



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Expresión de genes transportadores y
caracterización fisiológica de *Salvinia minima* en
respuesta a litio.**

Tesis que presenta

Eduardo Gómez Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Eduardo Gómez Hernández** titulado “**Expresión de genes transportadores y caracterización fisiológica de *Salvinia minima* en respuesta a litio**”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación fisiología vegetal molecular y genómica, en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández** , dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de agosto de 2023.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Eduardo Gómez Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en **la Unidad de Biotecnología** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del **Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández** durante los años 2021 y 2023.

Agradecimiento

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han sido fundamentales en el desarrollo de mi proyecto de investigación y en mi formación académica. Su apoyo y colaboración han sido invaluable, y deseo reconocer sus contribuciones de la siguiente manera:

En primer lugar, agradezco a la unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por brindarme la oportunidad de utilizar sus instalaciones para llevar a cabo mi proyecto de investigación. Su apoyo ha sido esencial para el éxito de este trabajo.

Asimismo, quiero extender mi reconocimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme la beca número 800657, la cual ha sido un respaldo fundamental para realizar mis estudios de posgrado. Su apoyo financiero ha sido de gran importancia para el desarrollo de mi investigación.

Un agradecimiento especial va dirigido al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, quien me recibió en su grupo de investigación y confió en mí para llevar a cabo este trabajo. Su paciencia ante mis dificultades, valiosa dirección y apoyo han sido una fuente inagotable de motivación y curiosidad a lo largo de estos dos años. Su experiencia y educación han sido un pilar fundamental en mi crecimiento académico.

Asimismo, agradezco a mi comité tutorial, conformado por el Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, el Dr. José Luis Andrade Torres, el Dr. Daniel González Mendoza, el Dr. Enrique Sauri Duch y el Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, por sus valiosas aportaciones en cada seminario y por la revisión de mi tesis. Su feedback ha enriquecido considerablemente este trabajo de investigación.

No puedo dejar de agradecer a los técnicos M.C. María de Fátima Medina Lara e Ing. Roberth Armando Us Santamaría por su apoyo en la cuantificación de litio y por brindarme pláticas sobre el correcto uso del equipo IRGA, respectivamente.

Agradezco también el apoyo en el laboratorio durante los experimentos realizado por los técnicos Dra. Leticia Peraza Echeverría y M.C. Gaspar Eduardo Castillo Castro.

Un agradecimiento especial a las Dras. Gabriela Fuentes y Ariana Chan por su colaboración en la revisión de los protocolos de investigación y de la escritura de la tesis. Su aporte ha sido muy valioso.

Quiero dedicar palabras de agradecimiento a mis compañeros y amigos, en especial a la Dra. Amaranta Girón, M.C. Yessica Bautista, M.C. Erick Arroyo, M.C. Nelly Oviedo e Ing. Tiffany Cevallos. Con ustedes he compartido despacho, laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos, los cuales no tienen precio. Agradezco todo el tiempo que me han brindado, las enriquecedoras conversaciones científicas y su respaldo y amistad. Gracias por estar presentes en los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud. Sin su colaboración y apoyo, este proyecto y mi formación académica no habrían sido posibles. Su contribución ha sido fundamental en mi desarrollo profesional, y estoy sinceramente agradecido por todo lo que han hecho por mí

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi amado padre, Andrés Gómez Núñez. Aunque la distancia física nos separó, siempre sentí tu presencia en cada paso de mi camino. Sé que estarías compartiendo conmigo la emoción de este logro, como lo haces desde algún lugar especial. Agradezco infinitamente la educación que me brindaste y por haberme moldeado en una buena persona. Todos mis logros te pertenecen, papá.

Gracias, papá.

A mi querida madre, Antonia Hernández Ruíz, quien ha sido una parte fundamental de este logro. Tu apoyo y amor incondicional han sido el motor que me impulsó en cada desafío. Eres una mujer que me llena de orgullo, y sin tus consejos, ayuda, compañía y amor, no estaría aquí. No hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que has dado por mí.

Mil gracias, madre.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
Resumen	ix
Abstract.....	x
CAPITULO I	1
1. 1 Introducción.....	1
1.1.1 Contaminación por metales pesados en México.....	3
1.1.2 Impacto en el medioambiente de la extracción de litio en México.....	3
1. 2 Efectos y esencialidad del litio en las plantas.....	4
1.2.1 Absorción y bioacumulación	5
1.2.2 Efectos tóxicos	6
1. 3 Fitorremediación.....	9
1.3.1 Plantas terrestres hiperacumulación de metales pesados.....	14
1.3.2 Plantas acuáticas hiper-acumuladoras de metales pesados	15
1.3.3 Mecanismos de desintoxicación de metales pesados en plantas hiperacumuladoras	18
1.3.4 El transporte de los metales pesados al interior de las plantas y después al interior de la célula. 19	
1.3.5 Transporte de los metales pesados	20
1. 4 Litio.....	22
1.4.1 Mecanismos de reacción, solubilidad y efectos en la salud	23
1.4.2 Efectos del Li en la salud y sus efectos en el agua	24
1. 5 Taxonomía de <i>Salvinia minima</i>	24

1.6	Antecedentes investigativos	26
1.6.1	<i>Salvinia minima</i> como planta hiper-acumuladora	28
1.7	Justificación.....	29
1.8	Problema a resolver	31
1.9	Pregunta de investigación.....	31
1.10	Hipótesis.....	32
1.11	Objetivo general.....	32
1.11.1	Objetivos específicos.....	32
1.12	Estrategia experimental	32
CAPITULO II		34
2.1	Efecto del litio en la fisiología y bioquímica de <i>Salvinia minima</i>	34
2.2	Materiales y métodos	35
2.2.1	Material vegetal	35
2.2.2	Evaluación de la capacidad fitorremediadora	35
2.3	Cuantificación de litio en hojas y raíces de <i>Salvinia minima</i>	36
2.3.1	Lavado de las muestras.....	36
2.4	Parámetros fisiológicos y bioquímicos estudiados durante el tratamiento	36
2.4.1	Peso seco.....	36
2.5	Determinación de parámetros fisiológicos	38
2.5.1	Determinación de fluorescencia de clorofila	38
2.5.2	Curvas O-J-I-P	38
2.5.3	Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	38
2.5.4	Determinación de las relaciones hídricas (potencial hídrico (Ψ_w), osmótico ($\Psi\pi$) y turgencia (Ψ_p)) en hojas de plantas de <i>Salvinia minima</i> durante la exposición a Li.	39
2.5.5	Cuantificación de Fuga de Electrolitos (integridad de membrana) en plantas de <i>Salvinia minima</i> durante la exposición a Li.....	40

2.6	Análisis estadísticos	41
2.7	RESULTADOS	41
2.7.1	Acumulación de Li en hoja y raíz de <i>Salvinia mínima</i>	41
2.7.2	Toma de Li por la planta entera	42
2.7.3	Contenido de Li en el medio de cultivo.....	43
2.8	Parámetros de crecimiento.....	44
2.8.1	Efecto del Li sobre la biomasa de <i>Salvinia mínima</i>	47
2.8.2	Efecto del Li sobre la longitud de raíz	48
2.8.3	Efecto del Li sobre el número de hojas.....	49
2.9	Parámetros fisiológicos.....	50
2.9.1	Efecto del Li sobre la fotosíntesis en <i>Salvinia mínima</i>	50
2.9.2	Efecto del Li en la eficiencia fotoquímica del PS II (Fv/Fm) en plantas de <i>Salvinia mínima</i> . 51	
2.9.3	Rendimiento cuántico de transporte de electrones del PS II en plantas de <i>Salvinia minima</i> ante la exposición al Li.	52
2.9.4	Efectos de Li sobre los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides). 54	
2.9.5	Efecto del Li en las relaciones hídricas (potencial hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_π) y turgencia (Ψ_p) de plantas de <i>Salvinia minima</i>	55
2.9.6	Fuga de electrolitos en plantas de <i>Salvinia minima</i> expuesta a Li	57
2.9.7	Curva de dosis respuesta en los diferentes parámetros de crecimiento	58
2.9.8	Correlación entre la acumulación de Li y diferentes parámetros de crecimiento	60
2.10	Discusión de resultados	62
2.11	CONCLUSIÓN.....	69
CAPÍTULO III		71
3.1	Introducción.....	71
3.2	Anotación funcional de las ESTs.....	72

3.3	Análisis de las rutas metabólicas (KEGG PATHWAY)	74
3.4	Caracterización de la expresión de los genes candidatos en respuesta a Li en hojas y raíces de <i>Salvinia minima</i>	76
3.5	Materiales y métodos	77
3.5.1	Material Vegetal.....	77
3.5.2	Método de Extracción de RNA y síntesis de DNAC	78
3.5.3	Diseño de oligos	78
3.6	Resultados.....	79
3.6.1	Calidad de ARN extraído.	79
3.7	Caracterización de la expresión de los genes: ATPasa P3A (JZ898246), ABCC (JZ898275), Antiporter Na ⁺ /H ⁺ (JZ898280) y ABCG (JZ898244) en <i>Salvinia minima</i> en respuesta a Li.....	81
3.7.1	Gen SmATPasa P3A	81
3.7.2	Gen SmABCC	81
3.7.3	Gen SmAntiporter Na ⁺ /H ⁺	82
3.7.4	Gen SmABCG	83
3.8	Discusión de resultados	83
3.9	Conclusión.....	87
Capítulo IV	89
4.1	Discusión general	89
4.2	Conclusiones Generales	91
Perspectivas	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismos y complejos ligandos auxiliares en el transporte y el secuestro de iones metálicos.....	9
Figura 1.2. Estrategias de la fitorremediación en plantas como la fitodregadación, rizofiltración, fitoextracción y fitovolatilización.	12
Figura 1.3. Las diferentes estrategias de las plantas para la absorción de un metal en relación a su concentración en el suelo.....	15
Figura 1.4. Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la detoxificación y tolerancia de metales en plantas.....	19
Figura 1.5. Esquema de los sistemas de transporte de metales esenciales y tóxicos.	21
Figura 1.6. Litio	22
Figura 1.7. Localización geográfica de sitios con yacimientos de Li en México.....	23
Figura 1.8. Aspectos morfológicos de <i>Salvinia minima</i>	26
Figura 1.9. Metodología general del proyecto de tesis.....	33
Figura 2.1 Contenido de Li en raíz y en hoja, expuestas a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de LiCl.....	42
Figura 2.2. Toma de litio en los diferentes puntos de tiempo y en las diferentes concentraciones de LiCl por la planta entera.	43
Figura 2.4. Apariencia de las hojas de <i>Salvinia mínima</i> expuesta a las diferentes concentraciones de LiCl a diferentes tiempos de incubación.	46
Figura 2.5. Apariencia de las raíces de <i>Salvinia mínima</i> a las diferentes concentraciones de LiCl a diferentes tiempos de incubación.....	47
Figura 2.6. Efecto de Li en peso seco de plantas de <i>Salvinia mínima</i> tanto en A) raíz y en B) hojas, en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de LiCl.....	48
Figura 2.7. Efecto de Li en longitud de las raíces en plantas de <i>Salvinia mínima</i> en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones en comparación con plantas control.....	49
Figura 2.8. Número de hojas de plantas de <i>Salvinia minima</i> expuestas a diferentes concentraciones de LiCl durante 96 horas.....	50
Figura 2.9. Efecto de Li en la tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de <i>Salvinia mínima</i> ante la exposición de diferentes concentraciones de LiCl en función del tiempo de exposición.....	51
Figura 2.10. Efecto del Li en la fluorescencia de la clorofila Fv/Fm (PS II), en plantas de <i>Salvinia minima</i> en función del tiempo de incubación. Las barras corresponden a la media \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación.....	52

Figura 2.11. Rendimiento cuántico del PSII en plantas de <i>Salvinia minima</i> expuestas a diferentes concentraciones de LiCl y después de 96 h de exposición.	54
Figura 2.12. Contenido de pigmentos fotosintéticos durante la exposición a LiCl a) clorofila a b) Clorofila b c) Clorofilas totales d) carotenoides.	55
Figura 2.13. Efecto del Li en las relaciones hídricas: potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de turgencia, de las plantas de <i>Salvinia minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de Li.	57
Figura 2. 14. Fuga de electrolitos A) raíz B) hoja de plantas de <i>Salvinia minima</i> expuestas a concentraciones de (0.1, 1, 10 y 20 mM de LiCl)..	58
Figura 2. 15. Curva de dosis respuesta en los diferentes parámetros, a) longitud de raíz, b) peso seco de raíz, c) número de hojas, d) peso seco de hoja, e) fotosíntesis, f) Fv/Fm.....	60
Figura 3.1. Calidad de RNA extraído en hoja de plantas de <i>Salvinia mínima</i> , se observan las bandas ribosomales 18S y 28S, tanto en la planta control como las plantas expuestas a 0.1 y 20 mM de LiCl en los diferentes tiempos de exposición.	80
Figura 3.2. Calidad de RNA extraído en Raíz de plantas de <i>Salvinia mínima</i> se observa las bandas Ribosomales 18S y 28S, tanto en la planta control como las plantas expuestas.	80
Figura 3.3. Expresión del gen SmATPasa P3A (JZ898246) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de <i>Salvinia mínima</i>	81
Figura 3.4. Expresión del gen SmABCC (JZ898275) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de <i>Salvinia mínima</i>	82
Figura 3.5. Expresión del gen antiporter SmNa ⁺ /H ⁺ (JZ898280) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de <i>Salvinia mínima</i>	82
Figura 3.6. Expresión del gen SmABCG (JZ898244) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de <i>Salvinia mínima</i>	83
Figura 4.1. Propuesta de Modelo de trabajo del posible papel de los transportadores estudiados en la toma y traslocación de litio en planta de <i>Salvinia minima</i>	96
Figura 4.2. Propuesta de la serie de eventos que llevan a <i>Salvinia minima</i> a manejar concentraciones bajas de litio y sobrevivir vs serie de eventos que llevan a <i>Salvinia minima</i> a la muerte al ser expuesta a altas concentraciones del metal	97

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Ventajas y limitaciones de la fitorremediación (Singh et al., 2003; Eapen et al., 2007).	13
Tabla 1.2. Plantas acuáticas neotropicales con potencial de acumulación de metales (Caviedes et al., 2016).	16
Tabla 1.3. <i>Salvinia minima</i> como planta hiperacumuladora de metales pesados.	18
Tabla 1.4. Características de <i>Salvinia minima</i>	24
Tabla 2.1. Factor de dilución empleado en la cuantificación de Li en muestras digeridas mediante método de digestión ácida.	37
Tabla 3.1. Información de los 141 ESTs clasificadas a partir de la biblioteca de SSH de <i>Salvinia minima</i> expuesta a una solución 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 12 h.	72
Tabla 3.2. Información de los oligos correspondiente a cada uno de los genes que codifican para transportadores y el gen de referencia para RT-PCR.	82
Tabla 3.3. Concentración y pureza de la extracción de ARN en hoja de <i>Salvinia minima</i> a diferentes tiempos de exposición a diferentes concentraciones de Li.	83
Tabla 3.4. Concentración y pureza de la extracción de ARN en raíz de <i>Salvinia minima</i> a diferentes tiempos de exposición a diferentes concentraciones de Li.	84

ABREVIATURAS

LiCl: Cloruro de Litio

Li: Litio

mg/L: miligramos por Litro

mg/g: miligramos por gramo

ppm: partes por millón

ppb: partes por billon

mM: milimolar

μ M: micromolar

mol/m² día: moles por metros cuadrados por día

Ψ_w : potencial hidrico

$\Psi\pi$: potencial osmótico

Ψ_p : potencial de turgencia

F_o: fluorescencia inicial

F_m: fluorescencia máxima

F_v/F_m: Fluorescencia variable / fluorescencia máxima.

mg Li g⁻¹ PS: miligramos de litio por gramo de biomasa (en peso seco)

mg g⁻¹ PF: miligramos por gramo de peso fresco

F de E: fuga de electrolitos

ms: milisegundos

μ S: microsegundos

P_n: Fotosíntesis

PQ: Plastoquinona libre

QA: Quinona primaria

QB: Plastoquinona B

RNA: Ácido ribonucleico.

