la captura de Cd^{2+} (Oliveira *et al.*, 2001). No obstante, cabe la posibilidad de que el Pb^{2+} sea capturado directamente por las hojas, debido a que las hojas flotantes de *Salvinia minima* están en contacto directo con la solución de plomo.

La presencia de Pb^{2+} dentro de las células afecta la fisiología de una planta, la cual puede o no presentar síntomas de toxicidad tales como clorosis, necrosis o afectando su metabolismo (inhibición enzimática). Sin embargo, algunas especies al capturar el metal a través de las raíces puede ser traslocado a la parte aérea especialmente a las hojas, sin mostrar síntomas de toxicidad debido a algún tipo de resistencia interna o mecanismos de desintoxicación, en los cuales participan diversos metabolitos, tales como metalotioneinas o Fitoquelatinas (Sharma y Dubey, 2005), según se ha reportado para Fe, Mn y Cu (Turner y Marshall, 1971; Memon *et al.*, 1979), Ni y Co (Memon *et al.*, 1980a), Cd y Zn, (Memon *et al.*, 1980b) y Pb (Memon *et al.*, 2001).

Los aspectos fisiológicos mostraron un descenso significativo en los niveles de clorofilas en las raíces probablemente como un efecto de la acumulación del Pb^{2+} . Sin embargo, en las hojas de *S. minima* los niveles de clorofilas permanecieron sin cambios significativos

sugiriendo que al igual que otras especies tolerantes a Pb^{2+} *S. minima*, también cuenta con mecanismos de desintoxicación que reducen los niveles citosólicos del metal disminuyendo sus efectos tóxicos. La desintoxicación de Pb^{2+} en plantas acuáticas, es poco conocido, aunque se sabe que *Lemna minor L* expuesta a Pb^{2+} por una hora, desarrolla vacuolas que contiene altas concentraciones del metal. Asimismo, después de 6 y 12 h de tratamiento con Pb^{2+} el contenido del metal en las células de la pared se incrementa gradualmente (Samardakiewicz y Wozny, 2000).

2.5. Conclusiones

Salvinia minima es un helecho acuático capaz de acumular Pb^{2+} en sus tejidos sobre todo en la raíces sin mostrar signos visibles de toxicidad.

En este trabajo se observó que los niveles de pigmentos fotosintéticos en las hojas permanecieron sin cambios significativos, sugiriendo que al igual que otras especies tolerantes a Pb^{2+} *S. minima* también cuenta con mecanismos de desintoxicación que reducen los niveles citosólicos del metal disminuyendo sus efectos tóxicos.

2.6. Referencias Bibliográficas

- Baker A.J.M. and Brooks R.R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126.
- Brooks R. (1998) Geobotany and hyperaccumulators. In: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. Ed. Brooks, R. Cab International, Wallingford, U K. 54-94.

- Dere S., Günes T., Sivaci R. (1998) Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Turkish Journal of Botany* 22: 13-17.
- Hoffman T., Kutter C., Santamaría J. (2004) Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Engineering in Life Sciences* 4: 61-65.
- Honjo T., Hatta A., Taniguchi K. (1984) Characterization of heavy metals in indicator plants – studies on the accumulation of lead and tolerance of gregarious fern, *Athyrium yokoscense*, in the polluted areas from the lead tile of the ruins of Kanazawa Castle, now the campus of Kanazawa University. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* 32: 68–8.
- Huang J.W., Grunes D.L., Kochian L.V. (1994) Voltage dependent Ca^{2+} influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: characteristic of a putative Ca^{2+} channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 3473-3477.
- Kumar P.B., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science & Technology* 29: 1232-1238.
- Kamachi H., Komori I., Tamura H., Sawa Y., Karahara I., Honma Y., Wada N., Kawabata T., Matsuda K., Ikeno S., Noguchi M., Inoue H. (2005) Lead tolerance and accumulation in the gametophytes of the fern *Athyrium yokoscense*. *Journal of Plant Research* 118: 137–145.
- Lane S.D. and Martin S. (1977) A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus satinus*. *New Phytologist* 79: 281–286.
- Marshall J., Corzo A., Leigh R.A., Sanders D. (1994) Membrane potential-dependent calcium transport in

- right-side-out plasma membrana vesicles from *Zea mays* L. root. *The Plant Journal* 5: 683-694.
- Memon A.R., Aktoprakligül D., Zdemür A., Vertl A. (2001) Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants. *Turkish Journal of Botany* 25: 111-121.
- Memon A.R., Ito S., Yatazawa M. (1979) Absorption and accumulation of iron, manganese, and copper in plants in the temperate forest of central Japan. *Soil Science and Plant Nutrition* 25: 611-620.
- Memon A.R., Ito S., Yatazawa M. (1980a) Taxonomic characteristics in accumulating cobalt and nickel in temperate forest vegetation of central Japan. *Soil Science and Plant Nutrition* 26: 271-280.
- Memon A.R., Ito S., Yatazawa M. (1980b) Distribution of zinc and cadmium in temperate forest taxa of central Japan. *Soil Science and Plant Nutrition* 26: 281-290.
- Olguín E.J., Hernández E., Ramos I. (2002) The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for Removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnologica* 22: 121-131.
- Olguín E.J., Sánchez-Galván G., Pérez-Pérez T., Pérez-Orozco A. (2005) Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of lead in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32: 577-586.
- Oliveira J.A., Cambraia J., Oliva M.A., Pereira C. (2001) Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de *Salvinia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 329-341.
- Rudakova E.V., Karakis K.D., Sidorshina E.T. (1988) The role of plant cell walls in the uptake and accumulation

- of metal ions. *Journal Fiziologia biochimica Kum Rast* 20: 3-12.
- Samardakiewicz S. and Wozny A. (2000) The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant and Soil* 226: 107–111.
- Seregin I.V. and Ivanov V.B. (1997) Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Russian Journal Plant Physiology* 44: 791–796.
- Sharma P. and Dubey R. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- Turner R.G. and Marshall C. (1971) The accumulation of ^{65}Zn by root homogenates of zinc-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytologist* 70: 539-545.
- Welch R.M., Norvell W.A., Schaefer S.C., Shaff J.E., Kochian L.V. (1993) Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasma lemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190: 555-561.

Capítulo 3

Efecto del contenido de Pb sobre la biosíntesis de Fitoquelatinas en *Salvinia minima* Baker

Parte de estos resultados fueron enviados al Aquatic Toxicology para su publicación

3.1. Introducción

Las fitoquelatinas (PC) son péptidos ricos en cisteína sintetizados por la acción de la γ -glutamylcisteína dipeptidil transpeptidasa (Fitoquelatina sintasa=Phytochelatin Synthase = PCS) la cual emplea Glutación (GSH) como sustrato (Grill *et al.*, 1985). En las plantas, el gen que codifica para esta enzima es PCS. Se ha reportado que la estructura general de las PC es $(\gamma\text{-Glutamyl-Cys})_n\text{Gly}$ donde $n = 2$ a 11 residuos diméricos y que, además, juegan un rol importante en la homeostasis y detoxificación de altas concentraciones de iones metálicos en hongos, plantas y en algunos nemátodos (Rauser, 1995; Zenk, 1996).

La actividad enzimática de la PCS puede ser influenciada por la presencia de iones metálicos incluyendo cadmio (Cd^{2+}), zinc (Zn^{2+}), níquel (Ni^{2+}) y plomo (Pb^{2+}), entre otros. (Grill *et al.*, 1987). La presencia de estos metales incrementa la producción de PC, las cuales son capaces de quelarlos, formando complejos de alto peso molecular, los cuales pueden ser conducidos hacia diferentes órganos como las vacuolas, cloroplastos o tricomas reduciendo así los efectos tóxicos de los metales (Steffens, 1990; Ortiz *et al.*, 1992; De Knecht *et al.*, 1994; Vögel-lange *et al.*, 1996).

La acumulación de fitoquelatinas (PC), ha sido reportada como un posible mecanismo de desintoxicación en diferentes especies de plantas. Este mecanismo se ha correlacionado con la tolerancia a metales pesados, ya que se ha demostrado que el incremento en la producción de PC, en especies de plantas como *Hydrilla verticillata*, *Triticum aestivum* es consecuencia de la exposición a Cd^{2+} o a Cu^{1+} (Tripani *et al.*, 1996, Keltjens y Beusichem, 1998). En los últimos años, se ha logrado la clonación y caracterización de genes de codificación en PC synthases de *A. thaliana*, *S. pombe*, y *T. aestivum*, estos genes han sido designados *AtPCS1*, *SpPCS* y *TaPCS1*, respectivamente, y codifican para un polipéptido de 50 a 55 kD con una similitud de 40% a 50% entre sí (Rea *et al.*; 2004). Además, existen reportes donde la expresión transcripcional de *PCS* puede incrementar en plántulas de *A. thaliana* y en *T. aestivum* después de ser expuestas a Cd^{2+} (Clemens *et al.*, 1999; Lee y Korban, 2002).

Salvinia minima ha sido reportada como una especie acuática flotante con capacidad de remover y capturar Pb^{2+} . Olguín (2002) evaluó los efectos de diferentes temperaturas y pH sobre la capacidad de *S. minima* para acumular y remover Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cr^{4+} de soluciones acuosas. Estos autores encontraron que bajo condiciones controladas la capacidad de *S. minima* para remover Cd^{2+} fue de 82.59%, para Pb^{2+} 97.44% mientras que para Cr^{4+} el porcentaje no fue determinado. Por otra parte, Hoffman *et al.*, (2004) analizaron el comportamiento de *S. minima* después de ser expuesta a arsénico (As^{5+}) y plomo (Pb^{2+}), mostrando que la capacidad de *S. minima*, para acumular AsO_4^{3-} fue limitada, mientras que la capacidad para acumular Pb^{2+} fue muy alta; asimismo, reportaron que al exponer a *S. minima* a $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 15 días, el 50% de las plantas sobrevivieron estableciendo esta

concentración como la dosis letal media (Hoffmann *et al.*, 2004).

La particularidad de esta especie es su amplia distribución y su gran tolerancia a las aguas contaminadas por metales pesados y por grandes cantidades de materia orgánica (humus); además, su elevada tasa de crecimiento, su fácil mantenimiento y cosecha, la convierte en una especie candidata para ser empleada biotecnológicamente en el área de fitorremediación de aguas contaminadas con Pb^{2+} . Sin embargo, los mecanismos de desintoxicación presentes en este helecho aún no han sido elucidados; por lo tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar si la acumulación de Pb^{2+} en las raíces y hojas de *S. minima* es capaz de estimular la biosíntesis de fitoquelatinas.

3.2. Materiales y métodos.

3.2.1 Cuantificación de Fitoquelatinas.

La cuantificación de fitoquelatinas (PC) se determinó a través de un método modificado de Grill (1991) utilizando 250 mg de tejido liofilizado (raíces u hojas). Los tejidos fueron congelados con nitrógeno líquido y triturados en un mortero hasta pulverizarlos completamente. Después, se les agregó un buffer de extracción en una proporción de 1.5 mL por cada 250 mg de tejido. El buffer de extracción contenía una solución de 50 mM de tris [(hidroximetil)-aminometano] (Tris)(Biorad) pH=7.0, 100 mM de ácido ascórbico (SIGMA), 50 mM de Cloruro de sodio (NaCl, Merck) y 1 mM de DL-Ditiotreitol (DTE) (Sigma). Posteriormente, la mezcla fue homogenizada durante 1 minuto con la ayuda de un vortex (Thermolyne) y centrifugada a 15,700 g a 4 °C, durante 30 min. Se tomaron 350 μ L del sobrenadante y se le agregaron 100 μ L

de una solución que contenía 0.5 mM de ácido *N*-[2-hidroxyetil]piperazine-*N'*-[2-etanosulfónico](HEPES) (Sigma) pH=8:0, 0.5 μ L de una solución con pH=8 a base de una sal de tetrasodio del ácido (etilen glicol-bis{ β -aminoetil éter}- *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) (SIGMA) y 1 μ L de 100 mM de Monobromobimano (MBB) (Sigma). Los tubos donde se llevó acabo la derivatización fueron incubados a 30 °C durante 12 h en obscuridad. Finalmente, a las muestras derivatizadas se les agrego 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) al 30%, manteniéndolas en agitación durante 5 min, para posteriormente filtrarlas con la ayuda de unidades Millex Millipore de 0.45 μ m. El material filtrado fue analizado usando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-200 PERKIN ELMER) con detector de fluorescencia, inyectando 20 μ L de muestra.

Las fitoquelatinas fueron separadas en un columna C18 de fase reversa (6 nm, 5 μ m, 3.9 x 100 mm Phenomenex), a 380-430 nm excitación y detección respectivamente, utilizando como solvente A: 1000 mL de metanol (J.T. Baker) al 10% y 2.5 mL ácido acético (Sigma); y como solvente B: 1000 mL de metanol al 90% y 2.5 mL ácido acético (Sigma). La curva de calibración e identificación de tioles se realizó utilizando estándares de concentración conocida de cisteína (CYS) (Sigma) y de glutatión (GSH) (Sigma); además, se emplearon estándares internos de fitoquelatinas (PC2, PC3 y PC4) proporcionados por la Universidad de Berkeley, California; USA.

3.3.2. Determinación de proteínas

Con el fin de conocer alguna posible modificación del contenido de proteínas totales presentes en *S. minima* después de la exposición a Pb^{2+} , se procedió a la

cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford (1976). Esta técnica esta basada en las interacciones iónicas e hidrofóbicas del colorante azul brillante de Coomassie G con los aminoácidos de las proteínas, principalmente con residuos de Arginina, Histidina, Lisina, Tirosina, Triptófano y Fenilalanina.

La preparación del reactivo de Bradford se llevó a cabo disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G (Sigma) en una mezcla de 50 mL de etanol (J T Baker) al 99% y 100 mL de ácido fosfórico (Riedel-delttGaen) al 85%. Luego se disolvió con agitación durante 10 min, se aforó a 1000 mL con agua destilada fría, para continuar disolviendo durante 30 min evitando su degradación por la luz. En este método se emplearon 50 μ L de NaOH 1M por cada mL del reactivo para alcalinizar la reacción con el fin de obtener lecturas mejores de las muestras. El reactivo de Bradford se almacenó a 4 °C por no más de 18 días. La curva de calibración se realizó con una solución patrón de albúmina sérica bovina (Sigma) a una concentración de 1 mg/mL.