PSI: Fotosistema I

PSII: Fotosistema II

RESUMEN

La contaminación por metales es un problema global que plantea desafíos significativos para la humanidad. La acumulación de metales, como el litio (Li), es particularmente preocupante debido a su naturaleza no degradable, lo que lleva a la bioacumulación y biomagnificación, causando efectos adversos tanto en el medio ambiente como en la salud pública. Sin embargo, la fitorremediación, el uso de plantas para remover y estabilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos, ofrece una solución potencial a este problema.

Este estudio se centró en el potencial de fitorremediación de *Salvinia minima* para eliminar Li de entornos contaminados. Se utilizaron cuatro concentraciones experimentales diferentes de LiCl (0,1; 1; 10 y 20 mM) para evaluar la capacidad de la planta para remover Li. Los resultados revelaron que *Salvinia minima* no solo absorbió Li a través de sus raíces, sino que también lo translocó a sus hojas.

La distribución de Li dentro de la planta varió según la dosis aplicada. A concentraciones más bajas ($\leq 2,47$ mg Li g⁻¹ PS), no se observaron cambios significativos en la fotosíntesis, daño en el PSII (fotosistema II) o relaciones hídricas. Sin embargo, se observaron alteraciones en el contenido de pigmentos fotosintéticos y un aumento en la fuga de electrolitos. Además, se observó una mayor expresión de dos genes transportadores de iones (ABCC y ABCG).

Por otro lado, concentraciones más altas de Li endógeno ($\geq 9,06$ mg Li g⁻¹ PS) resultaron en una disminución en la tasa fotosintética, daño en el PSII, relaciones hídricas comprometidas, disminución en el contenido de pigmentos y un mayor aumento en la fuga de electrolitos, lo que finalmente llevó a la muerte de las plantas. Además, la expresión de los genes ABCC y ABCG se incrementó aún más, lo que sugiere su participación en el transporte y compartimentalización del litio como mecanismo de respuesta al estrés por litio.

En conclusión, *Salvinia minima* demostró un potencial notable como hiperacumuladora de Li logrando acumular hasta 18 mg g⁻¹ PS. Este estudio contribuye a nuestra comprensión de las estrategias de fitorremediación para abordar la contaminación por metales, destacando la importancia de seleccionar especies de plantas adecuadas y optimizar las técnicas de remediación para mitigar los efectos adversos de la contaminación por metales en el medio ambiente y la salud humana.

ABSTRACT

Metal pollution is a global issue that possess significant challenges to humanity. The accumulation of metals, such as lithium (Li), is particularly concerning due to its non-degradable nature, leading to bioaccumulation and biomagnification, causing adverse effects on both the environment and public health. However, phytoremediation, the use of plants to remove and stabilize organic and inorganic contaminants, offers a potential solution to this problem.

The present study focused on the phytoremediation potential of *Salvinia minima* to remove Li from contaminated environments. Four different experimental concentrations of LiCl (0.1, 1, 10, and 20 mM) were used to assess the plant's ability to remove Li. The results revealed that *Salvinia minima* not only absorbed Li through its roots, but also translocated it to its leaves.

The distribution of Li within the plant varied on the applied dose. At lower concentrations (≤ 2.47 mg Li g⁻¹ DW), no significant changes were observed in photosynthesis, PSII (photosystem II) damage, or water relations. However, there were alterations in the content of photosynthetic pigments and an increase in electrolyte leakage. Furthermore, the expression of two ion transporter genes (ABCC and ABCG) was upregulated.

Conversely, higher concentrations of endogenous Li (≥ 9.06 mg Li g⁻¹ DW) resulted in a decline in photosynthetic rate, damage to PSII, impaired water relations, reduced pigment content, increased electrolyte leakage, and ultimately, plant death. Additionally, the expression of the ABCC and ABCG genes was further enhanced, suggesting their involvement in the transport and compartmentalization of Li, as a response mechanism to Li stress.

In conclusion, *Salvinia minima* demonstrated remarkable potential as a hyperaccumulator of Li, achieving accumulation of up to 18 mg g⁻¹ DW. This study contributes to our understanding of phytoremediation strategies for addressing metal pollution, highlighting the importance of selecting suitable plant species and optimizing remediation techniques to mitigate the adverse effects of metal contamination on the environment and human health.

CAPITULO I**1.1 Introducción**

La vida en el planeta se sustenta en las relaciones que hay entre los seres vivos y su ambiente, las cuales generan un intercambio continuo de materia y energía. Por esto, ningún ser puede vivir aislado e independiente del ambiente que lo rodea, desenvolviéndose de esta manera en un ecosistema, el cual no es más que un conjunto de interacciones que se dan entre los organismos y el ambiente donde viven, pudiendo ser este una laguna, una ciudad, una isla, un bosque, un campo, entre otros (Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, estos son contaminados por metales pesados, entre otros contaminantes, los cuales perturban fácilmente su frágil equilibrio, teniendo como resultado la disminución de la productividad, pérdida de la biodiversidad y una seria amenaza para la salud humana.

La contaminación por metales afecta directamente a todos los ecosistemas, se ha demostrado científicamente que además de causar algunos de los problemas ambientales más graves, la exposición a metales pesados en determinadas circunstancias es la causa de la degradación y muerte de vegetación, animales e incluso al hombre (cuidemos al planeta, 2018).

De los 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales y varios de estos metales no tiene una función biológica conocida por lo que la contaminación ambiental por estas sustancias es numerosa. Hay que tener en cuenta que estos metales tienen un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones. El problema surge cuando prolifera su uso industrial y su empleo creciente en la vida cotidiana, termina por afectar la salud y la agricultura.

Sin embargo, es crucial resaltar el creciente problema de contaminación relacionado con el Li, debido a su extenso uso en la producción de pilas y baterías utilizadas en dispositivos electrónicos. La preocupación radica en el manejo inadecuado de estas pilas al final de su vida útil, ya que una gran cantidad de ellas son desechadas junto con la basura doméstica, eventualmente encontrando su camino hacia vertederos. Con el transcurso del tiempo, estas pilas se descomponen, influidas por las condiciones climáticas y la fermentación de la materia orgánica circundante, lo que resulta en la corrosión de sus carcasas. Esta corrosión, a su vez, libera los diversos elementos químicos presentes en las pilas, incluido el Li. A través de un

proceso de lixiviación, estos compuestos químicos llegan al suelo y pueden incluso contaminar cuerpos de agua, como ríos, generando una problemática ambiental de considerable magnitud.

Por tanto, la peligrosidad de este metal es mayor al no ser biológicamente degradables. Una vez emitidas, las baterías de Li, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. El Li es un ion altamente tóxico y, se han informado ya diversos casos de intoxicación en pacientes tratados con este metal para el tratamiento profiláctico de los trastornos bipolares. Un aumento en los niveles séricos de Li: 1,5 a 2,5 mmol/L en sangre causan una intoxicación moderada; 2,5 a 3,5 mmol/L, una intoxicación severa y más de 3,5 mmol/L amenaza contra la vida (Domínguez et al., 2006). Por lo que, si hay contaminación por Li en los mantos acuíferos o en los ríos, ese metal puede llegar a las comunidades provocando problemas de toxicidad y salud ambiental. También se puede llegar a ingerir Li por medio de plantas o animales contaminados y provocar síntomas de intoxicación.

En 2018 las declaraciones de Bacanora Lithium consistían en que en el estado de Sonora era posible extraer casi 20 mil toneladas de este recurso para el 2020. Sin embargo, la emergencia sanitaria y el cambio en el viraje político del país han retrasado el proceso de explotación que ahora se calcula comenzará en el 2024 con casi 50 mil toneladas anuales en vez de las 17 mil que supuestamente la empresa consideraba para su primera etapa (Bnamericas, 2021), lo que significa que la proyección de la producción se ha incrementado a más del doble.

El problema de estas minas a gran escala es que son muy grandes y la velocidad de reacción es constante, por lo que pueden quedar drenajes y suelos contaminados por cientos de miles de años.

Sin embargo, algunas especies de plantas han desarrollado mecanismos fisiológicos y bioquímicos para minimizar los efectos de su contaminación por metales. Los diferentes mecanismos incluyen la capacidad de controlar la acumulación de metales en las raíces y la translocación de éstos a los diferentes órganos vegetativos. Cuando las plantas son capaces de acumular y translocar altos niveles de contaminantes en raíces, tallos y hojas, se denominan hiperacumuladoras (Raskin et al., 1994; Cunningham & Ow, 1996). La fitorremediación engloba un grupo de técnicas en el uso de especies vegetales y sus microorganismos asociados para extraer, acumular, inmovilizar o transformar los contaminantes del suelo (Barceló y Poschenriender, 2003; Ghosh & Singh, 2005; Pilon-Smits, 2005). La fito-extracción, también llamada fito-acumulación, emplea la capacidad de las plantas para absorber y extraer el

contaminante del suelo, principalmente metales y acumularlos en sus tallos y hojas (Kumar *et al.*, 1995).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la eficiencia de *Salvinia minima* de tomar litio de medios acuosos y de acumularlo en sus tejidos, así como entender el mecanismo a través del cual este helecho acuatico es capaz de acumular este metal en sus tejidos

1.1.1 Contaminación por metales pesados en México

En nuestro país, a partir de 1960 se registró un estimado de liberación al ambiente aproximadamente de 635 mil toneladas tan solo de pilas, cuyo contenido incluye metales medianamente tóxicos. Pero también otros metales de alta toxicidad, esto aunado a los altos volúmenes de desechos presentan una gran toxicidad y un gran peligro. Tal es el caso de las 145,918 toneladas de dióxido de manganeso (Mn), 1,232 toneladas de mercurio (Hg), 22,063 toneladas de níquel (Ni), 20,169 toneladas de cadmio (Cd) y 77 toneladas de compuestos de Litio (Li). Estas sustancias representan casi el 30% del volumen total de residuos, aproximadamente 189,382 toneladas de materiales tóxicos para el periodo comprendido tan sólo entre 1960 y 2003 (Castro & Díaz, 2004).

1.1.2 Impacto en el medioambiente de la extracción de litio en México

Tener una de las reservas de litio más grande del mundo localizado en la Bacadéhuachi, Sonora, colocará a México a la cabeza en la explotación de este valioso mineral, si bien su extracción puede tener un impacto ambiental de grandes costos.

El también llamado “oro blanco” es clave para hacer frente al cambio climático en la transición a energías renovables que tiene un gran potencial de reducir de las emisiones de dióxido de carbono, pero sus impactos a la salud, la biodiversidad y el medioambiente “están por verse” (Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente; AIDA, 2020).

Con una reserva estimada de más de 243 millones de toneladas de litio elemento vital para las baterías de teléfonos móviles, ordenadores portátiles y vehículos eléctricos, el proyecto ubicado en la Sierra Madre Occidental supone la mina más grande del mundo, según un estudio publicado en agosto de 2019 por Mining Technology.

La extracción del litio sólo será posible durante dos décadas, antes de que se terminen las reservas, pero los impactos a futuro no tienen fecha de término, el primer impacto a considerar es la pérdida de biodiversidad en la zona donde se hará el desmonte para construir la planta, incluso se pueden llegar a perder especies que no sabíamos que tenemos y eso ya tiene un impacto ambiental directo a la biodiversidad, este impacto fragmenta el hábitat que es zona de distribución del jaguar.

En segundo lugar, se debe tomar en cuenta el estrés hídrico al que se será sometida la cuenca del río Yaqui localizado en el estado de Sonora que cruza de norte a sur, ya que para hacer los filtrados y la extracción de las arcillas (que están sedimentadas al litio) se va a tener que utilizar una gran cantidad de agua (alrededor de 1.7 millones de litros de agua para producir 1 tonelada de litio). Que desafortunadamente se está agotando.

El tercer impacto va ser la salud ambiental que, como ya se mencionó anteriormente un aumento en los niveles séricos de litio provoca problemas de toxicidad, por lo que “si existe contaminación por litio en los mantos acuíferos o en los ríos, ese litio puede llegar a las comunidades con las serias consecuencias de toxicología y salud ambiental.

1. 2 Efectos y esencialidad del litio en las plantas.

El litio en el suelo está presente principalmente en forma de sales o minerales a niveles traza en la parte inorgánica del suelo (~20 a 30 ppm) y en menor medida en la parte inorgánica que está presente en las aguas superficiales (~2 ppm) y en aguas del mar (~0.2 ppm), en concentraciones muy bajas (ANCEFN, 2017). Por esta razón, las concentraciones de litio en los organismos vivos son en general extremadamente bajas.

Respecto a la esencialidad del litio para la función metabólica, cabe destacar que aún no se han descrito sistemas de coordinación que lo utilicen como ion central en moléculas biológicas. Aunque el litio se encuentra distribuido tanto en las células como en tejidos de organismos vivos e interacciona con moléculas orgánicas en forma similar a macro constituyentes iónicos, como sodio y potasio. La importancia del litio para el crecimiento de las plantas aun es un tema en discusión ya que su rango de acción benéfico es muy estrecho, en concentraciones muy bajas puede estimular el crecimiento, pero a concentraciones elevadas provoca síntomas de toxicidad, como la pérdida de pigmentos fotosintéticos. Por ejemplo: Sneva (1979) reporta que a 15 y 60 mg kg⁻¹ Li se inhibió el crecimiento de plántulas de *Agropyron desertorum*, *Poa ampla* y *Agropyron inerme*.

Está claro que en bajas concentraciones (en el rango de ppb) afecta una serie de eventos fisiológicos y estimula el crecimiento en las plantas, pero aún se desconoce si este es un nutriente esencial para el desarrollo de las plantas (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2012, Schrauzer, 2002). Aunque algunas plantas como la avena (Li *et al* 2009) tienen la capacidad de absorber y tolerar cantidades considerables de litio, el cual participa en el metabolismo fotosintético, la resistencia estomática, los ritmos circadianos y rutas metabólicas variadas (Jiang *et al.*, 2014), también se ha visto que en bajas concentraciones se mejora la productividad del cultivo (Bakhat *et al.*, 2020) en este estudio se observaron que la exposición de LiCl a 20, 40, 60 y 80 mg kg⁻¹ a las espinacas incrementó la biomasa de la raíz en un 64, 27, 15 y 12% bajo tierra. Sin embargo, la reducción en la biomasa de los brotes se notó en un 15, 17 y 16 % con 40, 60 y 80 mg kg⁻¹ de LiCl, respectivamente, excepto con 20 mg kg⁻¹ que aumentó la biomasa de los brotes en un 16 % (Bakhat *et al.*, 2020). Sin embargo, para otras especies el litio puede ser tóxico, (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2012). Observaron que la aplicación 50 mg dm⁻³ de LiCl a *Zea mays*, en medio hidropónico, inhibió la biomasa de la raíz en un 31%. De manera similar, la biomasa de brotes de girasol y *Zea mays* se redujo en 27 y 32 % respectivamente bajo la misma concentración y medio.