3.2.3. Ensayo de actividad de Fitoquelatina sintasa (PCS)

La determinación de la actividad enzimática de Fitoquelatina Sintasa se analizó mediante una modificación del método de Klapheck (1995) basado en la disminución de sustrato glutatión por formación de producto fitoquelatinas a través de la transpeptidación de dímeros γ -glutamil-cisteína por unidad de tiempo. La actividad de PCS se analizó en extractos de raíz y de hojas de plantas no expuestas y plantas expuestas a Pb^{2+} .

Los ensayos de la actividad enzimática se realizaron con la siguiente mezcla de reacción previamente estandarizada:

340 μg de proteínas totales se mezclaron con 0.2 mM de HEPES, 3.5 mM de GSH y 0.5 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, con el fin de obtener un volumen final de 500 μL . Esta reacción se incubó a 30 °C y se monitoreó de 0 a 25 min con intervalos de 5 min. La reacción se detuvo con TCA al 3%, para luego centrifugar la muestra a 15,700 g por 3 minutos. El sobrenadante se separó y se derivatizó con 0.2 M de Tris pH=8, 0.25 mM de MBB y 5 mM de EGTA. Esta reacción se dejó incubar durante 24 horas a una temperatura de 28 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se le agregó 20 μL de TCA al 30%, enseguida, las muestras fueron filtradas con unidades Millex-milipore de 0.45 μm . El material filtrado fue analizado por HPLC como se describió anteriormente para la cuantificación de fitoquelatinas. Los resultados fueron expresados como unidades de péptidos transferidos de γ -L-glutamil-L-cisteína por minuto.

3.2.4. Análisis transcripcional del gen que codifica para SmPCS

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el método de Gasic (2004). Se pesaron 2 g de tejido fresco (hojas o raíces) y se molieron en un mortero con pistilo con la ayuda de nitrógeno líquido. Una vez pulverizado el tejido, se agregaron 10 mL de buffer de extracción, previamente calentado a 60 °C, el cual contenía 2% de CTAB (Sigma), 2% polivinilpirrolidona K-30 soluble (Sigma), 100 mM de Tris-HCL con pH = 8.0, 25 mM de EDTA, 2.0 M de NaCl, 0.5 g/L de espermidina (Sigma) y 2% β -mercaptoetanol (Sigma). Luego fue homogenizado e incubado a 60 °C durante 15 min (homogenizando cada 2 minutos con ayuda de un Vortex). En seguida, las muestras fueron extraídas con 10 mL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezcladas por inversión y colocadas en hielo para después centrifugarlas a 14,000 g por 10 min a 4 °C. Este proceso de extracción se repitió dos veces. El

sobrenadante de las dos extracciones se separó en alícuotas de 1000 μL , a cada una de las cuales se les precipitó con 500 μL de 7.5 M LiCl mezclando por inversión y dejando incubar durante 12 h a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 14,000 g durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se desechó y el ARN precipitado fue resuspendido con 50 μL de agua destilada estéril. Con el fin de remover el exceso de LiCl, el ARN fue precipitado nuevamente con 5 μL de acetato de Sodio 3 M pH = 5.5 y 20 μL de alcohol etílico al 70%; dejándose incubar durante 3 h a -80 $^{\circ}\text{C}$. Por último, el ARN fue recuperado por centrifugación a 14000 g durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue removido con una pipeta Pasteur y las pastillas de ARN fueron lavadas 2 veces con alcohol etílico al 75%, dejándolas secar al aire durante 20 min. La pastilla de ARN fue disuelta en 15 μL de agua DEPC estéril, para luego ser sometida a un tratamiento de DNAsa (RQ1 ARNse-free DNase). Posteriormente, la concentración de ARN fue cuantificada a través de espectroscopía con lecturas de 260 y 280 nm usando lámpara UV y expresadas en $\mu\text{g}\cdot\text{gpf}^{-1}$. Su integridad se visualizó en geles de Agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y usando un buffer de corrida TAE 1X (TAE 20X 0,8 M Tris base, 0.4 M acetato sódico, 0.02 M EDTA, pH 8,0). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80 $^{\circ}\text{C}$.

La síntesis del ADNc se llevó a cabo mezclando 1.5 μg de ARN, 1 μL de 10 Mm de dNTPs (Invitrogen) y 1 μL de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Random primers (Promega), esta reacción se llevó a cabo durante 5 min a 72 $^{\circ}\text{C}$ y luego de dejó enfriar usando un baño de hielo. Posteriormente, se le adicionó en forma secuencial 4 μL de buffer 5x First strand, 2 μL de 100 mM DTT (Invitrogen) y 0.5 μL de la enzima Superscrip™ II Reverse Transcriptase (200 Uni/ μL , Invitrogen), las muestras fueron centrifugadas a 3,000 g

durante 30 segundos, con el fin de concentrar la muestra en el fondo del tubo. Luego, las muestras fueron incubadas durante 5 min a una temperatura de 25 °C. La síntesis de ADNc se llevó a cabo incubando la mezcla anterior a 40 °C durante 12 h. Por último, los tubos que contenían al ADNc fueron incubados a 72 °C durante 5 min para detener la reacción. El material obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su análisis. Además, con el objetivo de determinar la síntesis de ADNc, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando cebadores de 18s (Ambion) y de actina (Ambion).

El análisis de la expresión del gen de la Fitoquelatina sintasa se realizó a través de PCR, empleando el siguiente programa de amplificación: 93 °C (3 min), 50 °C (1 min) y 72 °C (1 min) por 40 ciclos. Los cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación del fragmento de *SmpCS* fueron 5'-ATCTTACTGCCATCACATCTTT-3' (forward) y 5'-CAGCATTATATAGCCACCAATAGG-3' (reverse) (González-Mendoza *et al.*, 2007). La mezcla de reacción para la amplificación incluyó 1.5 µg de ADNc, 1.0 µL de 10 pmol de cada uno de los primers mencionados, 1 µL de 40 mM MgCl₂ (Invitrogen) y 25 µL de PCR supermix High fidelity (Invitrogen). El negativo de la mezcla de reacción no incluyó ADNc en su lugar se empleo agua estéril.

3.3.5. Análisis estadísticos

Todas las muestras analizadas pertenecen a 2 experimentos independientes con sus tres replicas, mismas que fueron sometidas a un análisis de varianza multifactorial ANOVA ($P < 0.05$) para determinar la existencia de diferencias significativas y análisis de correlación de Pearson por SPSS® 9 de Windows.

3.3. Resultados

La producción de PC en respuesta a la exposición a plomo se evaluó en plantas de *Salvinia minima* expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h. La identificación y cuantificación de PC se llevó a cabo a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la figura 9 se puede observar la presencia de fitoquelatinas tanto en hojas como en raíces de *S. minima* expuestas y no expuestas a Pb^{2+} , lo cual fue confirmado mediante el perfil cromatográfico representativo de los diferentes tiempos de retención de los estándares usados para la identificación de tioles correspondientes.

De igual forma, en las hojas expuestas a Pb^{2+} se observó un incremento en la biosíntesis de PC2, PC3 y PC4 (Figuras 9 B y 9 C). Por otro lado, en las raíces no expuestas a Pb^{2+} solo se observó la presencia de PC2 y PC3 (Figura 9 D) que se incrementaron con la presencia de Pb^{2+} (Figura 9 E); además, en este tejido la presencia de Pb^{2+} induce la síntesis de PC4 (Fig. 9 E). También, se pudo apreciar la presencia de tioles que no fueron identificados por no contar con estándares correspondientes.

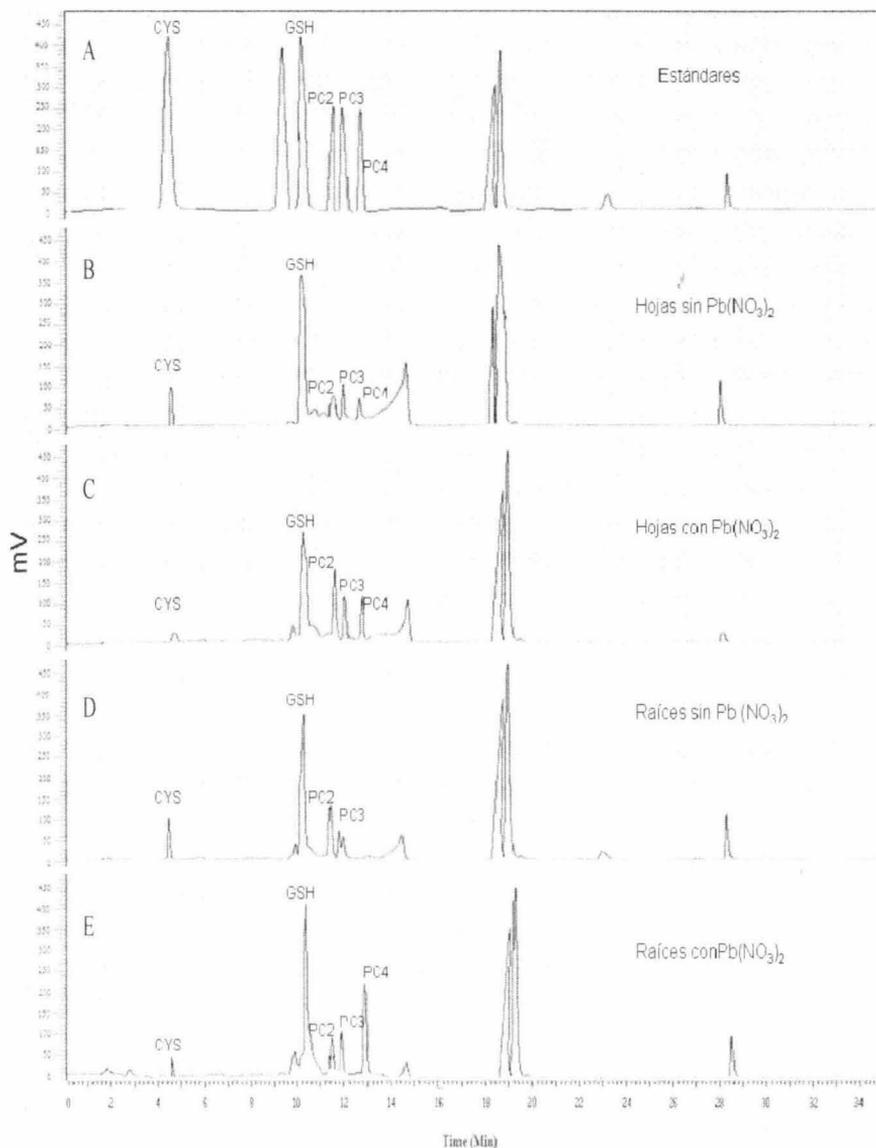


Figura 9. Cromatogramas de Fitoquelatina en *Salvinia minima*: Estándares (A). Cromatograma de hojas y raíces sin Pb^{2+} (B, D). Cromatogramas de hojas y raíces de plantas expuestas a $40 \mu M Pb(NO_3)_2$ durante 12 h (C, E). Cys= cisteína, GSH= glutatión, PC=Fitoquelatina, NI=Tiol no identificado.

La capacidad de *S minima* para incrementar la concentración de PC se confirmó a través de los valores promedios de la concentración de cada PC analizada, a saber de la concentración encontrada en el dímero (PC2), el trímero (PC3) y el tetrámero (PC4). En todos los casos los tejidos de las plantas expuestas a Pb^{2+} demostraron mayor producción de PC con respecto a los controles, y cabe señalar que también existen diferencias en la producción de PC entre las hojas y las raíces expuestas a Pb^{2+} . Por ejemplo, el aumento de PC4 fue de casi 8 veces más en las raíces y de 3 veces mayor en las hojas de plantas tratadas con Pb^{2+} con respecto al control y de 2.2 veces más en las raíces que en las hojas. En consecuencia, el porcentaje de PC2:PC3:PC4 cambió dramáticamente en los tejidos de las plantas expuestas en relación con el de las plantas control (Figura 10).

Figura 10. Cuadro de concentración de Fitoquelatinas PC2, PC3, PC4 y el total de Fitoquelatinas encontradas en tejidos de plantas control y de plantas expuestas durante 12 h a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Se muestra la proporción de PC2:PC3:PC4.

	PC2	PC3	PC4	PC tot	PC2:PC3:PC4
	nmol sH (mg ps) ⁻¹				%
Hojas sin Pb	0.846	1.125	0.35	2.5	34:46:14
Hojas con Pb	2.61	2.41	3.05	8.5	31:35:36
Raíces sin Pb	3.66	1.83	----	5.5	67:33:0:0
Raíces con Pb	4.13	6.99	7.6	18.7	22::37:41

La concentración de fitoquelatinas totales en hojas expuestas a Pb^{2+} , mostró diferencias significativa en relación con las hojas de plantas control, alcanzando el valor máximo de 8.5 nmol sH (mg ps)⁻¹ durante las primeras 12 h, disminuyendo ligeramente a las 24 h, para finalmente disminuir de 48 a 120 h de exposición (Figura 11 A). Por otra parte, la cuantificación de Fitoquelatinas totales en raíces mostró una respuesta que alcanzaba su pico máximo a las 12 h con un valor de 18.77 nmol sH (mg·ps)⁻¹ lo que representó un aumento significativo de casi 4 veces con respecto las plantas control. La concentración de Fitoquelatinas totales se mantuvo hasta las 48 h disminuyendo levemente hacia el final del experimento (Figura 12 A).

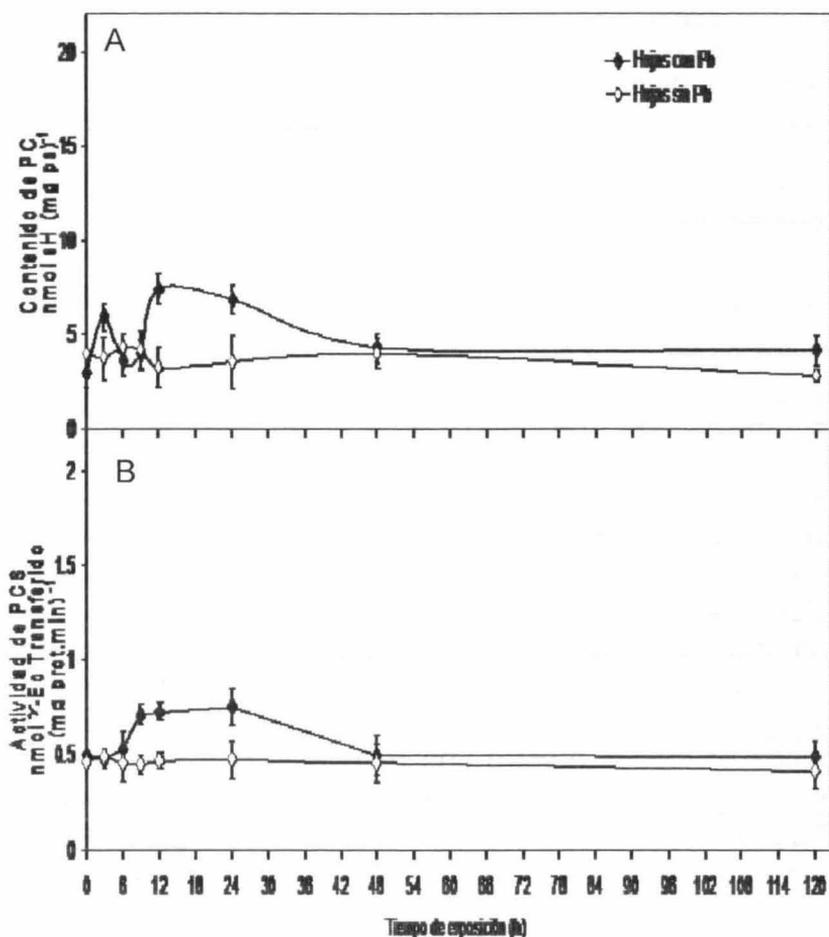


Figura 11. Producción de Fitoquelatinas (A) y actividad enzimática de Fitoquelatina Sintasa (B), en hojas de *Salvinia minima* expuestas a $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h. Los valores son los promedios \pm DE de 2 experimentos independientes con sus 3 réplicas.

Los ensayos de la actividad enzimática de fitoquelatina sintasa mostraron que, siguiendo los patrones de acumulación de Pb^{2+} , la actividad de la enzima en las hojas incrementó 1.18 veces con respecto al control durante 9 h manteniéndose sin cambios hasta las 12 h empezando a declinar a las 48 h para disminuir hasta su punto más bajo a las 120 h (Figura 11 B). En las raíces, la actividad de la PCS presentó un aumento rápido las 3 h manteniéndose con valores similares hasta las 6 h para demostrar más adelante, un nuevo incremento las 9 h y 12 h donde, los valores que alcanzó fue 3 veces más a lo observado en las plantas control; manteniéndose hasta 48 h y por último, se observó una disminución de la actividad, hacia el final del experimento (Figura 12 B).

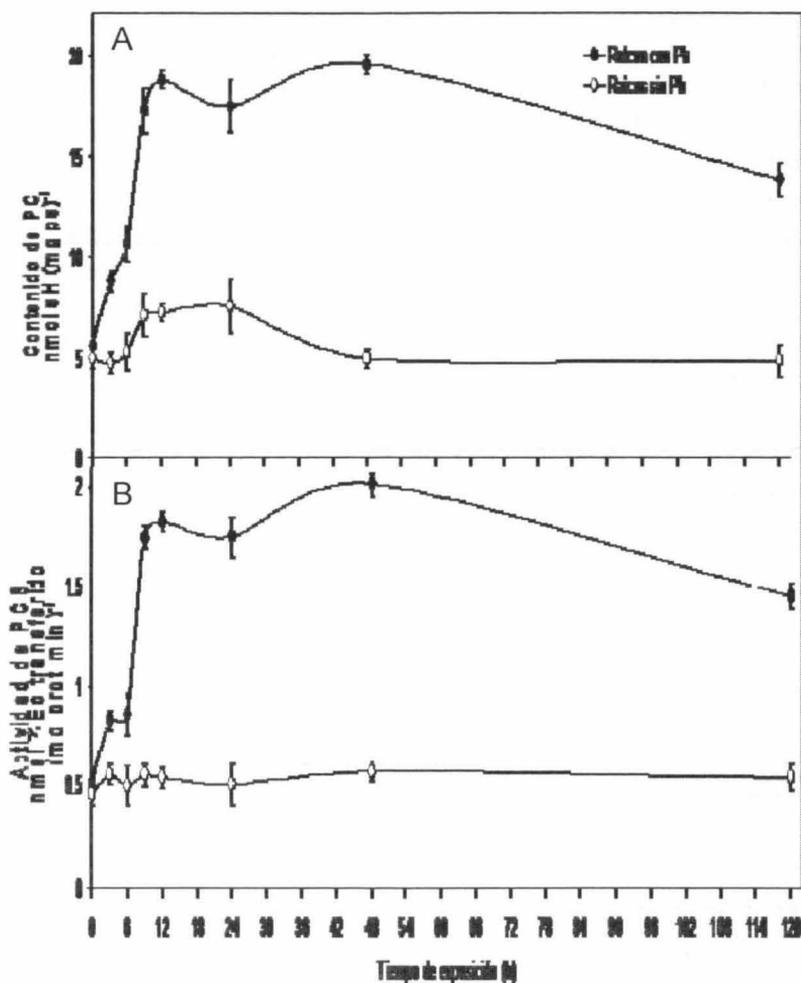


Figura 12. Producción de Fitoquelatinas (A) y actividad enzimática de Fitoquelatina Sintasa (B), en raíces de *Salvinia minima* expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h. Los valores son los promedios \pm DE de 2 experimentos independientes con sus 3 réplicas.

Por otra parte, con el objetivo de analizar los cambios transcripcionales del gen de Fitoquelatina sintasa (PCS), se realizó la extracción de ARN de tejidos (raíces y hojas) de *Salvinia minima* previamente expuesta a Pb^{2+} . En la figura 13, se muestra la calidad del ADNc, obtenido de ARN aislado, para lo cual se emplearon cebadores constitutivos de 18s y actina mediante PCR. Mediante el empleo de los cebadores para PCS (González-Mendoza *et al.*, 2007) se consiguió la amplificación de un fragmento de aproximadamente 397 pb, del helecho acuático *Salvinia minima*, el cual ha sido depositado en el GENBANK (*SmPCS* EU048205).

Asimismo, a través de la técnica de RT-PCR se comprobó la amplificación de este fragmento tanto en hojas como en raíces de *S. minima* después de haber sido expuesta a 40 μM de $Pb(NO_3)_2$ durante 120 h. En las hojas (Figura 14 A), se observaron cambios en la expresión del gen *SmPCS* desde 0 h hasta los 120 h de exposición al metal; mientras que, en las raíces (Figura 14 B) solo se pudo visualizar la expresión de 0 h hasta la primera 1 h de exposición a Pb^{2+} dejando de manifiesto que existen diferencias en la expresión del gen *SmPCS* entre los tejidos analizados de *S. minima*.

Este fragmento codifica para 109 aminoácidos y después de hacer un análisis de alineamiento con PCS de otras especies, se encontró una identidad de 64.3% con *AyPCS* (*Athyrium yokoscence*), 63.9% *PvPCS* (*Pteris vittata*), 62% *TjPCS* (*Thlaspi japonicum*), 61% *AtPCS* (*Arabidopsis thaliana*), 60% *TaPCS* (*Triticum aestivum*), 56% *LsPCS* (*Lathyrus sativus*) y 48.9% *AgPCS* (*Avicennia germinans*) (Figura 15).

La comparación de la secuencia de aminoácidos reveló la presencia de secuencias altamente conservadas sobre

posibles dominios catalíticos ((KGPWRWFDE y QTGTG ---P--GGY) mostrando aproximadamente un 60% de identidad con otras proteínas de PCS reportadas en otras especies (Figura 15).

Con la finalidad de determinar el grado de asociación entre las variables estudiadas se realizó un análisis de la correlación (coeficiente de Pearson). Primero, el estudio de la relación entre las variables de acumulación de Pb^{2+} y la actividad enzimática de PCS, demostró una alta correlación ($r=0.78$) sugiriendo que la actividad de la enzima incrementa con el incremento de la concentración del metal en ese tejido. Mientras que en las hojas la correlación fue más baja ($r=0.32$) como se puede apreciar en figura 16 A. Segundo, el análisis entre la acumulación del metal y la producción de PC reportó una alta correlación en las raíces ($r=0.80$) sugiriendo que la producción de PC incrementa conforme incrementa la acumulación de Pb^{2+} , sin embargo en el caso de las hojas se encontró que el coeficiente de correlación fue más bajo entre estas 2 variables (Figura 16 B). Tercero, la correlación entre la actividad de PCS y la producción de PC en las raíces presentó un alta correlación positiva ($r=0.97$), esto puede indicar que el incremento de la concentración de PC es el resultado de un incremento en la actividad de la enzima, mientras que en las hojas esta correlación no fue significativa (Figura 16 C).

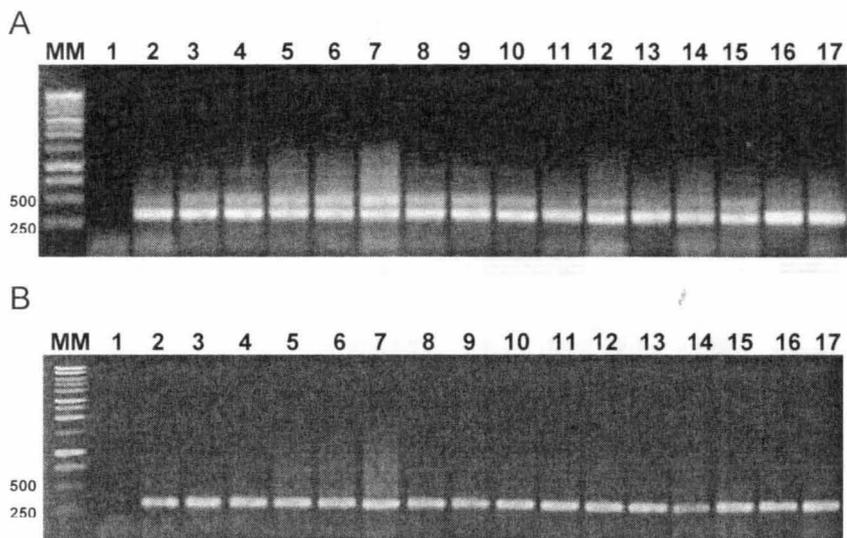


Figura 13. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) 18s (A) y actina (B) empleando ADNc de diferentes tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas y raíces de *S. minima*. MM=Marcador Molecular, 1=negativo, 2-9 hojas, 10-17=raíces.

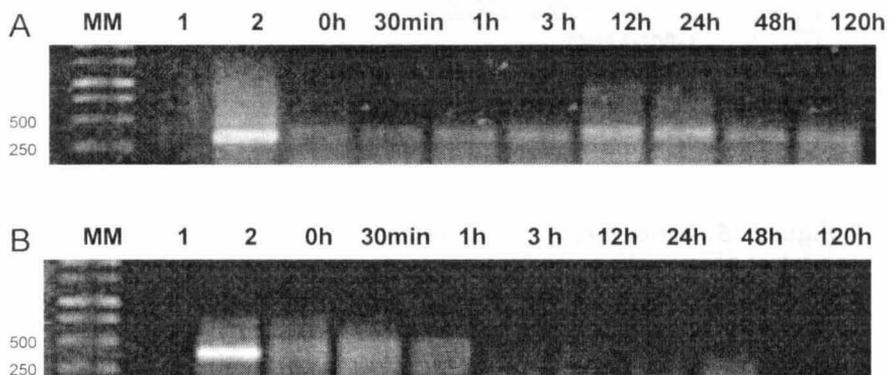


Figura 14. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de PCS analizando varios tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas(A) y raíces (B) de *S. minima*. Marcador Molecular=1kb, 1=Negativo, 2=positivo ADNc A. *germinan*.

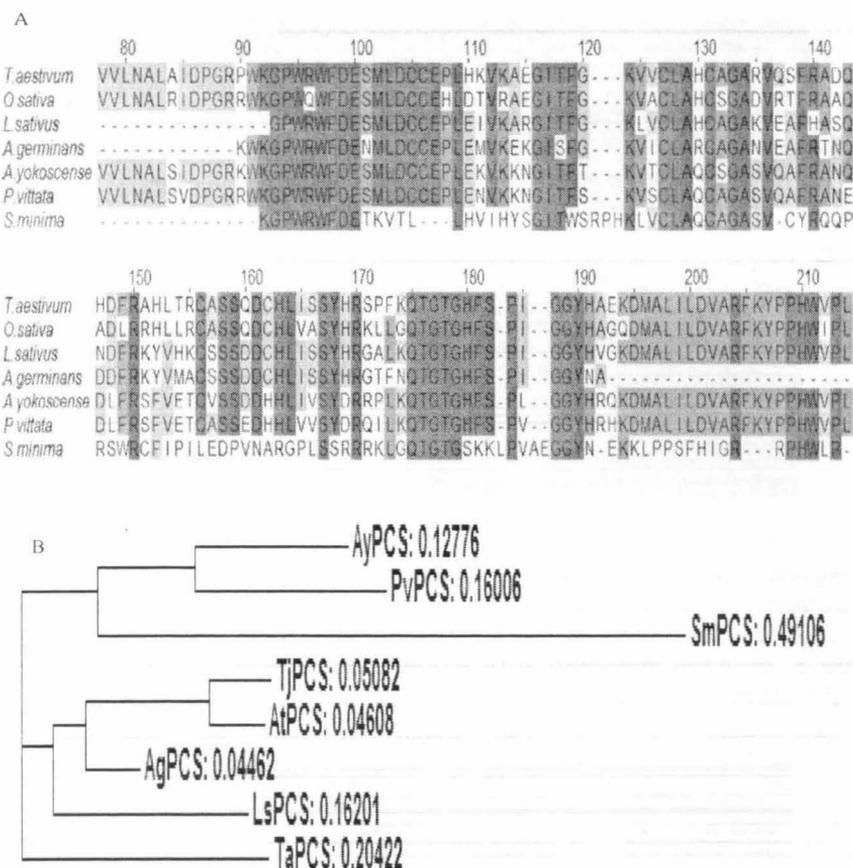


Figura 15. Alineamiento de la secuencia del fragmento amplificado y árbol filogenético. A) Alineamiento de los dominios conservados de PCS mediante Clustal W: AyPCS 64.3% (*Athyrium yokoscense* BAB64932), PvPCS 63.9% (*Pteris vittata* AAT11885), TjPCS 62% (*Thlaspi japonicum* BAB93119), AtPCS 61% (*Arabidopsis thaliana* AAF42805), TaPCS 60% (*Triticum aestivum* Q95WW5), LsPCS 56% (*Lathyrus sativus* ABG33908) y AgPCS. 48.9% (*Avicennia germinans* BAB43317). B) El análisis filogenético del fragmento de SmPCS se realizó usando el software MAFFT versión 6 basado en el algoritmo Kimura.