1.2.1 Absorción y bioacumulación

El litio es uno de los elementos moderadamente abundantes y está presente tanto en suelo como en el agua, por lo que es esperado que las plantas puedan absorberlo fácilmente del ambiente circundante, las plantas lo absorben en la raíz y es traslocado a la parte aérea donde queda inmóvil, se mueve lentamente a través del floema de forma similar al calcio (Piñero *et al.*, 2016). Sin embargo, la absorción, acumulación y tolerancia depende mucho de la especie vegetal y se ven usualmente reflejadas en la biodistribución de litio en el cuerpo vegetal. Mientras que los cultivos en suelo acumulan litio en tallos y hojas, los cultivos hidropónicos muestran una mayor distribución en raíz. Algunas especies, como la avena, son bioacumuladoras de litio (Li *et al* 2009), mientras que otras presentan niveles de absorción realmente bajos, tal es así que un aumento en la biodisponibilidad de litio puede ser nocivo para el crecimiento de las plantas (Hawrylak., 2012).

El mecanismo completo de absorción del litio en plantas es aún desconocido, pero algunos estudios sugieren que se comportaría de modo similar a otros metales alcalinos como el sodio y el potasio.

1.2.2 Efectos tóxicos

Un aumento en la acumulación de Li puede provocar una variedad de efectos nocivos en las plantas manifestados por la reducción en la tasa de crecimiento, la formación de regiones necróticas, anomalías en el desarrollo del polen y alteraciones en la estructura de las raíces, al ser éstas las primeras en entrar en contacto con los iones. Otros efectos de la toxicidad por exceso de litio es la clorosis foliar, esto por la disminución significativa en el contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides a niveles altos de 50, 200 y 400 mg kg⁻¹ de LiCl (Jiang *et al.*, 2018), ambos pigmentos esenciales en la fotosíntesis. Otro estudio informó que los contenidos de clorofila (*a* y *b*) se redujeron significativamente en las plántulas de *Brassica carinata* en placas de Petri con un tratamiento con LiCl > 60 mM (Li *et al.*, 2009). La aparición de regiones necróticas o cloróticas podría deberse a la degradación de estos pigmentos o daños en la estructura misma de los cloroplastos.

Sin embargo, el mecanismo de acción tóxica del Li en el proceso de fotosíntesis u otras manifestaciones adversas es poco claro. Algunos de los efectos negativos podrían deberse al estrés oxidativo, ya que el Li potencia el proceso de peroxidación lipídica mediante la inactivación de antioxidantes endógenos y el aumento de los niveles de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, los cuales ocasionan un daño irreversible de diversas estructuras celulares. El Li puede sustituir hasta el 50% del contenido de potasio y reemplazar al magnesio en numerosas enzimas, alterando de esta forma varios procesos del metabolismo celular vegetal o incluso la expresión génica (Piñero *et al.*, 2016). Esto sucede debido a que el Li posee la característica llamada relación diagonal que cuando los elementos químicos vecinos comparten similitudes químicas en la tabla periódica como la densidad de carga siendo el caso del Li con el magnesio.

Los efectos biológicos del Li son variados estudiados realizados por Li causa más toxicidad en el medio hidropónico en comparación con el suelo, tal como se reporta en plantas de *Zea mays* donde su valor de EC₅₀ fue menor en bajo exposición a LiCl (88,18 ppm) en medio hidropónico, pero fue de 121,4 ppm en medio de suelo (Shakoor *et al.*, 2022). *Lactuca sativa* tiene menor EC₅₀ frente a LiOH en el medio hidropónico. Además, la aplicación foliar de LiCl y Li₂SO₄ tienen valores de EC₅₀ más bajos en comparación con otros medios de exposición, pero ambas fuentes de Li (LiCl y Li₂SO₄) mostraron los mismos valores de EC₅₀ (24 y 25.6 ppm) en plantas de *Lactuca sativa*. Curiosamente, la toxicidad se relacionó inversamente con la tasa de crecimiento relativa en diferentes fuentes de Li, lo que indica que la adquisición de carbono puede mitigar los efectos directos e indirectos de la toxicidad del Li (Franzaring *et al.*, 2016). Un estudio

anterior documentó las diferencias en la toxicidad de Li resultantes de diferentes formas químicas de Li (Kalinowska *et al.*, 2013). Al crecer en cultivo hidropónico, el LiOH redujo el rendimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* var. *capitata*) a 20 ppm, mientras que los efectos del LiCl solo fueron significativos a una concentración de 50 ppm (Kalinowska *et al.*, 2013). Hawrylak-Nowak *et al.* informó que la aplicación de LiCl en medio hidropónico a 5 mg dm⁻³ aumentó la biomasa de maíz, pero redujo la biomasa de girasol, mientras que se ha informado que la concentración de Li por encima de 25 y 50 mg dm⁻³ reduce el crecimiento (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2012). Se observó una tendencia similar en otro estudio expuesto a LiCl en el que diferentes plantas mostraron varios valores de CE₅₀ en el mismo medio y niveles de Li como *Zea mays* (118 ppm), *Phaseolus vulgaris* (55 ppm) y *Fagopyrum esculentum* (47 ppm) respectivamente (Franzaring *et al.*, 2016). La respuesta variada de diferentes plantas a las fuentes de Li y al medio de exposición sugiere algunos pasos limitantes dependientes de la dosis en los procesos involucrados en la absorción, translocación y acumulación de Li por diferentes especies de plantas.

Los efectos biológicos del Li son variados tanto en el corto plazo, con cambios en vías de transducción de señales, como en el largo plazo, con cambios selectivos en la expresión de genes y patrones de comportamiento. Algunas de las acciones biológicas del Li pueden ser atribuidas a su poder polarizante por la capacidad que tiene este ion de modificar la distribución de carga de otro ion cercano, y su capacidad de desplazar y sustituir al sodio, potasio, magnesio y calcio, de sus sitios de unión a membranas o enzimas.

La respuesta de las plantas a metales no esenciales varía dentro de un gran espectro, el cual va desde la tolerancia hasta la toxicidad conforme aumenta la concentración del metal en cuestión. Dado lo anterior, las plantas deben controlar la concentración de estos metales dentro de sus células. Las plantas poseen una gran variedad de mecanismos que les permiten tanto la tolerancia como el balance iónico. Al respecto, existe un grupo relativamente pequeño de plantas que son capaces de secuestrar metales pesados en sus tejidos aéreos y pueden realizarlo a concentraciones muy altas, a estas plantas se les denomina hiperacumuladoras. De forma general, los principales mecanismos involucrados en la hiperacumulación de metales pesados son: a) toma de los metales mediante transportadores de metales en la membrana plasmática; b) detoxificación de los metales y quelación de los mismos en el citoplasma con diferentes ligandos tales como las fitoquelatinas, metalotioneínas y proteínas ligantes de metales; c) secuestro de los metales en la vacuola por transportadores localizados en el tonoplasto (Hall,

2002). El transporte a través de la membrana celular de las raíces es un proceso básico en la absorción de los metales y su movimiento a otros tejidos en la planta. La carga eléctrica, previene que los iones metálicos difundan libremente a través de las membranas celulares hacia el citosol, por esto el transporte iónico hacia las células debe estar mediado por proteínas de membrana que actúen como transportadores. En comparación con otros organismos, las plantas han expandido sus diferentes familias de transportadores involucrados en la toma y transporte de metales, lo cual les permite cumplir con las necesidades minerales de la planta y además mantener una homeostasis correcta. A la fecha, el entendimiento a nivel molecular de la incorporación de iones metálicos a las células vegetales, ha tenido un gran avance. Ya se han identificado y caracterizado un gran número de genes que codifican para transportadores de metales, entre estos podemos encontrar: ATPasas de metales pesados (HMAs - Heavy Metal ATPases), la familia de los facilitadores de difusión de cationes (CDF - Cation Diffusion Facilitator), proteínas tipo ZIPs (ZRT, IRT-like proteins) y los antiportadores de cationes (Williams *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2004); ZIP1-4, ZNT1 (Zinc Transporter), IRT1 (Iron regulated transporter-like proteins), COPT1 (Copper transporter family), LCT1 (Low-affinity cation transporter) localizados en la interfase membrana plasmática – citosol; ZAT (Zn transporter of *Arabidopsis thaliana*), del tipo ABC (ATP-binding cassette), AtMRP (Arabidopsis Multidrug Resistance Proteins), HMT1 (Heavy Metal Tolerance factor), CAX2 (Cation exchanger) en las vacuolas; y RAN1 (Responsive to Antagonist1) en los cuerpos de Golgi (Clemens, 2001). (Figura 1).

Dentro de las células vegetales, existe un mecanismo de detoxificación para los metales pesados mediante la formación de complejos con ligandos. Estos agentes quelantes contribuyen a reducir las concentraciones de metales en el citosol, logrando la detoxificación. En las plantas, los agentes quelantes principales incluyen fitoquelatinas (donadores de péptidos, oxígeno y nitrógeno), metalotioneínas (donadores de azufre), ácidos orgánicos (donadores de oxígeno) y aminoácidos (donadores de oxígeno y nitrógeno). Los ácidos orgánicos, como el citrato, malato y oxalato, desempeñan un papel importante en la tolerancia, transporte y acumulación de metales como Cd, Zn y Ni. Por ejemplo, el Ni puede formar complejos con ácido cítrico, málico y malónico Salt *et al.* (2002). En el caso de los aminoácidos, la histidina puede formar complejos con el níquel, y algunas especies de plantas hiperacumuladoras de níquel, como las del género *Alyssum*, se destacan por su producción de histidina libre, lo que contribuye a su capacidad de hiperacumulación de níquel (Krämer *et al.*, 1996).

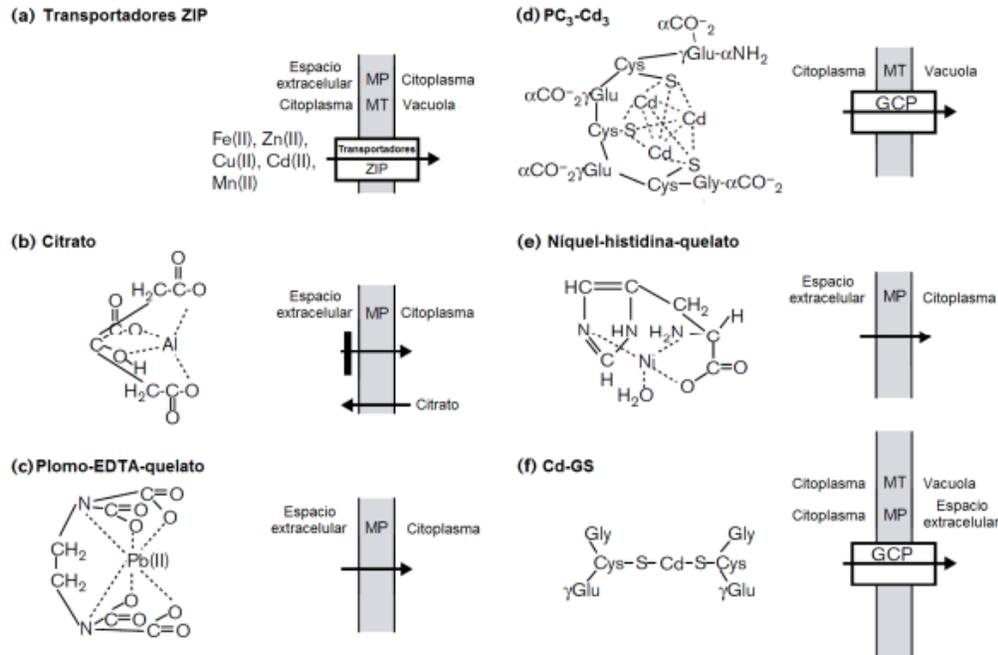


Figura 0.1. Mecanismos y complejos ligandos auxiliares en el transporte y el secuestro de iones metálicos. (a) Las familias de transportadores ZIP pueden acarrear iones metálicos a través de la membrana plasmática (MP) hacia las raíces y/o a través de la membrana (b) El citrato secretado puede formar complejos tetraédricos con iones metálicos, bloqueando su transporte hacia las raíces. (c) El EDTA puede formar complejos hexaédricos con iones metálicos, promoviendo su incorporación en las raíces y posterior translocación a lo largo de la planta. Otros ácidos orgánicos secretados por la planta usan el mismo mecanismo para adquirir nutrientes a partir del suelo. (d) Las fitoquelatinas, en este caso una de tipo trimérico PC_3 , pueden formar complejos tetraédricos con metales afines a grupos tioles, permitiendo así su transporte y secuestro en las vacuolas mediante la formación de complejos con glutatión. (e) La histidina (His) participa formando complejos tetraédricos con Ni (II) fomentando su incorporación, transporte, tolerancia e hiperacumulación. (f) Glutatión puede formar complejos con iones metálicos y posteriormente movilizarlos a través de la bomba de conjugado-S-glutatión (GCP) hacia las vacuolas o fuera de las raíces. Modificado de Meagher, 2000.

1.3 Fitorremediación

Cuando se supera un límite de contaminación, deben tomarse distintas medidas para poder remediar o restaurar el sitio afectado. El aumento de los costos y la limitada eficacia de los tratamientos fisicoquímicos han estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías. Por lo que, la fitorremediación representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos (Singh y Jain, 2003; Reichenauer y Germida, 2008).

La fitorremediación es una tecnología para disminuir, extraer y volatilizar de manera *in situ* o *ex situ* la concentración de diversos contaminantes orgánicos e inorgánicos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas.

La fitorremediación utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Kelley *et al.*, 2000; Miretzky *et al.*, 2004; Cherian y Oliveira, 2005; Eapen *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008). Se han identificado una amplia diversidad de especies que se emplean para este fin. Algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular metales pesados, reciben el nombre de hiperacumuladoras. Por definición, estas plantas deben acumular al menos 100 µg/g (0.01 % peso seco) de Cd y As; 1000 µg/g (0.1 % peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb; y 10 000 µg/g (1.0 % peso seco) de Mn (Watanabe, 1997; Reeves *et al.*, 1999; McGrath *et al.*, 2001; Kamal *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Reeves, 2006; Padmavathiamma & Li, 2007).

En años recientes, la fitorremediación ha emergido como una tecnología sostenible y rentable, ha captado la atención no sólo en el ámbito científico sino también en el comercial. Las plantas tienen la posibilidad de secuestrar diferentes metales pesados en sus raíces, tallos u hojas.