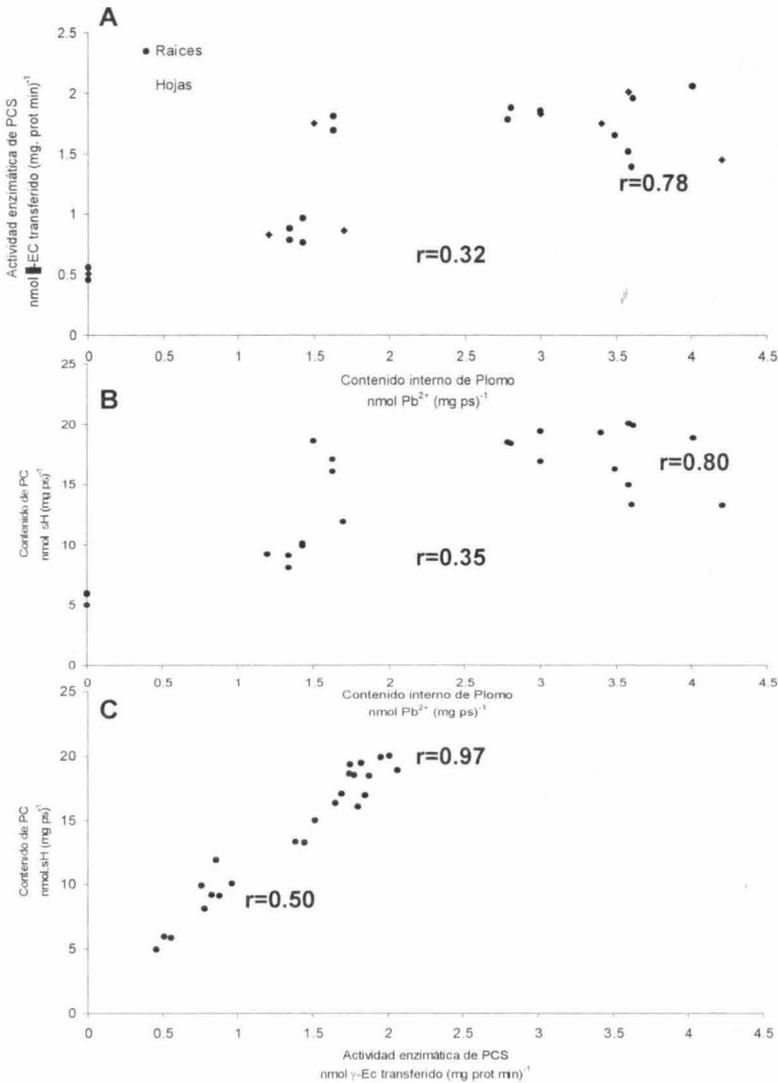


Figura 16 Análisis de la correlación entre: la concentración endógena de Pb²⁺ y A) la actividad de Fitoquelatina Sintasa en hojas y en raíces de *S. minima*, B) la concentración de fitoquelatinas en hojas y en raíces de *S. minima*, C) la actividad de Fitoquelatina Sintasa y la acumulación de Fitoquelatinas. Los valores son los promedios \pm DE de dos experimentos independientes con sus respectivas réplicas

3.2. Discusión

En el presente estudio se evaluó el efecto de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre la biosíntesis de fitoquelatinas en *Salvinia minima* Baker; asimismo, se logró el aislamiento de un fragmento de gen *SmPCS* de este helecho acuático nunca antes reportado y que permitió observar cambios en la expresión de este gen, ocasionados por la presencia de éste metal.

Se ha reportado que la presencia de Pb^{2+} afecta la fisiología de las plantas. Sin embargo, como se demostró anteriormente (Capítulo 2), *S. minima* es capaz de acumular Pb^{2+} , tanto en hojas como en raíces, sin presentar daños visibles. No obstante, al igual que en otras especies aún no están bien determinados los mecanismos de desintoxicación y tolerancia a metales pesados (Yang *et al.*, 2000; Sharma y Dubey, 2005).

Existen evidencias donde el Pb^{2+} es capaz de inducir el incremento en la biosíntesis de Fitoquelatinas (Rauser, 1990; Zenk, 1996; Cobbett, 2000; Rea *et al.*, 2004) en cultivos celulares de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* formando complejos poliméricos de PC. Asimismo, se ha demostrado que el Pb^{2+} modifica la actividad enzimática de PCS en cultivos celulares de *Rauwolfia serpentine* (Grill *et al.*, 1987), Además, se ha reportado un incremento de *TaPCS1* en las raíces de trigo al ser expuesta a Cd^{2+} (Clemens *et al.*, 1999), esto sugiere que las PC participan de forma activa como un mecanismo de desintoxicación de Pb^{2+} .

En el caso de *S. minima*, la presencia de plomo en sus tejidos afectó la biosíntesis de PC, la actividad enzimática PCS y diferencias en la expresión del gen *SmPCS* tanto en

los tiempos de exposición al metal como en los tejidos analizados. En las raíces, los cambios en la expresión del gen *SmPCS* se observaron desde 0 hasta los primeros 60 minutos de exposición, seguida de una nula expresión hasta el final del experimento. Estos patrones no correlacionaron con el incremento en la actividad de PCS, ni con la producción de PC a las 12 h de exposición, tal como sucedió en hojas de *B. juncea* al ser expuesta a Cd^{2+} , además, en esta planta modelo el contenido de PCS no correlacionó con la concentración de ARNm (Heiss *et al.*, 2003). Esto podría deberse a la posible existencia de isoformas del gen en raíces de *S. minima* por lo que probablemente la respuesta no fue totalmente dirigida.

Las raíces de *S. minima* expuestas a Pb^{2+} mostraron que a media que se incrementaba la acumulación del metal, la actividad de PCS y la producción de Fitoquelatinas aumentaba, lo cual se confirmó al hacer una correlación de Pearson (Figura 14). Estos datos son consistentes con los primeros reportes de la producción de péptidos ricos en cisteína inducidos por Cd^{2+} en *S. minima* (Outriged *et al.*, 1991). De igual forma, se ha reportado un incremento de PC inducido por Pb^{2+} en *Phaeodatum tricorutum* (Scarano y Moreli, 2002), por Cd^{2+} en *Zea mays* y *Triticum aestivum* expuesto (Keltjens y Beusichem, 1998), así como también, por As^{5+} en el helecho terrestre *Pteris vittata* al ser expuesto a este metal (Zhao *et al.*, 2003).

Por otra parte, en las hojas los cambios en la expresión del gen *SmPCS* fueron notorios y se mantuvieron durante todo el experimento de exposición al metal, contrastando con los resultados reportados en otras especies, tales como *Avicennia germinans*, donde los niveles de transcripción del gen *AgPCS* en las hojas, incrementaron más entre las 16 y 24 h de exposición a Cd^{2+} (González-Mendoza *et al.*, 2007). Asimismo, la actividad de la enzima PCS y la

producción de PC fueron afectadas por la exposición a Pb^{2+} .

En términos generales, en *S. minima*, la producción de PC aumenta en respuesta a la acumulación de Pb^{2+} , no obstante, existen diferencias significativas entre la concentración del metal presente en las raíces y en las hojas. Así mismo, se observó una mayor expresión del gen *SmPCS* en las hojas comparado con las raíces, mientras que, la actividad de PCS y la producción de PC fueron mayores en las raíces que en las hojas. Debido a que la concentración de Pb^{2+} fue menor en las hojas, posiblemente la actividad enzimática y la producción de PC solo hayan incrementado la mitad de lo observado en las raíces (razón por la cual posiblemente la asociación entre la producción de PC y la acumulación de metal fue baja).

Esto sugiere una migración deficiente del metal desde las raíces hacia las hojas como una estrategia de exclusión para proteger del posible daño a las células de las hojas o tal vez la participación de otros mecanismos como la síntesis de osmolitos y poliaminas, cambios en el balance hormonal o la propia composición de la pared celular, reduciendo el transporte del metal y la toxicidad en las hojas como lo sugieren algunos autores (Kim *et al.*, 2002; Seregin *et al.*, 2004).

Ahora bien, si se comparan las diferencias y similitudes entre un helecho terrestre hiperacumulador de As^{5+} como *Pteris vittata* con el helecho acuático hiperacumulador de Pb^{2+} podemos argumentar, primero que *S. minima* es capaz de sintetizar polímeros de PC₄, mientras que en *P. vittata* solamente se ha reportado que es capaz de biosintetizar PC₂. Segundo, la concentración de PC en *S. minima* es más baja (máximo de 20 nmol · mg ps⁻¹) comparado con lo reportado en *P. vittata* (máximo 7 μmol ·

g p s⁻¹). Tercero, en ambas especies los datos sugieren que la producción de estos tioles es importante en la detoxificación de metales; sin embargo, es posible que actúe en colaboración con otros mecanismos (Zhao *et al.*, 2003).

3.3 Conclusiones

Las raíces de *S. minima* son los tejidos donde la presencia de Pb²⁺ induce en las primeras horas la transcripción de *SmPCS*, produciendo un incremento en la actividad de PCS teniendo como resultado un incremento de la producción de PC.

En las hojas, la presencia de Pb²⁺ induce cambios transcripcionales de *SmPCS* que se mantienen por más tiempo, modificando la actividad de PCS y la producción de PC.

En ambos tejidos de *S. minima* evaluados, la presencia de Pb²⁺ modifica la biosíntesis de PC sugiriendo que posiblemente participe como una respuesta de desintoxicación en este helecho.

3.4. Referencias bibliográficas

- Bradford M. (1976) A Rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 75: 248-254.
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.L. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The European Molecular Biology Organization* 18: 3325–3333.
- Cobbett C. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxification. *Plant Physiology* 123: 825–832.

- De-Knecht J.A., Van-Dillen M., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. (1994) Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene Vulgaris* Chain length distribution and sulfide incorporation. *Plant Physiology* 104: 255-261.
- Gasic K., Hernández A., Korban S. (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 427a-437g.
- Gardner J. and Al-Hamdani S. (1997) Interactive effects of Aluminum and Humic Substances on *Salvinia*. *Journal of Aquatic Plant Management* 35: 30-34.
- González-Mendoza D., Moreno A.Q., Zapata-Pérez O. (2007) Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquatic Toxicology* 83: 306-14.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1987) Phytochelatins, a class of heavy heavy-metal-binding peptides from plant, are functionally analogous to metallothioneines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 439-443.
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1991) Phytochelatins. *Methods in Enzymology* 205: 333-341.
- Heiss S., Wachter J., Bong J., Cobbett C., Rausch T. (2003) Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany* 54: 1833-1839.
- Hoffman T., Kutter C., Santamaría J.M. (2004) Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb? *Engineering in Life Sciences* 4: 61-65.

- Keltjens W. and Beusichem M. (1998) Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*): combined effects of copper and cadmium. *Plant and Soil* 203: 119-126.
- Kim Y.Y., Yang Y., Lee Y. (2002) Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum* 116: 368-372.
- Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. (1995) Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum L.* *Plant Physiology* 107: 515-521.
- Lee S. and Korban S. (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* 215: 689-693.
- Mehra R.K. and Tripathi R.D. (1999) Phytochelatins and tolerance. *Environmental Pollution and Plant Responses* In: Agrawal SB, Agrawal M, Ed. CRC Press, Lewis Publisher. Boca Raton, FL. USA: 367-382.
- Olguín E.J., Hernández E., Ramos I. (2002) The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for Removing cadmium, lead and chromium. *Acta biotechnologica* 22: 121-131.
- Ortiz D., Kreppel L., Seperser D. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeasts requires and ATP binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *The European Molecular Biology Organization* 11: 3491-3499.
- Outridge P.M., Rauser W.E., Hutchinson T.C. (1991) Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima*. *Oecologia* 88: 109-115.
- Rauser W.E. (1990) Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* 59: 61-86.

- Rauser W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiology* 109: 1141-1149.
- Rea P.A., Vatamaniuk O., Rigden D. (2004) Weeds, Worms, and More. Papain's Long-Lost Cousin, Phytochelatin Synthase. *Plant Physiology* 136: 2463-2474.
- Scarano G. and Moreli E. (2002) Characterization of Cadmium and Lead Phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Journal Biometals* 15: 145-151.
- Seregin I.V., Shpigun L.K., Ivaniov V.B.M. (2004) Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Plant Physiology* 51: 525-533.
- Sharma P. and Shanker D.R. (2005) Lead toxicity in plants. *Journal Brazilian Plant Physiology* 17: 35-52.
- Steffens J.C. (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annual Review Plant Molecular Biology* 41: 553-575.
- Tripiani R.D., Rai U.N., Gupta M., Chandra P. (1996) Induction of Phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (i.f) royle under Cadmium stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 505-512.
- Vögeli-Lange R. and Wagner G.W. (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science* 114: 11-18.
- Yang Y.Y., Jung J.Y., Suh H.S., Lee Y. (2000) Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology* 124: 1019-1026.
- Zenk M. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-review. *Gene* 179:21-30.
- Zhao F.J., Dunham S.J., Mc Grath S.P. (2002) Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytology* 156: 27-31.

Capítulo 4

Efecto del la acumulación de Pb^{2+} en la biosíntesis de GSH en plantas de *Salvinia minima* Baker

4.1. Introducción

El glutatión (γ -glutamil-L-cisteína-L-glicina, GSH) es un tripéptido distribuido extensamente en la mayoría de las células, es un compuesto no proteico antioxidante y de bajo peso molecular. El GSH se sintetiza en dos reacciones consecutivas dependientes de energía (ATP), primero la formación de γ -glutamil-L-cisteína (γ -EC) a partir de la unión de L-glutamato y L-cisteína (γ -EC, EC 6.3.2.2.) y el segundo paso es la conjugación de γ -glutamilcisteína con L-glicina, este paso es catalizado por la enzima Glutatión Sintetasa (GS, EC 6.3.2.3.) (Meister, 1995).

La biosíntesis de GSH forma parte fundamental de la asimilación de azufre en forma de sulfato (Leustek *et al.*, 2000). La mayoría de las funciones del GSH están relacionadas a su residuo de cisteína. Las funciones fisiológicas del GSH en las plantas son almacenaje de la forma reducida de sulfuro, participación en las rutas de señalización y defensa celular (Noctor *et al.*, 1998), sustrato de GSH-S-transferasa, la cual cataliza la conjugación de GSH con xenobióticos dañinos tales como herbicidas (Marrs, 1996), además, participa activamente en el balance redox evitando la acumulación de radicales libres y reduciendo el estrés oxidativo. Asimismo, se ha demostrado su acoplamiento en una reacción de oxidoreducción con dehidroascorbato (DHA) catalizado por enzimas como la dehidroascorbato reductasa y la glutarredoxina (tioltransferasa) (Noctor *et al.*, 1998).

Otra función importante del glutatión es servir como precursor inmediato de fitoquelatinas (PC), estas últimas participan como un mecanismo de desintoxicación de metales pesados (Grill, 1989, Xiang, 2001). Existen evidencias, de la participación de GSH en el estrés por exposición a metales pesados. En cultivos de células de tomate y de tabaco, la concentración de GSH se incrementó significativamente en presencia de Cd^{2+} (Chen y Goldsborough, 1994; Schneider y Bergmann, 1995), este mismo comportamiento se pudo observar en raíces de maíz (Rüegsegger y Brunold, 1992). Por otra parte, los cambios en la expresión del gen Glutatión Sintetasa (GS) han sido documentados en *A. thaliana* y *S. pompe* al ser expuestas a Cd^{2+} (Harada *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

En este capítulo, se investigó el efecto del Pb^{2+} sobre la producción de glutatión en las raíces y las hojas de *S. minima* al ser expuesta a $40 \mu M Pb(NO_3)_2$ durante 120 h a este metal, así como su participación en la desintoxicación del metal.

4.2. Metodología

4.2.1. Cuantificación de Glutatión (GSH)

La cuantificación de Glutation (PC) se realizó a través de un método modificado de Grill (1991) utilizando 250 mg de tejido liofilizado (raíces u hojas). Los tejidos fueron congelados con nitrógeno líquido y triturados en un mortero hasta pulverizarlos completamente. Después, se les agregó un buffer de extracción en una proporción de 1.5 mL por cada 250 mg de tejido. El buffer de extracción contenía una solución de 50 mM de tris [(hidroximetil)-aminometano] (Tris) (Biorad) a $pH=7.0$, 100 mM de ácido ascórbico (Sigma), 50 mM de Cloruro de sodio (NaCl,

Merck) y 1 mM de DL-Ditiotreitol (DTE Sigma). Posteriormente, la mezcla fue homogenizada durante 1 min con la ayuda de un vortex (Thermolyne) y centrifugada a 15,700 g a 4 °C, durante 30 min. Se tomaron 350 µL del sobrenadante y se derivatizaron con 100 µL de una solución que contenía 0.5 mM de ácido *N*-[2-hidroxyetil]piperazine-*N'*-[2-etanosulfónico](HEPES) (Sigma) con un pH=8:0, 0.5 µL de una solución con pH=8 a base de una sal de tetrasodio del ácido (etilen glicol-bis{β-aminoetil éter}- *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) (Sigma) y 1 µL de una solución de 100 mM de Monobromobimano (MBB) (Sigma). Los tubos donde se llevo a acabo la derivatización se incubaron a 30 °C durante 12 h, mantenidos en obscuridad. Finalmente, a las muestras derivatizadas se les agregó 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) al 30%, manteniéndolas en agitación durante 5 min, para posteriormente filtrarlas con la ayuda de unidades Millex Millipore de 0.45 µm. El material filtrado fue analizado usando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-200 PERKIN ELMER) con detector de fluorescencia, inyectando 20 µL de muestra.

El glutatión fue separado en un columna C18 de fase reversa (6 nm, 5 µm, 3.9 x 100 mm Phenomenex), a 380-430 nm excitación y detección respectivamente, utilizando como solvente A: 1000 mL de metanol (J.T. Baker) al 10% y 2.5 mL ácido acético (Sigma); y como solvente B: 1000 mL de metanol al 90% y 2.5 mL ácido acético (Sigma) con un protocolo descrito en Anexo II. La identificación y curva de calibración se realizó utilizando estándares de cisteína (CYS) (Sigma) y de glutatión (GSH) (Sigma).

4.3.2. Determinación de proteínas

Con el fin de conocer alguna posible modificación del contenido de proteínas totales presentes en *S. minima* después de la exposición a Pb^{2+} , se procedió a la cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford (1976). Esta técnica se basa en las interacciones iónicas e hidrofóbicas del colorante azul brillante de Coomassie con los aminoácidos de las proteínas, principalmente con residuos de Arginina, Histidina, Lisina, Tirosina, Triptófano y Fenilalanina.

La preparación del reactivo de Bradford se llevó a cabo disolviendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G (Sigma) en una mezcla de 50 mL de etanol (J T Baker) al 99% y 100 mL de ácido fosfórico (Riedel-delttGaen) al 85%. Luego se disolvió con agitación durante 10 min, se aforó a 1000 mL con agua destilada fría, para continuar disolviendo durante 30 min evitando su degradación por la luz. En este método se emplearon 50 μ L de NaOH 1 M por cada mL del reactivo para alcalinizar el medio con el fin de obtener mejores lecturas de las muestras. El reactivo de Bradford se conservó a 4 °C por no más de 18 días. La curva de calibración se realizó con una solución patrón de albúmina sérica bovina (ASB Sigma) a una concentración de 1 mg/mL.

4.2.3. Ensayo enzimático de Glutación Sintetasa (GS)

La actividad de la Glutación sintetasa (GS) se determinó a través del método modificado de Kim (2003). El ensayo está basado en medir la formación del difosfato de adenosina (ADP) a través de espectroscopía. La mezcla de reacción contenía 100 mM de Tris-HCl [(hidroximetil)-aminometano] pH 7.8, 100 mM de cloruro de potasio (KCl Sigma), 5 mM de Trifosfato de adenosina (ATP Sigma), 50

mM de cloruro de magnesio (MgCl_2 Sigma), 10 mM de Glicina, 5 mM de γ -L-glutamil-L-cisteína (γ -EC Sigma), 0.4 mM de fosfoenolpiruvato (Sigma), 0.2 mM de dinucleotido de adenina nicotinamida (NADH Sigma), 5 μL de piruvato cinasa (5 Uni/ μL Sigma), 2.5 mM de lactato del músculo de conejo de tipo II (Sigma). La reacción se inició agregando 400 μg de proteína total e incubada de 2.5-30 minutos a 37 °C. La cantidad de ADP se calculó por el cambio de las lecturas obtenidas a una absorbancia de 340 nm al agregar 100 μL (1 Uni/ μL) de lactato deshidrogenasa.

4.2.4. Análisis transcripcional del gen que codifica para SmGS

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el método de Gasic (2004). Se pesaron 2 g de tejido fresco (hojas o raíces) y se molieron en un mortero con pistilo con la ayuda de nitrógeno líquido. Una vez pulverizado el tejido, se agregaron 10 mL de buffer de extracción, previamente calentado a 60 °C, el cual contenía 2% de CTAB (Sigma), 2% polivinilpirrolidona K-30 soluble (Sigma), 100 mM de Tris-HCL con pH=8.0, 25 mM de EDTA, 2.0 M de NaCl, 0.5 g/L de espermidina (Sigma) y 2% β -mercaptoetanol (Sigma). Luego fue homogenizado e incubado a 60 °C durante 15 min (homogenizando cada 2 minutos con ayuda de un Vortex). En seguida, las muestras fueron extraídas con 10 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezcladas por inversión *et alocadas* en hielo para después centrifugarlas a 14,000 g por 10 min a 4°C. Este proceso de extracción se repitió dos veces. El sobrenadante de las dos extracciones se separó en alícuotas de 1000 μL , a cada una de las cuales se les precipitó con 500 μL de 7.5 M LiCl mezclando por inmersión y dejando incubar durante 12 h a una temperatura de 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación,

los tubos fueron centrifugados a 14,000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el ARN precipitado fue resuspendido con 50 µL de agua destilada estéril. Con el fin de remover el exceso de LiCl, el ARN fue precipitado nuevamente con 5 µL de acetato de Sodio 3 M pH=5.5 y 20µL de alcohol etílico al 70 %; dejándose incubar durante 3 h a -80 °C. Por último, el ARN fue recuperado por centrifugación a 14000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido con una pipeta Pasteur y las pastillas de ARN fueron lavadas 2 veces con alcohol etílico al 75%, dejándolas secar al aire durante 20 min. La pastilla de ARN fue disuelta en 15 µL de agua DEPC estéril, para luego ser sometida a un tratamiento de DNasa (RQ1 ARNse-free DNase). Posteriormente, la concentración de ARN fue cuantificada a través de espectroscopia de UV y su integridad se visualizó en geles de Agarosa al 1% usando buffer de corrida TAE 1X (TAE 20X 0,8 M Tris base, 0.4 M acetato sódico, 0.02 M EDTA, pH 8,0). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80 °C

La síntesis del ADNc se llevó a cabo mezclando 1.5 µg de ARN, 1 µL de 10 Mm de dNTPs (Invitrogen) y 1 µL de 500 µg/mL Random primers (Promega), esta reacción se incubó durante 5 min a 72 °C y luego de dejar enfriar usando un baño de hielo. Posteriormente se les adicionó en forma secuencial 4 µL de buffer 5x First strand, 2µL de 100 mM DTT (Invitrogen) y 0.5 µL de la enzima Superscrip™ II Reverse Transcriptase (200 Uni/µL, Invitrogen), las muestras fueron centrifugadas a 3,000 g durante 30 segundos, con el fin de concentrar la muestra en el fondo del tubo. Luego, las muestras fueron incubadas durante 5 min a una temperatura de 25 °C. La síntesis de ADNc se llevó a cabo incubando la mezcla anterior a 40 °C durante 12 h. Por último, los tubos que contenían al ADNc fueron incubados a 72 °C durante 5 min para detener la reacción. El material obtenido fue almacenado a -20 °C

hasta su análisis. Además, con el objetivo de determinar la calidad del ADNc sintetizado, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando cebadores de 18s (Ambion) y de actina (Ambion).

El análisis de la expresión de la Glutación sintetasa se realizó a través de PCR empleando el siguiente programa de amplificación: 95 °C 2 min, 49 °C 2 min, 72°C 1 min por 38 ciclos (Figura 17). Los cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación del fragmento de *SmGS* fueron 5'-CCAGACAGTTGCTGTGGTGT-3' (Forward Integrated DNA Technologies) y 5'-ACCATCACGGACCAGAAAAG 3' (Reverse Integrated DNA Technologies), diseñados mediante el alineamiento de secuencias de nucleótidos y analizadas a través del programa Custom Primers-OligoPerfect™ Designer. (Figura 16) la mezcla de reacción para la amplificación incluyó 2 µg de ADNc 1.0 pmol de cada uno de los primers, 1 µL de 40 mM MgCl₂ (Invitrogen) y 25 µL de PCR supermix High fidelity (Invitrogen). El negativo de la mezcla de reacción no incluyó ADNc, en su lugar se empleo agua estéril.

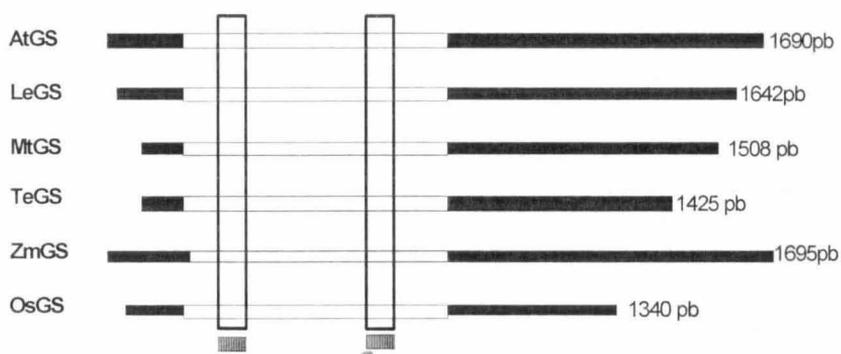


Figura 17. Alineamiento de secuencias de nucleótidos para el diseño de cebadores de GS (AtGS= *Arabidopsis thaliana*, LeGS= *Lycopersicum esculentum*, MtGS=*Medicago truncatula*), TaGS= *Triticum eastivum*, Zm=*Zea mays*, OsGS =*Oryza sativa*)

4.2.5. Análisis estadísticos

Todas las muestras analizadas pertenecen a 2 experimentos independientes con sus tres réplicas, mismas que fueron sometidos a análisis de varianza multifactorial ANOVA ($P < 0.05$) y análisis de correlación de Pearson por SPSS[®] 9 de Windows.

4.3. Resultados

La concentración de glutatión se evaluó en plantas de *Salvinia minima* expuestas a $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h, a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados de este experimento mostraron que la presencia de plomo incrementó la producción de GSH tanto en las hojas como en las raíces de *S. minima*. Además, se observó que las hojas alcanzaron un máximo de $30.5 \text{ nmol sH (mg ps)}^{-1}$, lo que significó un aumento de 2.7 veces con respecto a las hojas de plantas control (no expuestas a plomo). El contenido de GSH presentó el siguiente comportamiento, un incremento inicial a las 6 h, disminuyendo posteriormente a las 12 h y continuando un descenso hasta las 120 h de exposición a Pb^{2+} (Figura 18 A).

Por otra parte, la cuantificación del Glutatión en las raíces de plantas expuestas a plomo mostró una respuesta diferente. La máxima producción fue de $21.74 \text{ nmol sH (mg ps)}^{-1}$ alcanzada en las primeras 3 horas, luego mostró un ligero descenso entre 6 y 12 h, para nuevamente incrementar a las 24 h ($20.70 \text{ nmol sH (mg ps)}^{-1}$), después la concentración del glutatión disminuyó poco a poco hacia el final del experimento (Figura 19 A).