La fitorremediación comprende diferentes procesos: 1) la fitoextracción remueve metales pesados o contaminantes orgánicos del suelo acumulándolos en la biomasa de la planta, 2) la fitodegradación o fitotransformación usa a las plantas para permitir la degradación de contaminantes orgánicos, y 3) la rizofiltración, esta permite la remoción de contaminantes de medios acuosos por las raíces de las plantas a través de adsorción y/o absorción (Figura 2). Las plantas al ser usadas en rizofiltración requieren una gran superficie en sus raíces. La rizofiltración ya ha sido usada para la descontaminación de aguas con metales pesados tales como el Pb, Cd, Cu, Fe, Ni y Cr (Dushenkov *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1998). En muchos proyectos de remediación, el empleo de cobertura con especies vegetales, ocurre en la fase final del proceso de restauración, después de un tratamiento inicial para reducir los altos niveles de contaminación. Cuando la concentración de los elementos metálicos es relativamente baja, la fitorremediación puede ser, por sí sola, la estrategia económica y funcional más efectiva para ser usada, la cual también puede brindar una solución confiable a largo plazo. Por otro lado, muchos de los sitios contaminados con metales pesados, se encuentran también contaminados con compuestos orgánicos (muchos de ellos de tipo recalcitrante), las plantas pueden lograr la mineralización de dichas sustancias hasta componentes de menor o nula toxicidad (fitodegradación o fitotransformación). El objetivo principal de estas tecnologías es la descontaminación de suelos

y aguas en los cuales existe un nivel bajo/moderado de diferentes contaminantes. En estos casos, las técnicas tradicionales de remediación (excavación, relleno, bombeo y tratamiento de agua) son altamente costosas. La fitorremediación es una alternativa rentable pero su aplicación está limitada por el nivel de contaminación y la naturaleza del contaminante. La fitoextracción es una técnica de la fitorremediación en donde la planta remueve a los contaminantes de suelos, sedimentos o agua. Aquí es necesario contar con una especie caracterizada por generar una gran cantidad de biomasa, así como poder hiperacumular un metal. Los tejidos vegetales cosechados pueden ser posteriormente tratados mediante compactación, confinamiento, incineración, pirólisis o extracción líquida. El éxito de esta técnica requiere que el sistema contaminado, al final de la remediación, cumpla con las regulaciones ambientales. Además, desde un punto de vista económico, debe ser logrado de manera óptima a un bajo costo en comparación con una tecnología alterna o en comparación con el costo provocado por la falta de tratamiento al sistema contaminado (Robinson *et al.*, 2003).

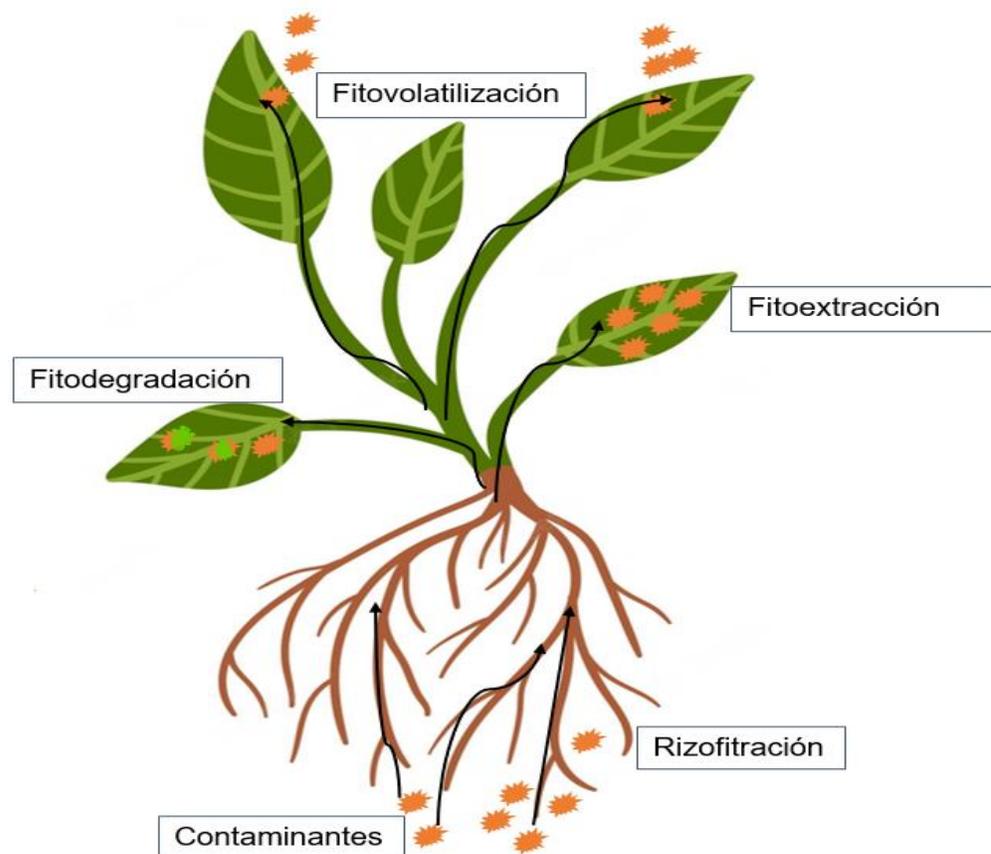


Figura 0.2. Estrategias de la fitorremediación en plantas como la fitodegradación, rizofiltración, fitoextracción y fitovolatilización.

La fitorremediación se basa en la capacidad de ciertas plantas no solo para sobrevivir en suelos con altos niveles de metales pesados, sino también para absorber y acumular estos metales en sus tejidos. Algunas de estas plantas, llamadas hiperacumuladoras, han sido identificadas y consideradas para su uso en fitorremediación. La idea de la "fitominería" surgió como una extensión de este concepto, proponiendo la posibilidad de cultivar plantas hiperacumuladoras con fines económicos, recuperando los metales acumulados al final del ciclo de cultivo.

Aunque tanto la fitorremediación como la fitominería comparten el principio de utilizar plantas para tratar la contaminación, difieren en sus objetivos finales: la primera busca la eliminación ambientalmente segura de metales de suelos y agua, mientras que la segunda busca la extracción rentable de metales valiosos.

Sin embargo, la fitorremediación enfrenta desafíos. Requiere mucho tiempo para lograr una descontaminación efectiva y está limitada en la variedad de metales que puede tratar y la distancia a la que las raíces pueden alcanzar. Además, generar suficiente biomasa para hacerla una tecnología rentable es difícil. Muchos metales a altas concentraciones pueden dañar el crecimiento de las plantas y afectar la producción de biomasa. Además, las plantas seleccionadas deben tener sistemas radiculares robustos y la capacidad de tolerar y acumular varios metales en su parte aérea.

Para mejorar esta técnica, es necesario un mayor entendimiento de los mecanismos de absorción y acumulación de metales en las plantas hiperacumuladoras. Además, la aplicación de herramientas como la biotecnología puede ser crucial para complementar y optimizar esta técnica.

Tabla 0.1. Ventajas y limitaciones de la fitorremediación (Singh et al., 2003; Eapen et al., 2007).

<i>Ventaja</i>	<i>Limitaciones</i>
<i>Puede ser aplicada in situ</i>	<i>Restringida a lugares de baja o moderada contaminación</i>
<i>Aplicable a una gran variedad de contaminantes orgánico e inorgánicos</i>	<i>Limitada por la solubilidad y disponibilidad del contaminante</i>
<i>Los costos de aplicaciones son menores que los métodos convencionales de remediación</i>	<i>Las plantas comúnmente usadas tienen un crecimiento lento y generan poca biomasa</i>
<i>Es fácil de implementar y mantener, no requiere de equipo costosos o personal altamente especializado.</i>	<i>La biomasa usada para la fitoextracción requiere un apropiado manejo como un residuo peligroso</i>
<i>Es una tecnología ambiental amigable, destructiva</i>	<i>Requiere un periodo largo de tiempo</i>
<i>Los subproductos generados en su implementación son menores que en las tecnologías convencionales</i>	<i>Los contaminantes pueden ser transferidos a otro medio, el medio ambiental y/o a la cadena alimenticia</i>
<i>Las plantas son sistemas autótrofos que requieren solo una pequeña entrada de nutrientes</i>	<i>La introducción de especies exóticas puede afectar la biodiversidad</i>

<i>Las plantas previenen las dispersiones de los contaminantes a través del agua y la erosión del suelo</i>	<i>Dependiente del clima y estado del tiempo</i>
---	--

1.3.1 Plantas terrestres hiperacumulación de metales pesados.

Un gran número de especies vegetales son capaces de tolerar las elevadas concentraciones de metales presentes en el medio ya sea en el suelo o en el agua esto debido que restringen su absorción y/o traslocación hacia la parte aérea, lo que les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas independientemente de la concentración metálica del suelo en un intervalo amplio (estrategia de exclusión según Baker, 1981).

Sin embargo, otras especies vegetales absorben los metales activamente a partir del medio y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea (estrategia acumuladora). Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, cuya concentración metálica refleja la del suelo (Baker, 1981).

Entre las acumuladoras se han reconocido diferentes grados de acumulación metálica, desde pequeñas elevaciones sobre el nivel basal hasta concentraciones excepcionalmente elevadas de metales pesados como el Ni, Zn y Co en su biomasa aérea, sin mostrar ningún síntoma visible de toxicidad (Brooks et al., 1977). Es más, algunas de estas plantas, no pueden completar sus ciclos vitales cuando crecen en suelos “normales” y se denominan plantas hiperacumuladoras (Figura 3). El término “hiperacumuladora” fue acuñado por Brooks y Reeves para referirse a plantas desarrolladas en campo capaces de acumular $>1.000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ de materia seca en algún tejido de su biomasa aérea (Brooks et al., 1977). De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces las concentraciones “normales” (Chaney et al., 2000). Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan $>10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Mn y Zn, $>1.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y $>100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd.

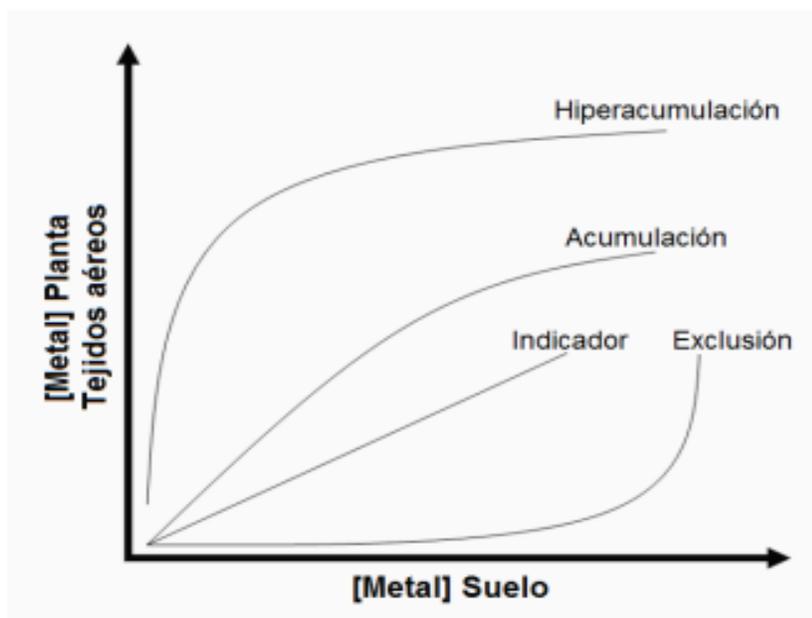


Figura 0.3. Las diferentes estrategias de las plantas para la absorción de un metal en relación a su concentración en el suelo. Modificado de Callahan et al., 2006.

Las especies hiperacumuladoras extraen de manera eficiente diferentes metales a partir de suelos metalíferos y posteriormente los transportan a los tejidos aéreos. En situaciones de aplicación en campo, después de un periodo de crecimiento estas especies hiperacumuladoras de metales pesados pueden ser cosechadas y deshidratadas, la biomasa resultante puede ser reducida a cenizas ya sea aprovechando energía en el proceso o no y posteriormente recuperar los metales en cuestión. Esta “fitominería” comprende la remoción de los metales *in situ* de diferentes sustratos contaminados con la ventaja económica extra de poder recuperar dichos metales de las plantas (Brooks y Robinson, 1998). La hiperacumulación de metales pesados fue observada por primera vez por Minguzzi y Vergano (1948), en especies del género *Alyssum*.

1.3.2 Plantas acuáticas hiper-acumuladoras de metales pesados

Las especies de plantas acuáticas hiperacumuladoras poseen una alta capacidad de absorber contaminantes orgánicos e inorgánicos, aunque los estudios se han enfocado principalmente en metales pesados. A continuación, se mencionan algunos usos de las macrófitas (Tabla 2). Sin embargo, es importante mencionar que la eliminación de contaminantes varía de una especie a otra, la cual depende de la concentración a la que es expuesta y el tiempo de exposición (Dhir et al., 2009).

Tabla 0.2. Plantas acuáticas neotropicales con potencial de acumulación de metales (Caviedes et al., 2016).

Especie	Tamaño	%R	PA	%R	PA	Fuente
		As	mg/kg	Fe	mg/kg	
<i>Eichrnia Crassipes</i>	μ, M, G	80	910	60-90	610	Rai, 2009; Alvarado et al, 2008,. Kumar et al.,2008; Marchand et al., 2008.
<i>Lemna minor</i>	μ, M, G	70	300	93	1420	Goswami et al, 2014; Uysai, 2013; Alvarado et al, 2008; Rahman et al., 2004b.
<i>Lemna gibba</i>	μ, M, G	13	1021			Sasmaz y Obek, 2009; Mkandawire et al, 2004 ^a ; Mkandawire et al, 2004b
<i>Azolla Caroliniana</i>	μ, M, G	25-60	284		538	Azizur y Hasegawa, 2011; Rahman y Hasegawa, 2011; Pandey, 2012
<i>Azolla filiculoides</i>	μ, M	40	60			Guimaraes, Aguiar, Oliveira, Silva, y Kara, 2012. Zhang et al., 2008
<i>Salvinia molesta</i>	μ, M	19	628	70		Bin Abd Razak et al.,2013; Ashraf, Maah y Yusoff, 2013; Ashraf et al., 2011.
<i>Salvinia natans</i>	μ, M, G		18	38-88		Dhir y Srivastava, 2011; Rahman, Hasegawa,Ueda, Maki y Rahman, 2008.
<i>Salvinia molesta</i>	μ, M	39-99		28	367	Asharf et al., 2013; Mishra, Dwivedi y Misra, 2010; Srivastav et al., 1994.
<i>Salvinia natans</i>	μ, M, G	45	10,6	50-66		Dhir y Srivastava, 2011. Rai, 2009. Rahman et al., 2008.
<i>Salvinia herzogii</i>	μ, M	70-99	2,4	90		Yysal, 2013; Martelo y Lara, 2012. Hadad et al. 2007.
<i>Azolla pinnata</i>	μ, G	93	260	94	505	Bharti y Kumar, 2012., Rai, 2009. Kumar et al., 2012. Rai y Tripathi, 2009.

<i>Typha latifolia</i>	μ, M, G	12	1,1	91-98		Schwindaman, Claste y Rodgers, 2014; Ye et al., 2001
<i>Typha domingensis</i>	G		16		11,5	Travaini et al., 2015; Bonanno, 2013.
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	μ, M	88-96	99	50	350	Marchand et al., 2010; Rai, 2009; Kumar et al., 2008; Rai et al., 1995. Kumar et al., 2009.
<i>Elodea nutalli/canadienses</i>	μ, M, G	72-86	18		2,2	Regier et al., 2013. Begum y Hari-Krishna, 2010; Nakada et al., 1979.

Existen otros estudios relacionados con la capacidad de acumulación de contaminantes de diversas plantas acuáticas, por ejemplo: la especie *Scirpus lacustris* tiene la capacidad de hiperacumular diferentes metales pesados en sus tejidos (Cd, Cu, Pb, Mg, Fe, Se, Cr), la especie *Lemna gibba* (Pb, As, Cu, Cd, Ni, Cr, Al, Fe, Zn, Mn), la especie *Azolla caroliniana* (Hg, Cr Sr, Cu, Cd, Zn, Ni, Pb, Au, Pt), la especie *Elatine trianda*, la especie *Polygonum punctatum* (Cu, Cd, Pb, Se, As, Hg, Cr, Mn), la especie *Myriophyllum aquaticum* acumulan diversos metales pesados en sus tejidos. *Ludwigina palustris* y la especie *Mentha aquatic* tienen la capacidad de hiperacumular los siguientes metales pesados en sus tejidos: Cu, Zn, Mn, Fe, Ni (Delgadillo et al., 2011).

Estudios realizados en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en el laboratorio de fisiología vegetal molecular, reportan el potencial que tiene *Salvinia minima* de eliminar diferentes metales pesados en soluciones acuosas, en la siguiente tabla se mencionan las concentraciones que fueron expuestas y su capacidad de acumulación de los diferentes metales estudiados (tabla 3).

Tabla 0.3. *Salvinia minima* como planta hiperacumuladora de metales pesados.

Especie	Metal	Concentración	Concentración endógena	Fuente
<i>Salvinia minima</i>	Pb ²⁺ Y As	160 µM Pb ²⁺ 400 µM AS	34 ± 5 mg Pb/g p.s. 1.05 ± 0.06 mg As/g p.s.	Hoffman <i>et al.</i> , 2004
<i>Salvinia minima</i>	Pb(NO ₃) ₂	40 µM	4.93 mmol mg ⁻¹ p.s.	Estrella <i>et al.</i> , 2009
<i>Salvinia minima</i>	Pb(NO ₃) ₂	80 mM	36.7 %	Trejo <i>et al.</i> , 2012
<i>Salvinia minima</i>	Ni ²⁺	40 µM	10.7 mg g ⁻¹ p.s.	Fuentes <i>et al.</i> , 2017
<i>Salvinia minima</i>	CuSO ₄ y Zn SO ₄	80 µM	6.9669 mg Cu/g p.s. 19.67 mg Zn/g p.s.	Carrillo <i>et al.</i> , 2017
<i>Salvinia minima</i>	Pb(NO ₃) ₂	40 µM	34.8 µmol g ⁻¹ p.s.	Leal <i>et al.</i> , 2017

1.3.3 Mecanismos de desintoxicación de metales pesados en plantas hiperacumuladoras

Las plantas tienen diferentes mecanismos de respuesta ante la presencia de compuestos tóxicos como los metales pesados. Entre ellos, destacan los mecanismos de mineralización, solubilización, acumulación, quelación y translocación. Algunos son pasivos, como adsorción por exclusión y otros son activos, es decir, que requieren energía metabólica para llevarse a cabo, como la acumulación, traslocación o relocalización. La traslocación es un tipo de alteración de un patrón de compartimentalización del metal, es decir, algunas plantas translocan o transfieren el exceso de metal a las hojas viejas, otras limitan el transporte de la raíz al tallo (Reed, 1990).

El mecanismo de translocación en especies hiperacumuladoras, como primer paso es que la partícula del metal se adhiere a la pared celular (adsorción), y se introduce a través de la membrana de las células de las raíces (absorción). Para posteriormente realizar la quelación en vacuolas (internalización) y a su vez tener la capacidad de transportar hacia los siguientes brotes.

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción y translocación. Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados son las siguientes (Hall, 2002) (Figura 4).

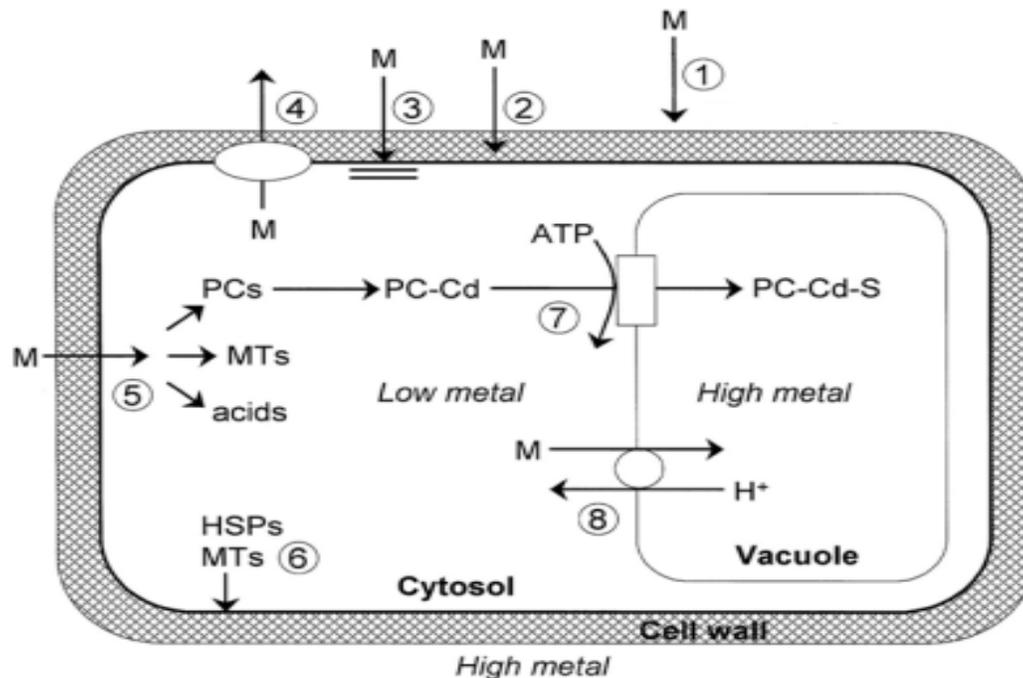


Figura 0.4. Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la detoxificación y tolerancia de metales en plantas. 1) Restricción del movimiento del metal a las raíces por micorrizas. 2) Unión a la pared celular y exudados de las raíces. 3) Entrada del flujo reducido frente a la membrana plasmática. 4) Salida activa dentro del apoplasto. 5) Quelación en citosol por varios ligandos. 6) Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de tensión. 7) Transporte del complejo PC-Cd dentro de la vacuola (Hall, 2002).

1.3.4 El transporte de los metales pesados al interior de las plantas y después al interior de la célula.

La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico. La pared de la raíz posee cargas negativas, debido a la presencia de grupos carboxilos, que interactúan con las cargas positivas de los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica.

Una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligamentos específicos dentro de la vacuola. Donde se van a almacenar los iones metálicos. Estos iones metálicos son transportados de manera activa al interior del tonoplasto como iones libres o como complejos quelantes metal-moléculas.

Está documentado, que la vacuola constituye uno de los principales mecanismos de desintoxicación 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 (Hall, 2002). Por otra parte, el metabolismo del azufre ha sido reportado como uno de los mecanismos más importantes en la desintoxicación de metales pesados (Estrella, 2008; Jozefczak *et al.*, 2012).

1.3.5 Transporte de los metales pesados

El daño por metales pesados. Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para frenar la toxicidad de los metales pesados entre los que se incluyen la retención en la membrana plasmática, el bloqueo de la entrada y el transporte, la síntesis de glutatión, fitoquelatinas, la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como las proteínas de choque térmico (HSP), proteínas de embriogénesis tardía (LEA), entre muchas otras proteínas involucradas en diferentes mecanismos para contrarrestar los efectos dañinos de ROS (Gill & Tuteja, 2010).

Las plantas han desarrollado mecanismos para obtener metales esenciales del suelo, agua, así como para prevenir la entrada de estos elementos tóxicos (metales pesados). Por eso, tienen vastas familias de transportadores relacionados con la toma y expulsión de metales y su transporte hacia organelos. específicos. Entre estas familias de transportadores se encuentran distintos tipos “heavy-metal-transporting Ptype ATPase” (HMAs), “cation diffusion facilitator” (CDF), “natural resistance associated macrophage protein” (NRAMP), “iron regulated transporter-like protein” (ZIP) y “plant-specific Yellow Stripe1-Like family” (YSL) (Colangelo y Guerinot, 2006).

Dependiendo del metal y de su estado de oxidación, los metales pesados son transportados por algunos de estos tipos de familias de transportadores. Para los metales pesados considerados tóxicos no existen canales específicos de entrada por lo que, aprovechan la existencia de los transportadores para lograr entrar en la célula, desplazando en muchas ocasiones a metales u otros compuestos esenciales (Figura 1.5).

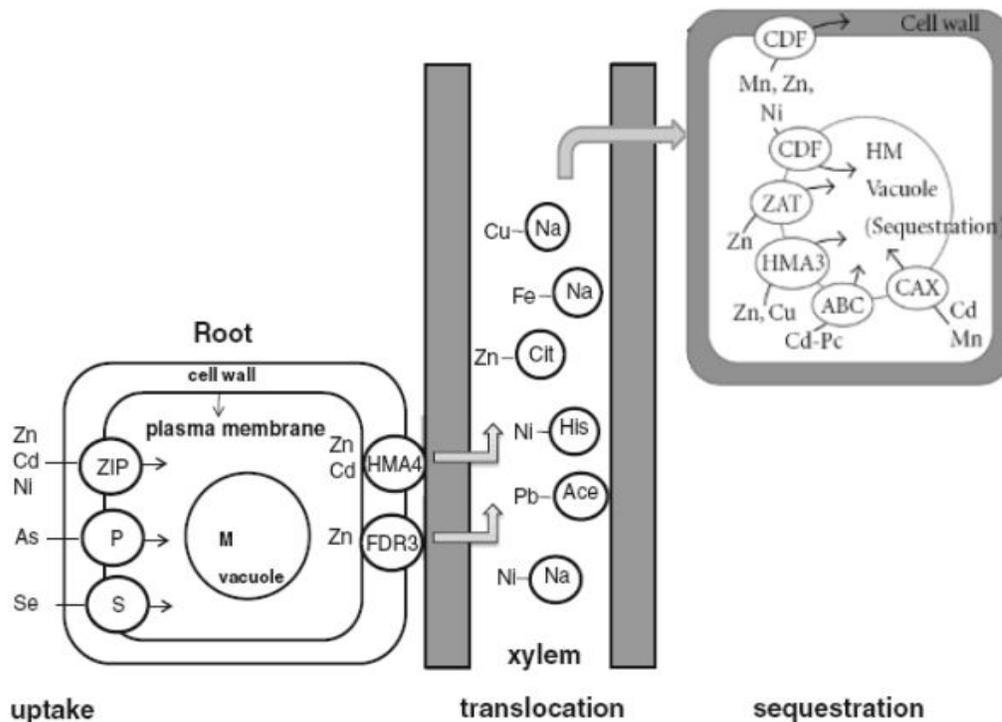


Figura 0.5. Esquema de los sistemas de transporte de metales esenciales y tóxicos (Zn, Cd, Ni, As, Se) relacionados con la entrada en la célula, la translocación a otras partes de la planta y la llegada a vacuolas. (Monferrán y Underlin, 2013 con algunas modificaciones).

Como pudiera ser el caso de Cd^{2+} o Ni^{2+} que logran ingresar en la célula por medio de la familia de los transportadores ZIP (Guerinot, 2000). Estas familias de transportadores (ZIP), también actúan en la translocación de metales a otros lugares de la planta. Donde pueden ser transportados (metales pesados) unidos a otras moléculas como la nicotinamida (NAD), aminoácidos como la histidina (his), sales como el citrato (cit), y acetato (ace) y compuestos con grupos tioles como el glutatión. Por ejemplo, el Cu^{2+} puede ser transportado por proteínas de la familia de HMAs, pero también puede ir unido a NA; el Zn^{2+} puede ser transportado por transportadores tipo ZIP y citrato; ¿el Fe^{2+} y Ni^{2+} pueden ser transportados por transportadores tipo ZIP y NAD; el Pb puede ser transportado por acetato y el As unido a grupos tioles y el Ni se puede transportar unido a his (Monferrán y Wunderlin, 2013).

Uno de los principales mecanismos que utilizan las plantas para bloquear la entrada de los metales pesados de acuerdo a lo publicado por Pérez (2015), es la precipitación o acomplejamiento del metal en la raíz, cambiando el pH de la rizosfera o exudando aniones como el fosfato. Otras opciones es el acomplejamiento con la pared celular o la membrana plasmática.

Esto además de que las plantas pueden bloquear la transcripción de transportadores para evitar la entrada del metal a la célula.

1.4 Litio

El **litio** es un elemento químico de símbolo **Li** y número atómico **3**. En la tabla periódica, se encuentra en el grupo 1, entre los elementos alcalinos. En su forma pura, es un metal blando, de color blanco plata, que se oxida rápidamente en aire o agua. Su densidad es la mitad de la del agua, siendo el metal y elemento sólido más ligero y presenta excelentes condiciones en la conducción del calor y la electricidad.

Al igual que los demás metales alcalinos es univalente y muy reactivo, aunque menos que el sodio, por lo que no se encuentra libre en la naturaleza. Acercado a una llama la torna carmesí pero, si la combustión es violenta, la llama adquiere un color blanco brillante.

Es empleado especialmente en aleaciones conductoras del calor, en baterías eléctricas. Por otro lado, respecto a sus sales, suelen emplearse en el tratamiento del trastorno bipolar.

El Li es un metal que se encuentra principalmente en salmueras naturales, pegmatitas, pozos petrolíferos, campos geotermales y agua de mar (Figura 7).

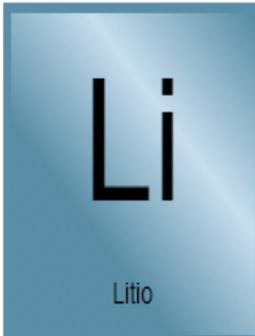
	Num Atómico	3
	Masa Atómica	6.941(2)2 4 3 5
	Conf. Elec.	1s ² 2s ¹
	Grupo	1
	Periodo	2
	Serie Química	Alcalinos



Figura 0.6. Litio

El Li ha alcanzado una gran importancia a nivel mundial, ante el pronóstico de que al petróleo no queda mucho tiempo de vida. Además, este hidrocarburo ha causado grandes daños al medio ambiente y ha potenciado el calentamiento global.

Por ello, el Li se ha convertido en un elemento esencial para el almacenamiento de energías renovables no convencionales como la eólica y solar, ya que se utiliza para la fabricación de

dispositivos recargables o celdas solares. No es que el litio genere energía, si no que la almacena.



Figura 0.7. Localización geográfica de sitios con yacimientos de Li en México. A la fecha se cuenta con tres yacimientos que contienen este mineral en los estados de Baja California, San Luis Potosí-Zacatecas y la más importante Sonora. Datos tomados del Servicio Geológico Mexicano (SGM)

1.4.1 Mecanismos de reacción, solubilidad y efectos en la salud

El agua del mar contiene aproximadamente 0.17 ppm de Li, los ríos contienen 3 ppb, mientras que el agua mineral contiene 0.05 mg de Li por litro. La cantidad de Li en las plantas es normalmente de entre 0.2 y 30 ppm.

1.4.1.1 Cómo reacciona del Li con el agua

El litio reacciona fuertemente con el agua formando hidróxido de Li e hidrógeno, altamente inflamables. Esta solución incolora es muy básica.

A 750° el Li reacciona con el hidrógeno para dar lugar al hidruro de Li (LiH). El polvo blanco que se forma libera gas hidrogeno tras una posterior reacción con el agua, en cantidades de 2800 litros por kilogramo de hidruro. De esta forma, el Li puede aplicarse como un modo de almacenamiento de hidrógeno.

1.4.1.2 Solubilidad del Li y de sus compuestos

El litio elemental no es muy soluble en agua, pero reacciona con esta.