Los ensayos de la actividad enzimática de GS mostraron que después de exponer a *S. minima* a una concentración elevada de plomo, la actividad de la enzima incrementaba tanto en las hojas como en las raíces. En las hojas, la actividad enzimática mostró un incremento de 2.8 veces con respecto a las hojas de las plantas control, durante las primeras 3 h, declinando después de las 9 h hasta su punto más bajo a las 120 h (Figura 18 B). Mientras que en las raíces, la actividad de GS presentó un aumento (2.0 veces) a las 3 h comparado con las plantas control, manteniéndose sin cambios significativos hasta por 48 h, tiempo al cual sufrió una disminución muy marcada hasta las 120 h (Figura 19 B).

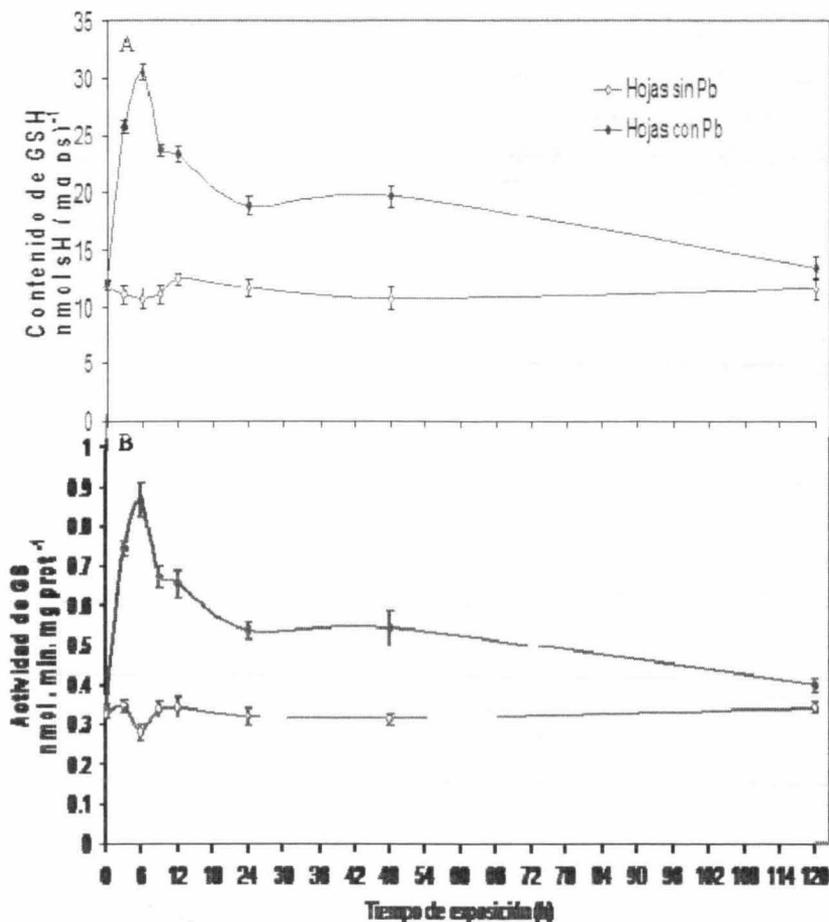


Figura 18. Producción de Glutati6n(A) y actividad enzimática de Glutati6n Sintetasa (B), en hojas de *Salvinia minima* expuestas a 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h. Los valores son los promedios \pm DE de 2 experimentos independientes con sus 3 r3plicas.

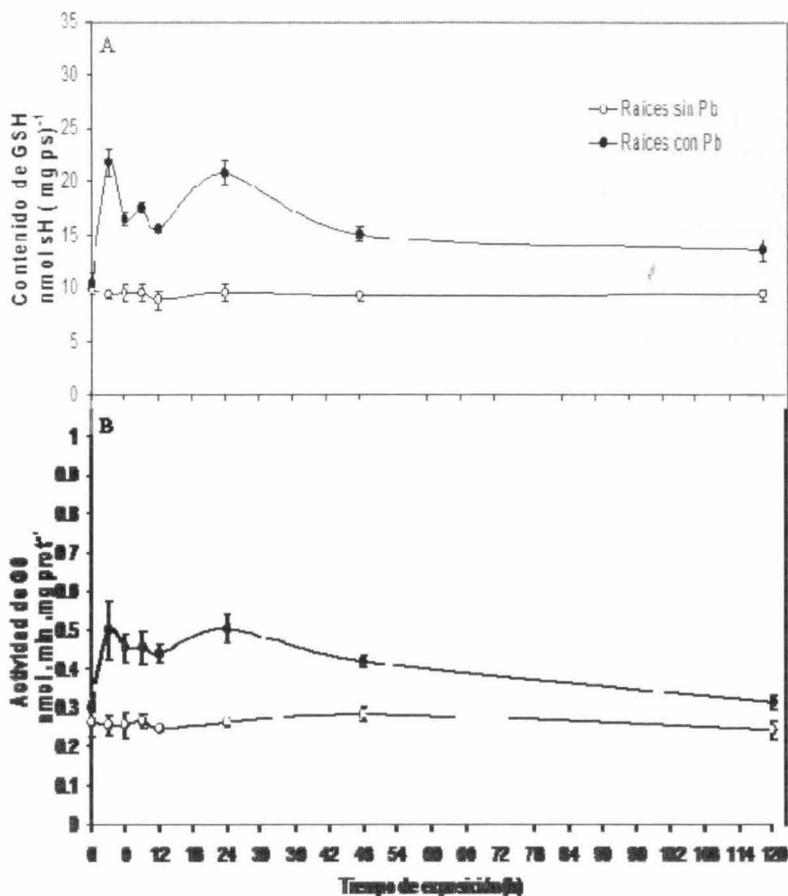


Figura 19. Producción de glutatión (A) y actividad enzimática de Glutatión Sintetasa (B), en raíces de *Salvinia minima* expuestas a $40 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 120 h. Los valores son los promedios \pm DE de 2 experimentos independientes con sus 3 réplicas.

El análisis transcripcional del gen de Glutación Sintetasa (GS), se realizó con el ADNc sintetizado y probado en el capítulo 3; mediante el empleo de los primers diseñados. Estos primers permitieron amplificar un fragmento de aproximadamente 478 pb del helecho acuático *Salvinia minima*, el cual codifica para 176 aminoácidos. La comparación de la secuencia de aminoácidos se realizó con la base de datos EMBO, lo que dio como resultado la observación de secuencias altamente conservadas de posibles dominios catalíticos (DYPSEAEWSVARLL.-----AIEKPLFVLKPQREGG), las cuales mostraron aproximadamente un 80% de identidad con otras proteínas GS de otras especies analizadas (Figura 20).

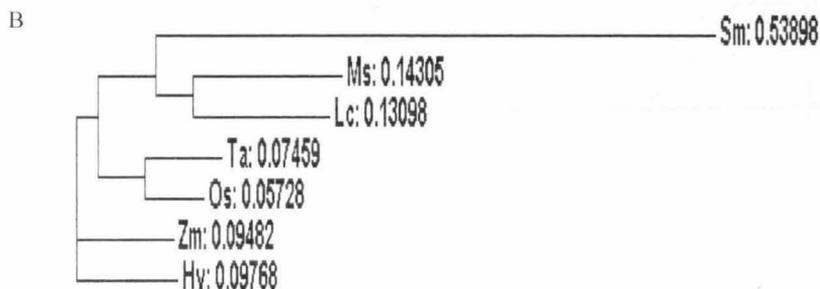
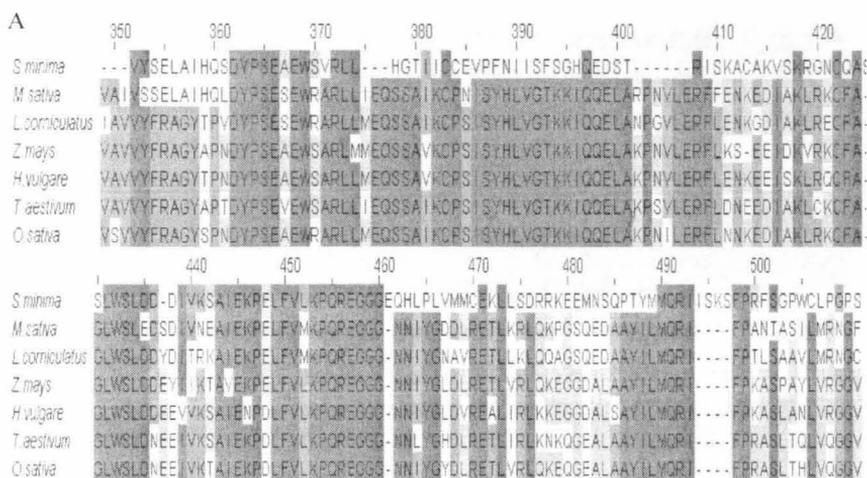


Figura 20 Alineamiento y árbol filogenético de la secuencia del fragmento amplificado. A) Alineamiento de los dominios conservados de GS mediante Clustal W: *MsGS* 84% (*Medicago sativa* CAL69591), *ZmGS* 80% (*Zea mays* CAE18179), *HvGS* 80% (*Hordeum vulgare* ABC17624), *OsGS* 80% (*Oryza sativa* NP001066914) *TaGS* 79% (*Triticum aestivum* CAE18176) *LcGS* 75% (*Lotus orniculatus* AF279703). B) El análisis filogenético del fragmento de *SmGS* se realizó usando el software MAFFT versión 6.0 basado en el algoritmo Kimura.

A través de la técnica de RT-PCR se comprobó la amplificación este fragmento en hojas y raíces de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, observándose cambios en la expresión del gen *SmPCS*.

La expresión del gen *SmGS* en las hojas, solo fue visualizada entre 1 h y 3 h de exposición al Pb^{2+} , mientras que, en las raíces se pudo visualizar desde 0 h hasta las 12 h, mostrando diferencias en la expresión del gen *SmGS*. Asimismo, se observó que la presencia de Pb^{2+} afecta de manera diferente la expresión de *SmGS* en ambos tejidos (Figura 21).

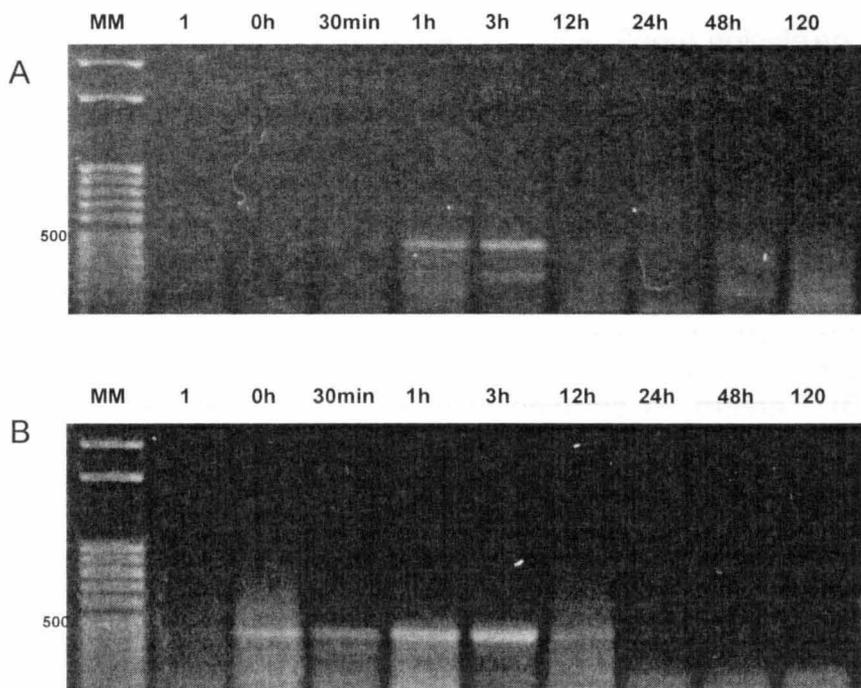


Figura 21. Reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de GS analizando varios tiempos de exposición a Pb^{2+} en hojas (A) y raíces (B) de *S. minima*. Marcador Molecular=3 kb, 1=Negativo.

Con el propósito de establecer el grado de asociación entre las variables estudiadas, se llevó al cabo un análisis de correlación (coeficiente de Pearson). Primero, se analizó la relación entre la acumulación de Pb^{2+} y la actividad enzimática de GS donde no se observó ningún tipo de correlación (Figura 22 A). Segundo, el análisis entre la acumulación del metal y la producción de GSH reportó una correlación negativa en las hojas ($r=-0.40$) proponiendo que la producción de GSH disminuye conforme se incrementa la acumulación de Pb^{2+} ; sin embargo, en el caso de las raíces se encontró que el coeficiente de correlación fue muy bajo entre estas 2 variables (Figura 22 B). Tercero, la correlación entre la actividad de GS y la producción de GSH en hojas y en raíces presentó un alta correlación positiva ($r=0.97$ y $r=0.78$ respectivamente) indicando que el incremento de la concentración de GSH es consecuencia de un aumento en la actividad enzimática de GS (Figura 22 C).