Los elementos del Li como el cloruro de Litio, carbonato de Li, fosfato de Li, fluoruro de Li e hidróxido de Li son más o menos solubles en agua. El hidróxido de Li, por ejemplo, tiene una solubilidad de 129 g/L.

1.4.2 Efectos del Li en la salud y sus efectos en el agua

La tolerancia física difiere de un organismo a otro. En los años 40, algunos pacientes que utilizaron LiCl como sustituto de la sal, murieron.

El carbonato de Li se aplica en psiquiatría en dosis bastante próximas al máximo nivel de ingestión. Con concentraciones de 10 mg/L en sangre, se presenta un envenenamiento parcial, con 15 mg/L aparecen síntomas como confusiones y debilitación de la capacidad de expresión, y a 20 mg/L aparece riesgo de muerte.

1.5 Taxonomía de *Salvinia minima*

Tabla 0.4. Características de *Salvinia minima*.

Nombre común	Helecho de agua, helecho flotante, oreja de ratón.
Nombre científico	<i>Salvinia minima</i> .
Familia	Salviniaceae
Procedencia	América del sur, Centroamérica
Crecimiento	Rápido
Requerimiento lumínico	Medio a altos.
Tamaño	Alto entre 1 y 3 cm
Situación en agua	Planta flotante
Reproducción	Por división
pH del agua	De 5 a 8. Aguas duras o blandas
Temperatura	18 °C a 32 °C, óptimo de 24 °C a 28 °C
CO2	No es necesario

Salvinia minima es una de las 12 especies reconocidas de *Salvinia*. Originaria de América Central y del Sur y de las Antillas, se ha encontrado en estado silvestre en varios estados de América

del Norte. Existen dos especies registradas para la Provincia Biótica de la Península de Yucatán: *Salvinia auriculata* Aubl. y *Salvinia minima* Baker.

Estas dos especies tiene características muy similares por lo que es fácil confundirlas, entre ellos destacan sus hojas flotantes que tienen formas orbiculares redondeadas a elípticas, cubiertas por tricomas de 2-3 mm de largo, presentes en la parte superior y generalmente en grupos de cuatro. En *Salvinia auriculata*, los tricomas están fusionados en el ápice formando una estructura parecida a una jaula, mientras que en *Salvinia minima* los ápices de los tricomas están libres, no presentan raíces verdaderas, ya que han sido descritas como hojas sumergidas. Sin embargo, a partir de ahora le llamaremos raíces, las cuales presentan longitudes que van desde 1 a 4 cm de largo produciendo en cada nudo, dos hojas flotantes y la tercera hoja sumergida que está disectada en filamentos. Una de las características más importantes de esta planta es que tiene un tiempo de reproducción muy corto. En otras palabras, se reproducen con facilidad (Bates & Brown, 1981).

Las *Salvináceas* son plantas vasculares con un ciclo de vida haplodiplonte. Donde la alternancia de generaciones es bien definida, con esporofitos y gametofitos multicelulares e independientes, con esporas como unidad de dispersión en forma de espiral a lo largo del eje principal de los filamentos sumergidos como se puede observar en la figura (Figura 8). Normalmente habita en aguas estancadas poco profundas de pantanos, lagos y lagunas, zanjas, corrientes de flujo lento, etc. Prefieren aguas ricas en nutrientes donde pueden llegar a tener tasas muy altas de crecimiento.

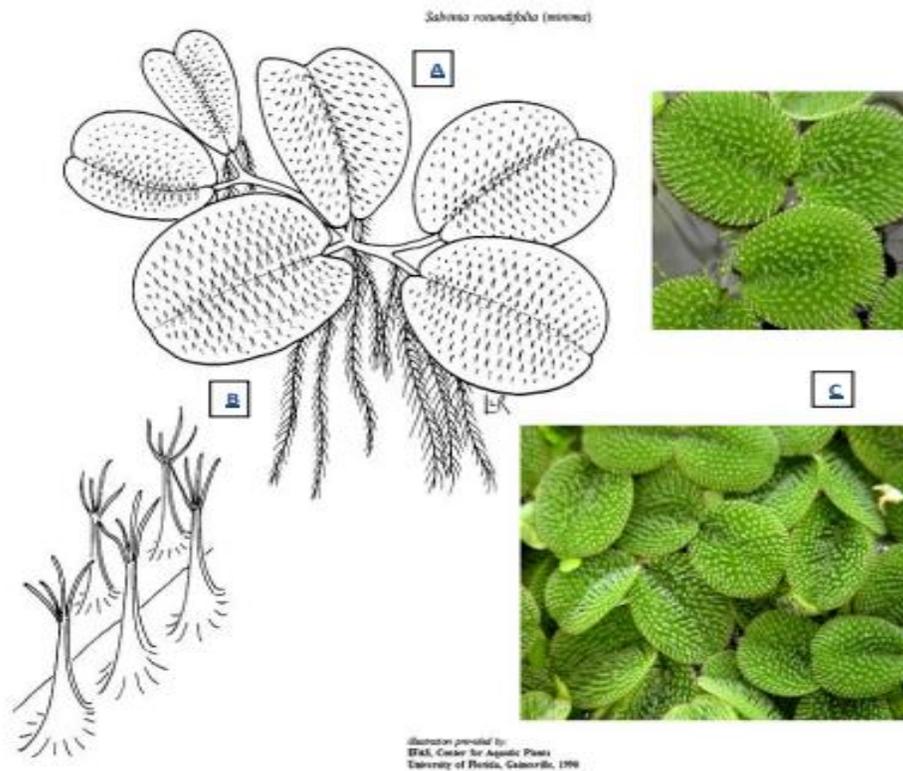


Figura 0.8. Aspectos morfológicos de *Salvinia minima*. A). Se puede apreciar un esquema de la planta completa con raíces y hojas. B). Se aprecia un acercamiento de la disposición de tricomas que caracterizan a *S. minima* de otras especies del género de las salvinias. C). Se aprecian varias unidades de hojas de *S. minima* con disposición de los tricomas. Fuente: University of Florida/IFAS Center for Aquatic and Invasive Plants, used with permission; Inset photos: S.L. Winterton.

1.6 Antecedentes investigativos

Varios estudios han sugerido la implementación de plantas acuáticas que habitan en medios contaminados para el saneamiento de aguas residuales debido a que, generalmente poseen la capacidad de tolerar y acumular altas concentraciones de metales pesados sin afectar su desarrollo (Abhilash et al., 2009). Si bien la factibilidad de su empleo aún está siendo evaluada desde diferentes perspectivas, los estudios de que se dispone coinciden en señalar que se trata de una técnica más limpia, simple, efectiva y aún de menor costo, en relación con los métodos físico químicos que se usan en la actualidad (Lumelli, 2010).

Se han hecho investigaciones a nivel internacional como por ejemplo el estudio sobre los fundamentos y aplicaciones de la fitorremediación elaborado en la ciudad de México. Según Núñez *et al.* (2004), la fitorremediación representa una tecnología alternativa, sustentable y de bajo costo para la restauración de ambientes y efluentes contaminados.

Existen investigaciones realizadas en países de América Latina la de Colombia se investigó sobre la Fitorremediación como la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos (Agudelo *et al.*, 2005).

Outrige (1991), demostró la capacidad de *Salvinia mínima* a tolerar metales, tales como Cd². Este estudio podría considerarse como uno de los primeros que se realizaron en *Salvinia mínima*.

Gardner y Al-Hamdani (1997), estudiaron sobre los efectos fisiológicos provocados por Al₃ en *Salvinia mínima*, demostraron que aún en concentraciones elevadas de este metal (20 mg/L) *Salvinia minima* fue capaz de tolerar la toxicidad por aluminio.

A partir de estos trabajos iniciales investigadores en todo el mundo pusieron un mayor interés en la capacidad de tolerancia a metales tóxicos que tiene *Salvinia mínima*, en donde observaron las modificaciones en parámetros fisiológicos tales como fotosíntesis, concentración de pigmentos (clorofila y carotenoides) y el resultado en respuesta a la acumulación de cromo (Brent *et al.*, 2000).

Oliveira *et al.* (2001), determinaron la capacidad de absorción y acumulación de Cd² entre dos especies *Eichhomia crassipes* y *Salvinia mínima*, obteniendo como resultado una mayor velocidad de absorción y por lo tanto una mayor remoción de Cd² por parte de *Salvinia mínima*.

A pesar del número de monografías y reseñas sobre los metales pesados publicados durante los últimos 15 años, muchas preguntas no están aclaradas satisfactoriamente incluida la distribución de metales pesados, en el interior *Salvinia mínima*, sus efectos tóxicos, y los mecanismos de respuesta en este tipo de plantas a un exceso de metales pesados (Seregin y Ivanov, 2001).

Seregin y Ivanov (2001), demostraron que el Cd² y Pb² en plantas vasculares promueven la actividad de varias enzimas. Sin embargo, no lograron concluir si estos metales afectan directamente las actividades enzimáticas o si el resultado de la estimulación de los cambios en la síntesis de la enzima, es la inmovilización de sus inhibidores, y demostró que el Cd y Pb promueven la formación de especies reactivas de oxígeno en la célula en respuesta al estrés oxidativo. Estrella *et al.*, (2009), demostraron la relación entre la capacidad de *Salvinia mínima* cultivada en medio con Pb (NO₃)² y la producción de fitoquelatinas, una proteína relacionada en la detoxificación de metales.

La mayoría de los estudios realizados para entender el comportamiento de las plantas ante metales pesados se han enfocado a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos, sin embargo, muchos de estos mecanismos en primera instancia, dependen de cambios en los patrones de expresión génica, hasta ahora se ha avanzado en conocer algunos genes involucrados en la respuesta de las plantas ante metales pesados en general.

1.6.1 *Salvinia minima* como planta hiper-acumuladora

El género *Salvinia* ha sido investigado desde diversos aspectos. A continuación, se resumen los trabajos más relevantes.

Algunos autores han reportado considerables porcentajes de remoción de Cd por el helecho acuático del género *Salvinia*. Por ejemplo, *S. herzogii* ha logrado remover un 84% de Cd (Maine & Suñé, 2001; Martelo & Lara, 2012).

La acumulación de Cr^{6+} reduce significativamente el crecimiento de *Salvinia* y la captura de CO_2 . De igual manera 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. Estos efectos fisiológicos fueron observados durante la segunda semana de exposición a cromo, concluyendo que *Salvinia* posee una alta tolerancia a Cr^{6+} (Brent *et al.*, 2000)

Olguín *et al.* (2002), evaluaron la capacidad de *Salvinia minima* para capturar y remover metales, tales como: cadmio, plomo y cromo (Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cr^{6+}) de soluciones acuosas, bajo condiciones controladas (pH=7 a 30°C). Bajo estas condiciones encontraron que la concentración de Cd^{2+} en el tejido de la planta completa era de 10.93 g kg^{-1} , con un factor de bioconcentración (BCF), de 2.718. Además, reportó que la acumulación de Pb^{2+} bajo las mismas condiciones fue de 9.78 g kg^{-1} y su BCF de 3.304. Por otra parte, la capacidad de remoción de *Salvinia minima* para el Cd^{2+} y Pb^{2+} fue de 82.59 % y 97.44 %, respectivamente.

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

También ha sido demostrado que *Salvinia minima* tiene el potencial para remediar cobre (Cu^{2+}) en concentraciones 100 veces más de la encontrada actualmente en ambientes de agua fresca (Al-Hamdani & Blair, 2004). Hoffmann *et al.* (2004), analizaron el comportamiento de *Salvinia minima* ante la exposición a arsénico y plomo (As^{5+} y Pb^{2+}). En este estudio se reportó que *Salvinia minima* tiene la capacidad para remover y acumular Pb^{2+} en sus tejidos, no obstante, la acumulación de arsénico en *Salvinia* se vio limitada.

Estrella *et al.* (2009), demostraron la relación entre la capacidad de *Salvinia* cultivada en un medio con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y la producción de fitoquelatinas, una proteína relacionada en la detoxificación de metales como Pb^{2+}

Prado *et al.* (2010), evaluaron el efecto del cromo en el crecimiento de *Salvinia minima*, así como su respiración y su metabolismo de carbono. Estrella *et al.*, (2012), evaluaron los cambios en la expresión de la PC sintetasa y el contenido del glutatión en respuesta a plomo en *Salvinia minima*. Castro *et al.* (2014), evaluaron la síntesis de nanopartículas de plomo en plantas de *Salvinia minima*. Prado *et al.*, (2015), evaluaron el efecto del cromo en la peroxidación de lípidos, fuga de electrolitos, fotosíntesis y carbohidratos.

Leal *et al.* (2016) y Trejo *et al.* (2012), determinaron la capacidad de tolerancia y acumulación de Pb en plantas de *Salvinia minima* y los posibles genes transportadores que participan en el transporte y secuestro de Pb encontrado patrones de expresiones diferenciales en los genes ATPasa P3A, ABCC, ABCG etc., entre las plantas expuestas a Pb y las plantas control.

A pesar del número de monografías y reseñas sobre la absorción de los metales pesados, en *Salvinia minima*, durante los últimos años quedan muchas dudas en la translocación del metal en los tejidos de la especie. Así como también determinar sus respuestas fisiológicas ante la exposición a metales pesados, en este caso el Litio.

1.7 Justificación

La demanda global de Li, conocido como "oro blanco", ha experimentado un drástico incremento en los últimos años. Según el United States Geological Survey, la demanda pasó de 30 millones de toneladas en 2013 a 57,799 millones en 2019. Sin embargo, este aumento tiene implicaciones negativas significativas en la salud, la biodiversidad y el medio ambiente, como señala la Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente (AIDA) en 2020.

La industria utiliza el Li principalmente en la producción de baterías para dispositivos electrónicos y vehículos eléctricos. Por ejemplo, Tesla estableció en 2016 una fábrica para la producción de baterías de iones de Li, con planes de duplicar la producción global. Sin embargo, el reciclaje de estas baterías es un desafío, ya que su costo supera los beneficios, dado que reciclar Li puede ser hasta cinco veces más costoso que producirlo nuevamente a partir de métodos más económicos.

El riesgo asociado con este metal pesado radica en su persistencia en el ambiente. Una vez liberado, el Li puede permanecer en el medio ambiente durante largos periodos, causando problemas de contaminación. La acumulación de Li en el cuerpo humano es altamente tóxica, por lo que la contaminación en fuentes de agua subterránea o ríos puede afectar a las comunidades circundantes, generando problemas de salud y toxicidad ambiental. Además, existe la posibilidad de ingerir Li a través de plantas o animales contaminados, lo que también puede ocasionar síntomas de intoxicación.

Existen enfoques convencionales destinados a eliminar estos contaminantes, pero su implementación resulta costosa y poco eficiente debido al empleo de agentes quelantes, como se menciona en la investigación de Bhagava et al. (2012). Es precisamente debido a esta problemática que ha surgido la propuesta de utilizar plantas acuáticas como una estrategia complementaria para los procesos de purificación de aguas contaminadas. Diversos estudios han demostrado de manera concluyente que esta metodología es sumamente promisoría.

Además de su eficacia, las plantas acuáticas se presentan como una solución accesible para abordar esta problemática. A diferencia de otros métodos, no requieren la incorporación de agentes adicionales para llevar a cabo el proceso de depuración. Este enfoque se respalda con evidencia recopilada en investigaciones previas, como los estudios realizados por Sal et al. (1998) y Yu & Gu (2007).

La idea de emplear plantas acuáticas para mitigar la contaminación hídrica se basa en su eficacia demostrada y en su accesibilidad, ya que no depende de la introducción de agentes externos, como sí ocurre con las alternativas convencionales. Estos atributos hacen que esta tecnología sea especialmente prometedora y viable para abordar el problema de la contaminación del agua de manera más eficiente y sostenible.

No obstante, resulta imperativo desarrollar un mayor entendimiento sobre cómo estas plantas logran sobrevivir y prosperar en entornos contaminados, así como comprender los posibles

efectos fisiológicos que esta exposición genera en ellas. Es crucial desentrañar los mecanismos fundamentales que están en juego en la acumulación biológica de este metal, el Li, y arrojar luz sobre el daño tanto morfológico como fisiológico que incurre en las plantas de *Salvinia minima*.

Parte de la respuesta a este desafío reside en desvelar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto del Li en la expresión de genes transportadores dentro de las plantas. Estudiar cómo estas plantas consiguen lidiar con la presencia del Li en su entorno, cómo afecta a la expresión genética y cómo se regulan los transportadores moleculares es un paso esencial en la comprensión integral de su capacidad de adaptación a condiciones contaminadas.

El propósito central de esta tesis consistió en la evaluación de la habilidad de *Salvinia minima* para absorber Li, además de analizar las múltiples respuestas fisiológicas que surgen en sus tejidos como resultado de esta asimilación. De manera paralela, se llevó a cabo una evaluación de las potenciales alteraciones en la expresión de cuatro genes transportadores de metales. Todo ello estará orientado a comprender de manera integral cómo esta planta responde ante la exposición al Li y los efectos que dicho proceso puede desencadenar.

1. 8 Problema a resolver

En los últimos años, hemos sido testigos de un preocupante aumento en la contaminación causada por el Li, un metal que posee un potencial tóxico significativo. Ante esta problemática, la búsqueda de soluciones se ha centrado en la exploración de alternativas que permitan la depuración de cuerpos de agua afectados por este metal. Una de las vías promisorias en este esfuerzo es la utilización de la planta *Salvinia minima* como agente de limpieza y restauración.

1. 9 Pregunta de investigación

¿Puede *Salvinia minima* ser capaz de reducir la concentración de Li de cuerpos de agua contaminados, mediante la toma y acumulación del metal Li en sus tejidos?

Si es el caso, ¿Cuáles son los mecanismos de defensa que le posibilitan a la planta tolerar la presencia de este metal en sus tejidos sin ocasionar un impacto notorio en su funcionamiento fisiológico?

1. 10 Hipótesis

► *Salvinia minima* tiene la capacidad de remover Li de soluciones acuosas y acumularlo en sus tejidos, pero a concentraciones mayores a 1 mM presenta afectaciones a nivel de crecimiento, desempeño fisiológico y bioquímico.

1. 11 Objetivo general

Evaluar la capacidad fisiológica de *Salvinia minima* de tomar Li de soluciones acuosas y definir si dicha toma tiene efecto en la expresión diferencial de genes que codifican transportadores de metales, en hojas y raíces, a diferentes tiempos y concentraciones de exposición a Li.

1.11.1 Objetivos específicos

► Cuantificar el contenido de Li en plantas de *Salvinia mínima* expuestas a diferentes concentraciones en medio acuoso a diferentes tiempos de exposición.

► Caracterizar el efecto del Li en la morfofisiología de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones en medio acuoso a diferentes tiempos de exposición.

► Medir los niveles de expresión por RT-PCR de 4 genes que codifican para transportadores en plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones en medio acuoso a diferentes tiempos de exposición.

1. 12 Estrategia experimental

El presente trabajo de tesis se divide en cuatro capítulos (tres etapas experimentales). Capítulo I. Introducción, antecedentes y marco teórico. Capítulo II. Se inicio con el cultivo de las plantas de *Salvinia mínima* y se aplicaron los tratamientos experimentales, análisis de los resultados de la toma de Li, análisis fisiológicos y de crecimiento, se realizaron a diferentes tiempos de exposición con el metal a una concentración media letal de Li. Capítulo III. Expresión de los genes seleccionados en el capítulo I en respuesta a la exposición de Li. Capítulo IV discusión general de la tesis y conclusiones del trabajo experimental (Figura 1.9).

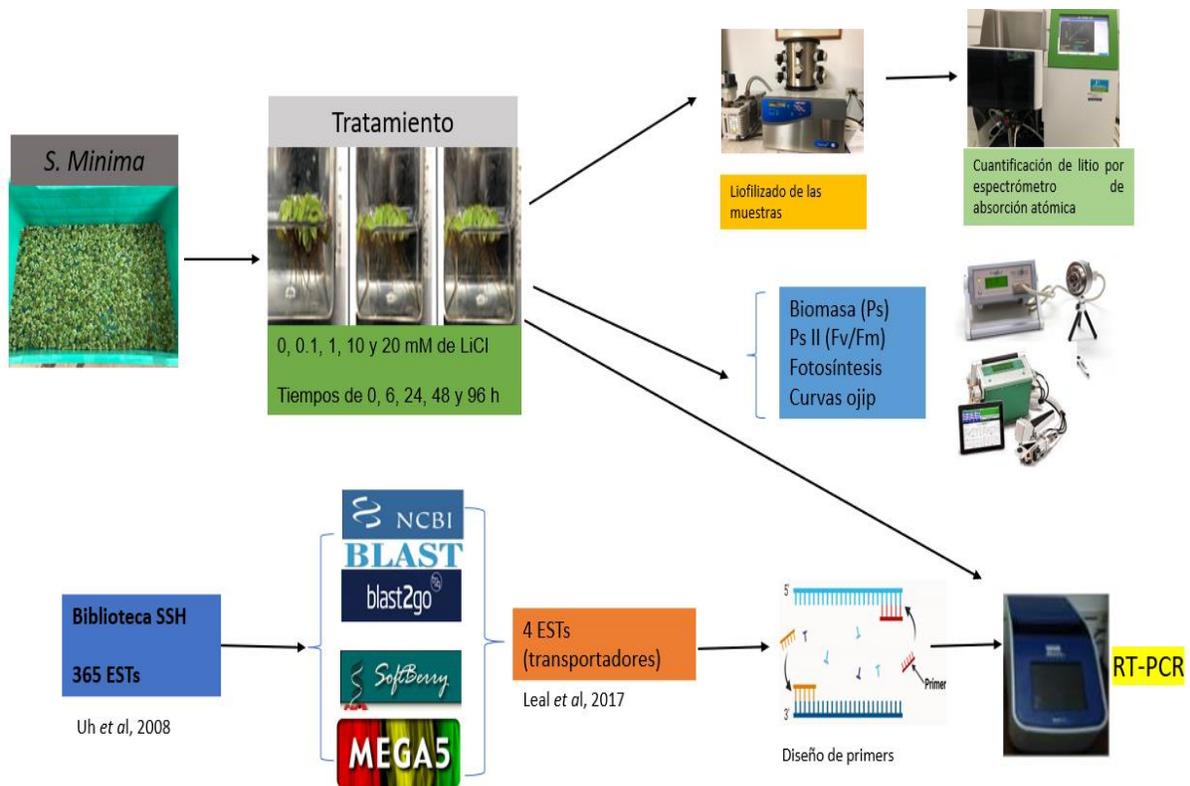


Figura 0.9. Metodología general del proyecto de tesis. Tratamientos experimentales, análisis in silico de genes, evaluación de parámetros fisiológicos y evaluación de niveles de expresión de genes que codifican transportadores en *S. minima* en exposición a concentraciones de Li y tiempos de exposición

CAPITULO II

Efecto del litio en la fisiología y bioquímica de *Salvinia minima*.

2.1 Efecto del litio en la fisiología y bioquímica de *Salvinia minima*.

La contaminación de metales pesados en los suelos y las masas de agua se ha convertido en un problema creciente. Estudios anteriores han reportado diferentes estrategias para disminuir la toxicidad de los metales pesados, como es el uso de material biológico como una estrategia de depuración de suelos y aguas contaminadas.

Una alternativa viable para abordar la contaminación de cuerpos de agua y suelos con metales pesados es la utilización de plantas en un proceso conocido como fitorremediación. Entre estas plantas, se destacan las especies denominadas hiperacumuladoras de metales pesados. Estas especies únicas tienen la capacidad de acumular metales pesados en sus tejidos a concentraciones excepcionalmente elevadas, niveles que serían altamente tóxicos para otras plantas en comparación con aquellas especies que no cuentan con esta propiedad de acumulación (Baker y Brooks, 1989), las hiperacumuladoras se distinguen por su habilidad para absorber a ritmos elevados los metales pesados, así como por su resistencia a la toxicidad de estos elementos y su capacidad para transportarlos desde las raíces hasta las partes aéreas de la planta. Estas características han sido bien documentadas en investigaciones como las de Hall (2002) y Suñe et al. (2007).

Se han realizado diferentes estudios en plantas hiperacumuladoras, centrandó su interés en su capacidad para acumular metales pesados, pero se ha prestado menos atención a los efectos fisiológicos, de crecimiento y bioquímicos que las plantas podrían sufrir tras la acumulación de los iones metálicos (Fuentes 2017).

Salvinia minima es un helecho acuático hiperacumulador de metales pesados para restaurar sitios contaminados (Olguin et al., 2007). Exhibe una alta tasa de crecimiento y una producción elevada de biomasa y se elimina fácilmente de las superficies del cuerpo de agua (Hoffmann 2004; Estrella et al., 2009). *Salvinia minima* elimina el 90% de Pb a tan solo 24 horas de exposición (Olguin et al., 2002; Uh, 2008; Estrella, 2009; Trejo 2012; Leal, 2016), además de remover otros

metales pesados como Cd, Zn, As, Cr, Ni y Li (Hoffman 2004; Sinhei & Bianchini, 2015; Prado *et al.*, 2015; Fuentes, 2017; Carrillo, 2017; Romero, 2013)

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de toma del Litio y el efecto de altas concentraciones de Li en la tasa fotosintética (P_n), fluorescencia de clorofila (FC) y en las relaciones hídricas; evaluando hojas y raíces de *Salvinia minima*, para determinar si existe una relación entre la capacidad de *Salvinia minima* para acumular Li y la capacidad de Li para debilitar el desempeño fisiológico de la planta.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material vegetal

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en la Unidad de Biotecnología (20° 967' N, 89° 617' W). Específicamente en el Laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular. Para evaluar plantas de *Salvinia minima*, ecotipo Yucatán fueron colectadas en el Jardín Botánico Regional del CICY. Al momento de la recolección las plantas de *Salvinia minima* fueron lavadas con agua destilada para que estén lo más limpio posible para evitar alteraciones en los resultados por materiales contaminantes que puedan interferir en el análisis de los datos. Las plantas fueron cultivadas en una solución nutritiva modificada de medio Hoagland (1950), al 50% de su fuerza iónica, con un pH de 5.5. Se cultivaron en un cuarto con luz a una intensidad de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, con humedad relativa de $70 \pm 5\%$, y con fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad).

2.2.2 Evaluación de la capacidad fitorremediadora

Con el objetivo de evaluar la capacidad de *Salvinia minima* para tomar Li en una muestra de agua, se establecieron diferentes unidades experimentales empleando recipientes de plástico (magentas) de 400 mL de capacidad, se le adiciono 200 mL de medio de cultivo a los cuales cada recipiente se les adiciono 20 unidades de biomasa vegetal húmeda, cada unidad corresponde a un par de hojas y un par de raíces. Para conocer la concentración a la cual el 50% de la biomasa empieza a decrecer, se realizó un experimento de barrido de concentraciones de Li, se realizaron evaluaciones a concentración de: 0 (control), 0.1, 1, 10, 20 mM de LiCl. Para cada concentración se instalaron 3 unidades experimentales. En todos los ensayos, y para todos

los grupos experimentales, la temperatura de trabajo fue de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12/12 (luz/oscuridad). El contenido de litio se analizó a las (0, 6, 24, 48 y 96 h).

2.3 Cuantificación de litio en hojas y raíces de *Salvinia minima*

2.3.1 Lavado de las muestras

Se realizaron ensayos hidropónicos y al término de cada período (0, 6, 24, 48 y 96 h) de exposición a Li, se registraron el peso fresco de todas las muestras, por separado hojas de raíces.

Posteriormente todas las raíces se lavaron con agua desionizada durante 2 min y luego con una solución 50 mM de EDTA durante 5 minutos para remover el Li adsorbido a la superficie de las raíces y por último se realizaron dos nuevos lavados con agua MilliQ. La fracción aérea (hojas y tallos) fue lavada con agua desionizada 2 veces, luego lavadas con una solución 50 mM de EDTA 2 veces y por último dos veces con agua desionizada. Posteriormente, las muestras fueron mantenidas a -80 °C hasta su análisis.

2.4 Parametros fisiológicos y bioquímicos estudiados durante el tratamiento

Efecto de Li en:

- ✓ El crecimiento de las plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones de Li y en diferentes tiempos.
- ✓ En la fisiología y alteraciones bioquímicas de las plantas
- ✓ En la capacidad fotosintética de las plantas
- ✓ En la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm)
- ✓ En el contenido de pigmentos fotosintéticos
- ✓ En las relaciones hídricas entre la acumulación de Li.
- ✓ Fuga de electrolitos en raíz y en hoja.

2.4.1 Peso seco

Después de los lavados en las partes de las plantas, las muestras obtenidas se liofilizaron hasta alcanzar un peso constante (aproximadamente 72 h) y se tomaron los datos del peso seco.

La cuantificación de la cantidad de Li acumulado intracelularmente se realizó sobre una porción de materia vegetal liofilizada. Para ello, 0,1 g de biomasa (se realizó la cuantificación tanto en la parte aérea y sumergida de la planta en las diversas concentraciones y tiempos de exposición)

liofilizada se dejó incubar durante 12 h con 10 mL de ácido nítrico concentrado (grado reactivo). Posteriormente, la muestra se colocó en un bloque de digestión a una temperatura de 120 °C durante 2 h hasta la desaparición de vapores pardos. Posteriormente, la biomasa digerida fue aforado a 1.5 mL con agua ultra pura, y se agito en un vortex (Thermolyne) durante 5 minutos. Todas las muestras obtenidas se centrifugaron a 13,000 rpm en una centrifuga durante 20 minutos. Se rescato el sobrenadante de cada muestra, se tranfirio a tubos eppendorf de 2 mL y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su análisis. Finalmente, el contenido de Li intracelular en las muestras digeridas se analizó por espectrofotometría de absorción atómica AAnalyst 200 (Perkin-Elmer, USA). De acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante para la determinación de Li la longitud de onda fue de 520 nm, utilizando llama aire acetileno. La calibración del equipo consistió en 4 estándares con las siguientes concentraciones 0.1, 0.25, 1 y 1.5 ppm, utilizando como blanco HNO₃ al 1% en la cual se obtuvo una curva patrón con un coeficiente de determinación de $r^2= 0.999$.

Para que nuestras muestras estén dentro de la curva de calibración fue necesario realizar diluciones con agua ultrapura con los siguientes factores de dilución (tabla 5).

Tabla 0.1. Factor de dilución empleado en la cuantificación de Li en muestras digeridas mediante método de digestión ácida.