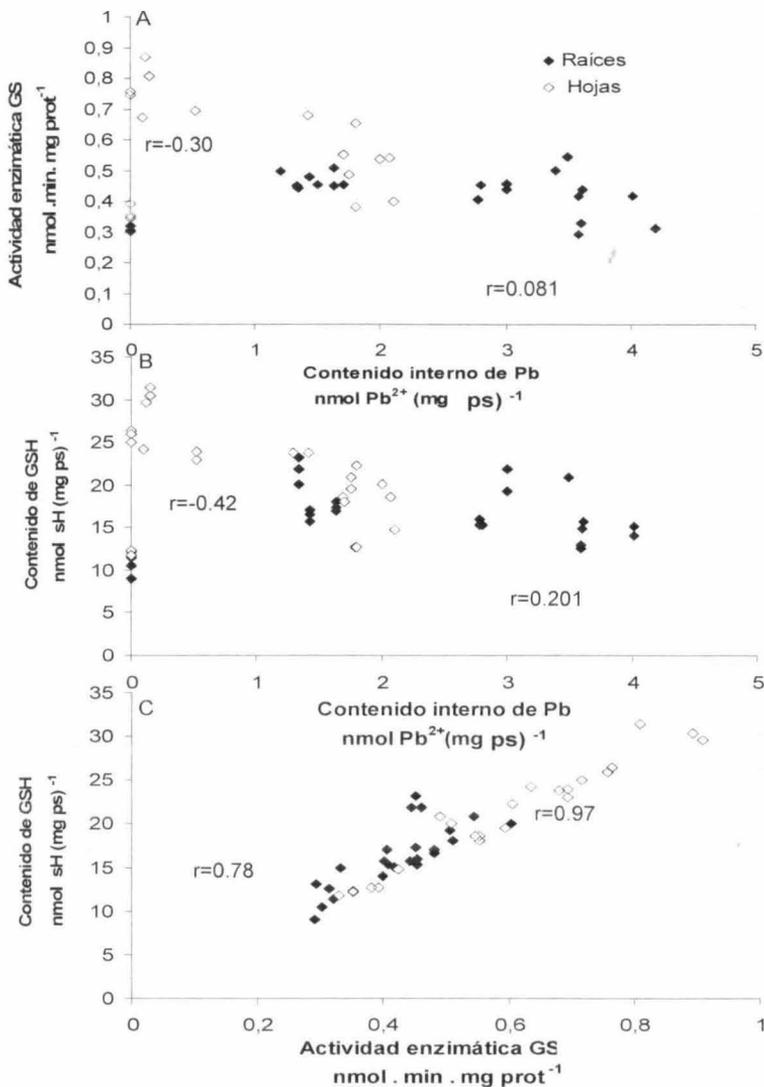


Figura 22. Análisis de la correlación entre: la concentración endógena de Pb^{2+} y A) la actividad de Glutación Sintetasa en hojas y raíces de *S. minima*; B) la concentración de Glutación en hojas y raíces de *S. minima*; C) la actividad de Glutación Sintetasa y la acumulación de Glutación. Los valores son los promedios \pm DE de dos experimentos independientes con sus respectivas réplicas.

4.4. Discusión

El Glutati3n es un metabolito que interviene de manera importante en la desintoxicaci3n de radicales libres, sustancias xenobi3ticas y metales pesados (Noctor 1998). Se ha documentado que el glutati3n reducido puede estar relacionado directamente con el estr3s por metales pesados en las plantas superiores, ya que puede servir como un agente quelante de los metales (V3geli-Lange y Wagner, 1996). Sin embargo, el GSH es reconocido como un excelente antioxidante que juega un papel fundamental en el mecanismo de defensa de las plantas (Alscher, 1989).

La exposici3n a metales pesados inicialmente tiene como resultado una disminuci3n severa de GSH, seg3n se ha reportado para diversas plantas cuando son expuestas a Cd^{2+} , tales como *Rauwolfia serpentina* (Grill *et al.* 1987), *Zea mays* (Ruegsegger y Brunold, 1992), espinacas (Tukendorf, 1993), tabaco (V3geli-Lange y Wagner, 1996), zanahoria (di Toppi *et al.*, 1999) y pino (Sch3tzend3bel *et al.*, 2001); adem3s, este comportamiento tambi3n ha sido observado en *Silene cucubalus* cuando fue expuesta a altas concentraciones de Cu^{2+} (De Vos *et al.*, 1992). Sin embargo, en *Salvinia minima* las concentraciones de GSH, tanto en hojas como en ra3ces, se elevaron durante las primeras horas de exposici3n a Pb^{2+} para luego sufrir una disminuci3n en tiempos de exposici3n prolongados, no obstante, este comportamiento ha sido reportado en otras especies, incluyendo *Fontinalis antipir3tica*, *Lactuca sativa* var., *Longifolia* y *Triticum eastivum* L cuando fueron expuestas a altas concentraciones de Cd^{2+} (Bruns, 2001; Maier *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que el aumento en la concentraci3n de Glutati3n potencialmente disminuye la toxicidad del Pb^{2+} , ya sea enlaz3ndose al metal o sirviendo de sustrato para la

biosíntesis de fitoquelatinas (Saxena, 2003); además, otra función sería como antioxidante, de tal forma que reduzca la toxicidad de los radicales libres provocados por este metal.

Al exponer los tejidos de *S. minima* a plomo se observó que tanto la producción de GSH como en la actividad enzimática de GS se incrementaron significativamente con respecto a las plantas control. En las hojas, la mayor producción de GSH se alcanzó en las primeras 6 h al igual que el incremento en la actividad enzimática de GS, mientras que, la expresión del gen *SmGS* se vio afectada entre 1 h y 3 h de exposición al metal. De igual forma, se pudo observar que en las raíces la expresión de *SmPCS* también se vio afectada, sugiriendo una respuesta coordinada entre ARNm-proteína-producto.

Es importante señalar que en el incremento en la actividad enzimática de GS solo se ha sido reportado en respuesta a la exposición de Cd^{2+} (Rüegsegger *et al.*, 1990; Rüegsegger *et al.*, 1992; Klapheck *et al.*, 1995); por lo que resulta relevante mencionar que un helecho acuático como *S. minima*, al ser expuesto a Pb^{2+} es capaz de incrementar la actividad de GS en 2.8 y 2.0 veces (con respecto al control) en hojas y en raíces, respectivamente.

Por otra parte, los estudios moleculares han demostrado que el Cd^{2+} estimula la expresión de genes involucrados en la síntesis de glutatión. Además, en *A. thaliana* al ser expuesta a Cd^{2+} se encontró que los niveles de transcritos del gen GS incrementaron alrededor de 2.0 veces (Harada *et al.*, 2002). De igual forma, en las raíces de *B. juncea* la exposición a Cd^{2+} incrementó la concentración del ARNm para enzimas relacionadas con la biosíntesis de glutatión (Schäfer, 1998). Asimismo, en el presente trabajo se logró por primera vez el aislamiento de un fragmento del gen

SmGS de un helecho acuático flotante, que permitió observar las diferencias que existen en la expresión del gen *SmGS*, tanto en las hojas como en las raíces de *S. minima* al ser expuesta a Pb^{2+} .

Finalmente, al analizar si existía correlación entre la acumulación de plomo y las variables estudiadas (producción de GSH, actividad enzimática de GS y expresión transcripcional del gen *SmGS*), no se observó una correlación significativa en ninguno de los tejidos de *S. minima* evaluados, este comportamiento también ha sido descrito por Zhao *et al.*, (2003) en *P. vittata*. Sin embargo, estos resultados demuestran que la presencia de plomo puede incrementar la producción de GSH y la actividad enzimática de GS, así como también, modificar la expresión del gen *SmGS* en los tejidos de *S. minima*, sugiriendo que el Pb^{2+} afecta la biosíntesis de GSH e influencia su participación en las diferentes formas de su metabolismo; tales como, el acoplamiento en el sistema ascorbato peroxidasa, antioxidante para neutralizar el efecto de los radicales libres, o bien sirviendo de sustrato para la síntesis de Fitoquelatinas.

4.6. Conclusión

La presencia de Pb^{2+} tanto en las raíces como en las hojas de *S. minima* s, produce cambios visibles en la expresión del gen *SmGS* e incrementa la actividad enzimática de GS aumentando la producción de GSH; sin embargo, la acumulación de Pb^{2+} no esta correlacionado con estas variables, lo cual sugiere que la biosíntesis de GSH no solo puede participar como precursor de PC, si que también participa de manera indirecta en la respuesta al estrés provocado por este metal.

4.7. Referencias bibliográfica

- Alscher R.G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum* 77: 457–64.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bruns I., Sutter K., Menge S., Neumann D., Krauss G. (2001) Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *Journal of Plant Physiology* 158: 79–89.
- Chen J. and Goldsborough P.B. (1994) Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Journal of Plant Physiology* 106, 233–9.
- Chen D., Toone W.M., Mata J., Lyne R., Burns G., Kiviven K., Brazma A., Jones N., Bähler J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular and Cellular Biology* 14: 214–229.
- Di Toppi L.S., Lambardi M., Pazzagli L., Cappugi G., Durante M., Gabbriellini R. (1999) Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. *Plant Science* 137: 119–129.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E., Zenk M. (1989) Phytochelatins the heavy metal binding peptides of plants are synthesized from glutathione by specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (Phytochelatase synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 6838-6842.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1987) Phytochelatins, a class of heavy heavy-metal-binding peptides from plant, are functionally analogous to metallothioneines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 439-443.

- Harada E., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 159: 445–448.
- Kim S., Shin Y., Kim K., Park E., Sa J., Lim C. (2003) Regulation of the Gene Encoding Glutathione Synthetase from the Fission Yeast. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 326–331.
- Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. (1995) Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 107: 515–21.
- Leustek T., Martin M., Bick J., Davies J. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 141–65.
- Maier E.A., Matthews R.D., McDowell J.A., Walden R., Ahner B.A. (2003) Environmental Cadmium Levels Increase Phytochelatin and Glutathione in Lettuce Grown in a Chelator-Buffered Nutrient Solution. *Journal of Environmental Quality* 32: 1356–1364.
- Marrs K. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127–58.
- Meister A. (1995) Glutathione. *Methods in Enzymology* 251: 3–13.
- Noctor G. and Foyer C. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–79.
- Rüeggsegger A., Schmutz D., Brunold C. (1990) Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology* 93: 1579–1584.

- Rüegsegger A. and Brunold C. (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiology* 99: 428–433.
- Saxena A., Saxena D.K., Srivastava H. (2003) The influence of glutathione on physiological effects of lead and its accumulation in *Moss sphagnum squarrosum*. *Water, Air, and Soil Pollution* 143: 351–361.
- Schneider S. and Bergmann L. (1995) Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco. *Botanica Acta* 108: 34–40.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D.L., Polle A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H_2O_2 content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Journal Plant Physiology* 127: 887–892.
- Sun Q., Wang X., Ding S., Yuan X. (2005) Effects of Interaction Between Cadmium and Plumbum on Phytochelatins and Glutathione Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology* 47: 435–442.
- Tukendorf A. (1993) The role of glutathione in detoxification of cadmium and excess copper in spinach plants. *Ac. Physiology. Plant* 15: 175–183.
- Vögeli-Lange R. and Wagner G.W. (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science* 114: 11–18.
- Xiang C., Werner B.L., Christensen E.M., Oliver D.J. (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* 126: 564–574.
- Zhao F.J., Dunham S.J., Mc Grath S.P. (2002) Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist* 156: 27–31.

Capítulo 5

5.1. Discusiones generales

Nuestros datos sugieren que la acumulación y desintoxicación de Pb^{2+} en *S. minima* es el resultado de una regulación compleja entre tejidos, genes y enzimas de diversos procesos simultáneos, entre ellos la biosíntesis de Glutación (GSH) y la polimerización de fitoquelatinas (PC).

El Pb^{2+} induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de las plantas, tal producción depende de la intensidad del estrés, de periodos repetidos de exposición al metal, de la especie y de la edad de la planta (Verma y Dubey, 2003). Además, los iones de Pb^{2+} inducen peroxidación de lípidos disminuyendo los niveles de ácidos grasos saturados de las membranas, asimismo, tienen alta afinidad por los grupos $-SH$ presentes y esenciales para la actividad enzimática, así como por los grupos $-SH$ que otorgan estabilidad a diferentes moléculas (Sharma y Dubey, 2005), esto permite suponer que la síntesis de tioles puede ser afectada por la presencia de Pb^{2+} .

Nuestros resultados confirmaron que el helecho acuático *Salvinia minima* es capaz de capturar y acumular Pb^{2+} en sus tejidos. Estos resultados mostraron que a pesar de la alta acumulación del metal en *S. minima*, las plántulas no manifestaron cambios visibles ocasionados por la toxicidad, ya que en las hojas no se encontraron cambios significativos en la síntesis de clorofilas, contrario a lo mencionado en estudios anteriores acerca de los efectos del Pb^{2+} (Prasad y Prasad, 1987). Conociendo las características tóxicas del Pb^{2+} resulta interesante estudiar las estrategias por las cuales, la acumulación e inactivación del metal son tan eficientes en *S. minima*.

Dentro de la células, los mecanismos antioxidantes pueden dividirse en dos grupos, estos son los antioxidantes no enzimáticos como ascorbato, carotenoides, glutatión, etc. y enzimas antioxidantes incluyendo catalasas, peroxidasas, deshidroascorbato reductasas, superóxido dismutasas, enzimas del ciclo ascorbato-glutatión y algunas enzima relacionadas con el metabolismo del glutatión (Verma y Dubey, 2003).

Por otra parte, algunas plantas activan la vía de asimilación del azufre para proporcionar una mayor fuente de cisteína y glutatión, con el fin de llevar a cabo la biosíntesis de PC (Harada, 2001). Existen antecedentes, donde la biosíntesis de GSH-PC y la presencia intracelular de metales conducen a una tolerancia del mismo. Se ha demostrado que el incremento en la síntesis de GSH aumenta la tolerancia a Cd (Noctor *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003). Mientras que en el caso de las PC, se han reportado incrementos evidentes de la tolerancia a Cd²⁺ al estudiar modelos como cultivos celulares de tomate (Chen *et al.*, 1994; Inohue *et al.*, 1991), o bien modelos considerados tolerantes como *Rauvolfia serpentina* (Grill *et al.*, 1987), *Brassica juncea* (Haag-Kerwer *et al.*, 1999) y *Datura innoxia* (Delhaize *et al.*, 1989).

En las raíces de *S. minima*, la acumulación del metal fue mayor y más rápida, comparado con las hojas; probablemente por tener mayor área de exploración y por ser el primer órgano de contacto con la solución. En dicho tejido la presencia del Pb²⁺, aumentó la síntesis de GSH, asimismo se observaron cambios en la expresión del gen *SmGS*; sin embargo, la correlación entre la biosíntesis de GSH y la acumulación de Pb²⁺ no están directamente asociados. La síntesis de PC aumento su concentración alcanzando su máxima producción hasta por 12 h, mientras que los cambios en la expresión del gen *SmPCS*

se observó durante los primeros 60 min. Estos resultados permiten sugerir que primero la biosíntesis de GSH es afectada para asegurar la producción del metabolito ya sea como un mecanismo antioxidante no enzimático o como un precursor de las fitoquelatinas; segundo, el aumento en la biosíntesis de PC forma parte de un mecanismo de desintoxicación celular en las raíces (Figura 23A)

En las hojas de *S. minima*, la acumulación de Pb^{2+} fue menor, lo que sugiere a las raíces como la primera barrera de defensa y/o protección, impidiendo la libre traslocación del metal y disminuyendo su toxicidad, probablemente evitando los efectos sobre el contenido de las clorofilas. Sin embargo, el metal afectó la síntesis de GSH, mostrando cambios en la expresión del gen que codifica para GS en las primeras horas, incrementando la actividad enzimática de GS y aumentando la producción de GSH. En cuanto a la síntesis de PC, se observaron cambios del gen *SmPCS* durante las primeras 24 h, mientras que la actividad enzimática y la producción de PC alcanzaron su mayor producción a las 12 h (Figura 23B). Cabe aclarar que la producción de fitoquelatinas en hojas fue menor que la observada en raíces.

La acumulación de Pb^{2+} genera una serie de respuestas entre las cuales se encuentran la expresión de genes, las actividades enzimáticas y la formación de productos de desintoxicación o antioxidantes. En *S. minima* la presencia de Pb^{2+} en los tejidos afecta la respuesta celular, como la inducción de genes que codifican para proteínas involucradas en la traducción de señales como calmodulina (CDPK-8) o las proteínas ricas en leucina (RPS2) (Uh-Ramos, 2008) o posiblemente se este implementando una respuesta coordinada entre la producción de GSH y PC, ya que la biosíntesis de GSH probablemente asegura la producción de este tripéptido para ser metabolizado como

precursor de PC o bien como un agente antioxidante para participar en la desintoxicación de Pb^{2+} .

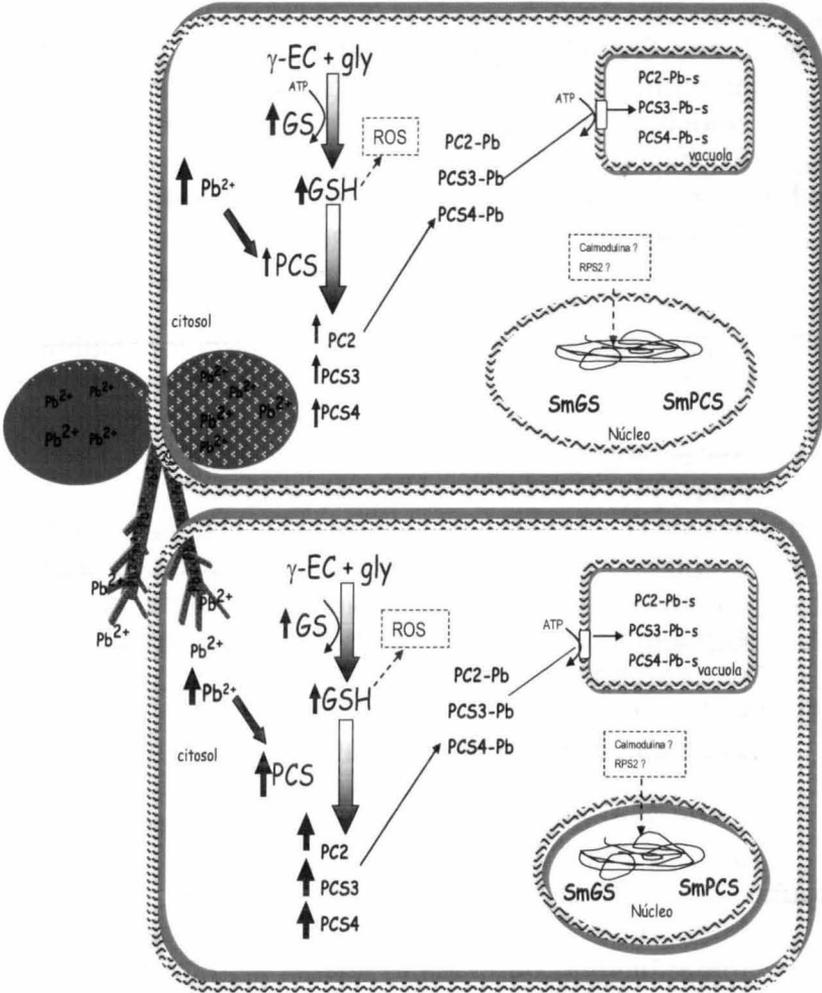


Figura 23. Modelo propuesto del mecanismo de respuesta a Pb^{+2} en raíces y hojas de *S. minima*.

se observó durante los primeros 60 min. Estos resultados permiten sugerir que primero la biosíntesis de GSH es afectada para asegurar la producción del metabolito ya sea como un mecanismo antioxidante no enzimático o como un precursor de las fitoquelatinas; segundo, el aumento en la biosíntesis de PC forma parte de un mecanismo de desintoxicación celular en las raíces (Figura 23A)

En las hojas de *S. minima*, la acumulación de Pb^{2+} fue menor, lo que sugiere a las raíces como la primera barrera de defensa y/o protección, impidiendo la libre traslocación del metal y disminuyendo su toxicidad, probablemente evitando los efectos sobre el contenido de las clorofilas. Sin embargo, el metal afectó la síntesis de GSH, mostrando cambios en la expresión del gen que codifica para GS en las primeras horas, incrementando la actividad enzimática de GS y aumentando la producción de GSH. En cuanto a la síntesis de PC, se observaron cambios del gen *SmPCS* durante las primeras 24 h, mientras que la actividad enzimática y la producción de PC alcanzaron su mayor producción a las 12 h (Figura 23B). Cabe aclarar que la producción de fitoquelatinas en hojas fue menor que la observada en raíces.

La acumulación de Pb^{2+} genera una serie de respuestas entre las cuales se encuentran la expresión de genes, las actividades enzimáticas y la formación de productos de desintoxicación o antioxidantes. En *S. minima* la presencia de Pb^{2+} en los tejidos afecta la respuesta celular, como la inducción de genes que codifican para proteínas involucradas en la traducción de señales como calmodulina (CDPK-8) o las proteínas ricas en leucina (RPS2) (Uh-Ramos, 2008) o posiblemente se este implementando una respuesta coordinada entre la producción de GSH y PC, ya que la biosíntesis de GSH probablemente asegura la producción de este tripéptido para ser metabolizado como

precursor de PC o bien como un agente antioxidante para participar en la desintoxicación de Pb^{2+} .

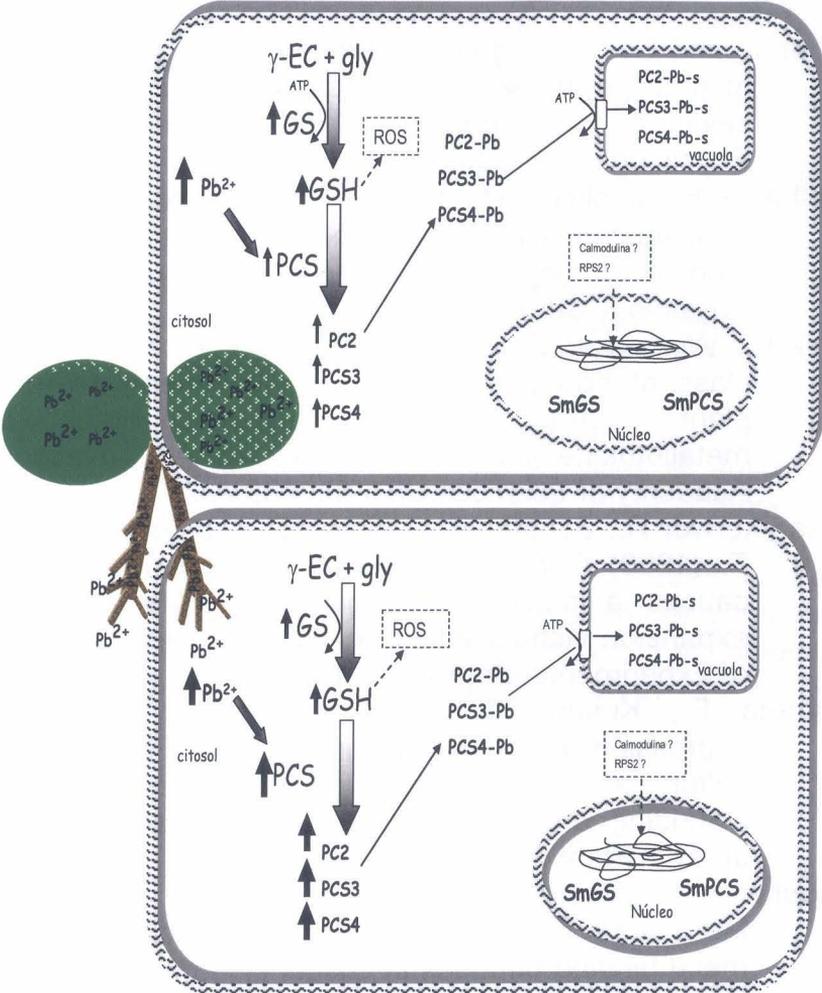


Figura 23. Modelo propuesto del mecanismo de respuesta a Pb^{+2} en raíces y hojas de *S. minima*.

5.2. Referencias bibliográficas

- Chen J. and Goldsbrough P. (1994) Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Journal Plant Physiology* 106: 233-239.
- Delhaize E., Jackson P., Lujan L., Robinson N. (1989) Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycine synthesis *Datura innoxia* binding whit Cadmium. *Journal Plant Physiology* 89: 700-706.
- Grill E., Winnacker E., Zenk M. (1987) Phytochelatins, a class of heavy heavy-metal-binding peptides from plant, are functionally analogous to metallothioneines. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 439-443.
- Haag-kerwer A., Schäfer H.J., Heiss S., Walter C., Rausch T. (1999) Cadmium exposure in Brassica Juncea causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 50: 1827-1835.
- Harada E., Kusano T., Sano H. (2001) Differential expression of genes encoding enzymes envolved in sulfur assimilation pathways in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Plant Physiology* 156: 272-276.
- Inouhe M., Mitsumune M., Tohyama H., Joho M., Murayama T. (1991) Contributions of cell wall and metal binding peptides in suspension cultured cell of tomato. *Botanical Magazine Tokyo* 104: 217-229.
- Kim S., Shin Y., Kim K., Park E., Sa J., Lim C. (2003) Regulation of the Gene Encoding Glutathione Synthetase from the Fission Yeast. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 36: 326-331.
- Noctor G. and Foyer C. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review*

of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49:249-79.

- Prassad D.D. and Prassad A.R. (1987) Altered δ -aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoideum*). *Journal Plant Physiology* 127: 241-249.
- Sharma P. and Dubey R. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- Uh Ramos J.D.R. (2008) aislamiento e identificación de genes expresados diferencialmente en respuesta al plomo en *Salvinia minima* tesis de maestria Centro de investigación científica de Yucatán, Mérida, Yuc., Méx : 95.
- Verma S. and Dubey R. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Zhu Y.L., Pilom-Smits E.A., Tarum A.S., Jouanin L., Ferry N. (1999) Overexpression of glutathione synthetase in *Indian mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance. *Journal Plant Physiology* 119: 73-79.

Capítulo 6

6.1. Conclusiones generales

Salvinia minima es capaz de acumular Pb^{2+} las en raíces y en las hojas después de ser expuesta a este metal y son las raíces donde hay mayor concentración del metal.

La presencia de Pb^{2+} en los tejidos de *Salvinia minima* modifica la producción de glutatión incrementando la síntesis de fitoquelatinas, las cuales fueron identificadas como PC2, PC3 y PC4.

El Pb^{2+} acumulado en los tejidos de *Salvinia minima* es capaz de modificar la expresión del gen *SmPCS*, incrementar la actividad enzimática de PCS y como consecuencia la producción de PC

El Pb^{2+} acumulado en los tejidos de *Salvinia minima* es capaz de modificar la expresión del gen de *SmGS*, incrementar la actividad enzimática de GS y como consecuencia la producción de GSH.

En *Salvinia minima*, la biosíntesis de GSH probablemente asegura la producción de este metabolito para ser usado como precursor de PC o bien como agente antioxidante. La biosíntesis de PC es empleada en la desintoxicación de Pb^{2+} , posiblemente a través de una respuesta coordinada entre ambos procesos.

Perspectivas

La capacidad del helecho acuático *Salvinia minima* de biosintetizar GSH y PC para contrarrestar los efectos tóxicos del plomo, permiten plantear perspectivas enfocadas a estudiar:

- La caracterización y elucidación de las estructuras químicas de los complejos formados con SH-Pb²⁺ a través de resonancia magnética nuclear (NMR).
- La participación de la enzima corriente arriba γ -glutamil-L-cisteína sintetasa que se encarga de la síntesis del precursor de GSH.
- Las reacciones de asimilación de azufre que son catalizadas por ATP sulfurilasa, APS sulfotransferasa, tiosulfonato reductasa, sulfito reductasa y cisteína sintetasa.
- La participación de GSH en el estrés por plomo como el acoplamiento en sistemas oxido-reducción y xenobióticos, entre otros.
- Otros mecanismos de desintoxicación celular involucrados en la tolerancia a metales pesados.

Anexo I

Medio de cultivo hidropónico Hoagland modificado (Hoffman *et al.*, 2003).

Macronutriente	mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
KNO_3	6.0
NaHPO_4	1.0
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.015
Micronutrientes	mM
FeCl_3	0.010
H_3BO_3	0.045
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.020
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.004
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.007
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002
Ajustar pH 6.7 con KOH	

Resembrar cada 15 días, lavando las plantas con agua destilada 2 veces y desinfectando las charolas con hipoclorito de sodio (cloralex) al 5% durante 20 min.

Anexo II

Protocolo para el análisis de tioles por HPLC

PASO	Tiempo minutos	Flujo mL/min	% A solvente	% B Solvente	CURV
0	0	1	98	2	0
1	5	1	92	8	1
2	5	1	60	40	1
3	10	1	60	40	0
4	5	1	10	90	1
5	3	1	0	100	0
6	2	1	98	2	1

Solución A Metanol 10% y 2.5 mL ácido acético

Solución B metanol Metanol al 90% y 2.5 mL ácido acético

CURV: 0= gradiente isocrático, 1=gradiente lineal.