Concentración (milimolares)	Factor de dilución
0.1 mM	10/5 = 2 MI
1 mM	10/10 = 1 mL
10 mM	10/100 = 0.1 mL
20 mM	10/200 = 0.05 mL

Las muestras fueron leídas a 520 nm en una espectrometro de absorción atómica AAnalyst 200 (Perkin-Elmer, USA). La determinación se realizó por triplicado (n=3) para cada concentración y tiempo de exposición. La concentración del metal se expresa en mg de metal por gramo de peso seco (mg metal/g PS) mediante los siguiente calculos (Rüdel, 2007):

$$\omega E = V/M \times \rho E$$

ωE = proporción de la masa del elemento en unidad de biomasa (mg metal /g PS) **M**= Masa de muestra utilizada (mg); **V**= Volumen de referencia (mL), **pE**= Concentración de la muestra obtenida en el equipo, corregida por el factor de dilución (mg/L).

2. 5 Determinación de parámetros fisiológicos

2.5.1 Determinación de fluorescencia de clorofila

El parámetro de fluorescencia de la clorofila: fluorescencia inicial (F_o), fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_o$), fluorescencia máxima (F_m) y la relación F_v/F_m , se analizaron mediante un analizador portátil de eficiencia vegetal, PEA (Plant Efficiency Analyzer-MK2, Hansatech, King's Lynn, GB). Se colocaron las pinzas sobre la hoja, se cerró el ojo de la pinza, para oscurecer la hoja, por 20 minutos y luego se tomó la medida de fluorescencia.

2.5.2 Curvas O-J-I-P

Para medir la fluorescencia modulada se utilizó un analizador portátil de eficiencia vegetal, PEA (Plant Efficiency Analyzer-MK2, Hansatech, King's Lynn, GB). que consiste básicamente de 4 fuentes de luz cualitativa y cuantitativamente diferentes: a) luz roja modulada de baja intensidad ($2 \text{ pmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 583 nm). b) pulsos de luz actínica de alta intensidad ($5-20,000 \text{ pmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). c) luz actínica blanca continua de $300-600 \text{ pmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. d) luz rojo lejano ($735 \text{ pmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, de 735 nm); y un detector de fluorescencia que registra solamente la fluorescencia emitida en la frecuencia y la fase de luz modulada. La hoja se expone a la luz modulada de baja intensidad para determinar F_o , luego se sobrepone un pulso de luz de alta intensidad para determinar F_m , y enseguida, también sobrepuesta a la luz modulada, se aplica luz actínica blanca continua durante algunos minutos para llevar al estado estacionario; nuevamente, se aplica un pulso de luz saturante para determinar F_m' y al final se aplica luz rojo lejano para promover la reoxidación de plastoquinona y determinar F_o' . (ETR) (González *et al.*, 2008). A partir de estos parámetros el equipo calcula de manera automática los valores de rendimiento de transporte de electrones.

2.5.3 Contenido de pigmentos fotosintéticos

Los diferentes tipos de estrés afectan normalmente la concentración de clorofila en hojas, que es por supuesto, muy importante ya que de ello depende, la capacidad de captura de fotones para producir el poder reductor (NADPH) y la energía química (ATP) requerida para la

subsecuente fijación de CO₂. Un estrés por metales pesados disminuye los contenidos de clorofilas en hojas

Se colectaron hojas frescas, se pesaron 0.1 g y se colocaron en un mortero frío, se adiciono 1.0 mL de acetona 80% y se maceró hasta obtener el extracto, que se transferido a tubos eppendorf de 2 mL. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en tubos de ensayo previamente rotulados y mantenidos en hielo. Se llevó a un volumen final de 5 mL. Todo este procedimiento se realizó a baja luz. La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis DU 650 (BECKMAN COULTER, USA) realizando las lecturas de absorbancia a longitudes de onda de 663, 646 y 470 nm. Acetona al 80% v/v fue utilizada como blanco analítico.

Para determinar la concentración de clorofilas y carotenoides en mg/mL se usó la ecuación de Welburn, (1994).

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = 12.21 (A_{663}) - 2.81 (A_{646})$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/ mL}) = 20.13 (A_{646}) - 5.03 (A_{663})$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 3.27[\text{chl a}] - 104[\text{chl b}]) / 198$$

2.5.4 Determinación de las relaciones hídricas (potencial hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_π) y turgencia (Ψ_p)) en hojas de plantas de *Salvinia minima* durante la exposición a Li.

Para la determinación del potencial hídrico de las plantas durante todo el experimento, se evaluaron tanto plantas control como las plantas tratadas con diferentes concentraciones de Li. Para cada tratamiento se colocaron 15 hojas en la cámara de un equipo WP4C (Dewpoint PotentiaMeter from METER Group, USA), Midiéndose por triplicado (n=3). Las mismas muestras fueron congelas en nitrógeno líquido y se maceraron en mortero se dejó reposar unos minutos para que se descongelen, las muestras se colocaron en un papel filtro se le aplicó presión para recuperar la savia, se guardaron en tubos eppendorf de 2 mL, las muestras fueron analizadas en un osmómetro de presión de vapor (modelo 5600 Vapro de Wescor, USA). El valor de miliOsmolalidad que proporciona el equipo se convirtió a presión utilizando la ecuación de Van't Hoff.

$$\Psi_s = -CTR$$

En donde:

Ψ_s = es el potencial osmótico

C = es la concentración (Osmol kg⁻¹)

T = es la temperatura absoluta (°C+273°k)

R = es la constante de gases (0.008314MPa.mol⁻¹ (°k)⁻¹)

Los valores de turgencia se calcularon como la diferencia de potencial hídrico con el potencial osmótico, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Psi_P = \Psi_W - \Psi_\pi$$

2.5.5 Cuantificación de Fuga de Electrolitos (integridad de membrana) en plantas de *Salvinia minima* durante la exposición a Li.

Cuando las plantas se encuentran en algún tipo de estrés como el provocado por metales pesados, éstas sufren daños a nivel de membranas celulares y la pérdida de la capacidad de retener solutos (iones y otros compuestos), lo que provoca un aumento de la conductividad eléctrica de una muestra (con respecto a la conductividad inicial). Una forma práctica y rápida para determinar la integridad de la membrana es mediante la fuga de electrolitos. Se seleccionaron 3 hojas y 3 raíces de tres plantas (por triplicado) en cada una de las hojas se obtuvieron discos con un ayuda de un sacabocado de 2 mm. En cuanto a la raíces, no se realizaron cortes. Todas las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio con capacidad de 45 mL y fueron suspendidas en 20 mL de agua destilada, y se dejaron en agitación por 2 horas a 60 rpm a temperatura ambiente con un agitador orbital (LabLine Dual Action Shaker, USA). Para obtener la conductividad eléctrica inicial (CEi) de las muestras, se utilizó un conductímetro Orión, modelo 162 (USA). Posterior a ello se provocó una lisis de todas las células para liberar el total de electrolitos de la muestra mediante calentamiento, la solución con las muestras fue calentada a 120° por 15 minutos en una autoclave marca Felisa (México) y 6 horas después alcanzando temperatura ambiente se volvió a medir en el conductímetro (conductividad final). El porcentaje de fuga de electrolitos se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de fuga de electrolitos} = (CE_i/CE_f) * 100$$

En donde

CEi= conductividad eléctrica inicial

CEf= conductividad eléctrica final.

2.6 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el Software SAS JMP Pro 14.3. Se utilizó para el análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de medias entre distintos factores a una $p < 0.05$.

2.7 RESULTADOS

2.7.1 Acumulación de Li en hoja y raíz de *Salvinia mínima*

En la Figura 2.1 se presenta la evolución de las concentraciones de Li en las raíces y hojas. Es evidente que en las plantas del grupo control no se detectó presencia del metal en ninguna de las ocasiones de muestreo. En contraste, en los grupos sometidos a tratamiento con Li, se aprecia una rápida respuesta de absorción en las raíces y hojas durante las primeras seis horas de exposición a distintas concentraciones de Li (0.1, 1, 10 y 20 mM). Esta absorción inicial es seguida por un incremento en el contenido del metal a las 48 horas, alcanzando un valor de 12 mg g^{-1} PS (peso seco) en la concentración de 20 mM de LiCl. Esta concentración se mantiene constante después de 96 horas de exposición.

En el caso de las hojas, se registra un aumento en la captación de Li desde las primeras 6 horas, pero el nivel máximo se alcanza a las 24 horas, con una acumulación de Li de 7 mg g^{-1} PS en plantas expuestas a 20 mM de LiCl. Esta concentración se sostiene hasta las 96 horas de exposición. En el tratamiento con 10 mM de LiCl, tanto en las raíces como en las hojas, se observa una absorción máxima de 5.5 y 2 mg g^{-1} PS, respectivamente, a las 6 horas, conservándose estable hasta las 96 horas.

En los casos de exposición a 0.1 y 1 mM de LiCl, las raíces apenas incorporan menos de 1 mg g^{-1} PS. En las hojas, la absorción de Li es también menor a 1 mg g^{-1} PS después de 96 horas, cuando se expusieron a 1 mM de LiCl.

Destaca que, en todas las concentraciones evaluadas, las raíces presentan una mayor acumulación de Li en comparación con las hojas. Además, se establece una relación proporcional entre el contenido de Li y la concentración de Li en el medio. A medida que la concentración del metal en el medio de cultivo aumenta, se evidencia un incremento en el contenido de Li en las plantas, tal como se aprecia en la (Figura 2.1).

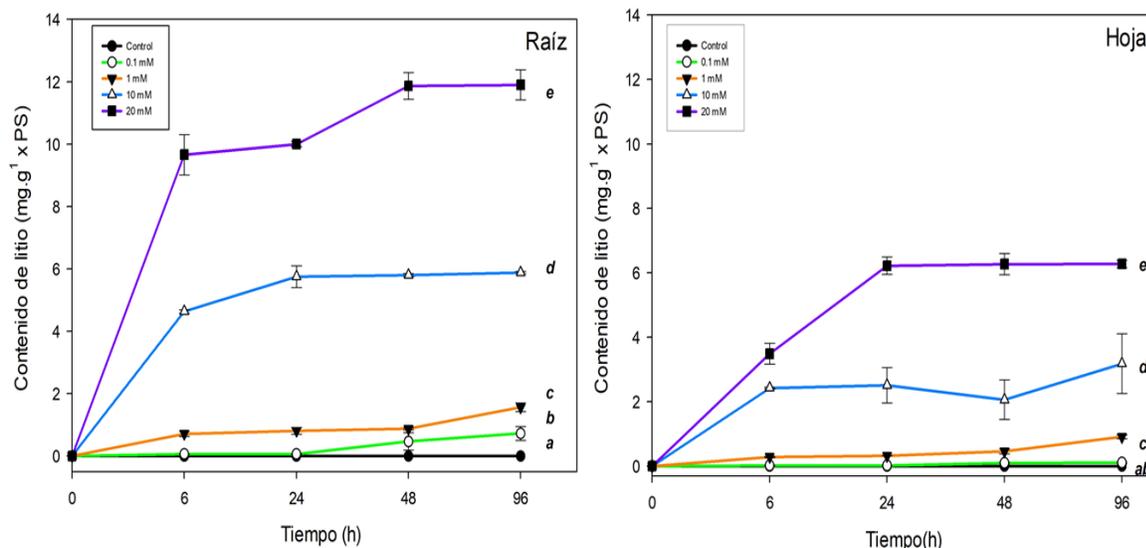


Figura 2.1. Contenido de Li en raíz y en hoja, expuestas a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de LiCl. Las barras corresponden al promedio \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0.05$).

2.7.2 Toma de Li por la planta entera

A partir de los datos recopilados sobre las concentraciones de Li en las hojas y las raíces, se procedió a sumar ambas cifras para obtener una perspectiva global de la acumulación total de Li absorbido en toda la planta. Esta evaluación se llevó a cabo con el propósito de determinar la capacidad de *Salvinia mínima* para la fitorremediación de Li, con el objetivo de lograr una acumulación del 1% del metal en 1 mg de peso seco (PS).

Específicamente, se pudo observar que cuando las plantas fueron expuestas a una concentración de 20 mM de LiCl, lograron acumular una cantidad significativa de 18 mg g⁻¹ PS. En el caso de la exposición a 10 mM de LiCl, la acumulación fue intermedia, alcanzando los 9 mg g⁻¹ PS. Sin embargo, en las concentraciones más bajas, es decir, 0.1 y 1 mM, la acumulación fue limitada, llegando solamente a 1 mg g⁻¹ PS. Estos resultados se representan de manera gráfica (Figura 2.2).

Los datos evidencian que *Salvinia mínima* exhibe una notable capacidad de acumulación de Li, particularmente en condiciones de exposición a concentraciones más altas, lo que respalda su potencial como una planta capaz de fitorremediar la presencia del metal en el entorno.

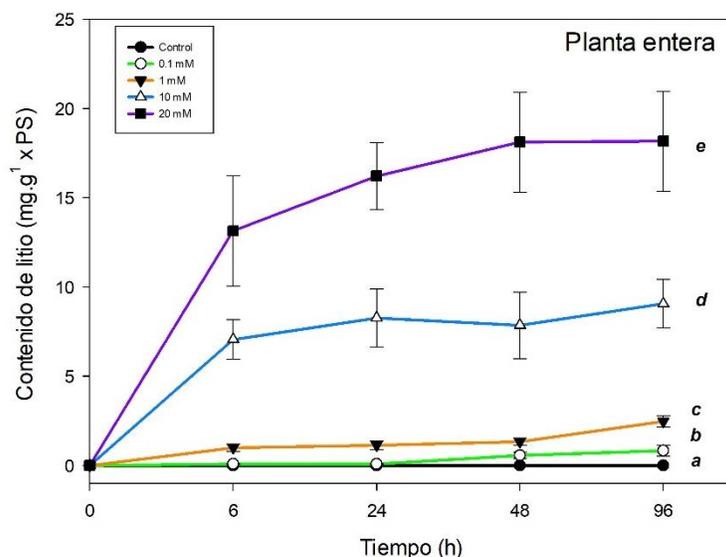


Figura 2.2. Toma de litio en los diferentes puntos de tiempo y en las diferentes concentraciones de LiCl por la planta entera. Las barras corresponden al promedio \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0.05$).

2.7.3 Contenido de Li en el medio de cultivo.

Un aspecto de suma relevancia que se evaluó fue la concentración de Li presente en el medio de cultivo en cada punto de muestreo, así como en cada una de las concentraciones de Li analizadas. En el caso del tratamiento con 0.1 mM de Li, se evidenció una disminución constante en la concentración del metal desde las 6 horas, llegando a un contenido nulo de Li a las 24 horas. En el caso de 1 mM de LiCl, se observó una leve reducción a las 6 horas que persistió hasta las 24 horas, pero esta disminución se acentuó significativamente a las 48 y 96 horas, alcanzando una eliminación del 90%.

Al enfocarnos en las concentraciones más elevadas, 10 y 20 mM de Li, se apreció una rápida captación del metal del medio a las 6 y 24 horas en el caso de 10 mM. Sin embargo, esta concentración llevó a una eliminación del 10% en las primeras etapas y continuó disminuyendo progresivamente, llegando a una eliminación del 30% a las 96 horas. En el caso de 20 mM de Li, se observó una reducción sostenida en la concentración del Li en el medio desde las 6 horas hasta las 48 horas, manteniéndose en este nivel hasta las 96 horas.

Los resultados de estas variaciones se presentan en la Figura 2.3. Es destacable que, en todas las concentraciones, desde 0.1 hasta 20 mM, se experimentó una disminución en la concentración de Li en el medio, debido a la absorción del Li por parte de las plantas de *Salvinia*

minima. Esta captación de Li por parte de las plantas fue influenciada por la concentración del metal en el medio, mostrando una dependencia clara entre la concentración inicial y la capacidad de absorción de las plantas.

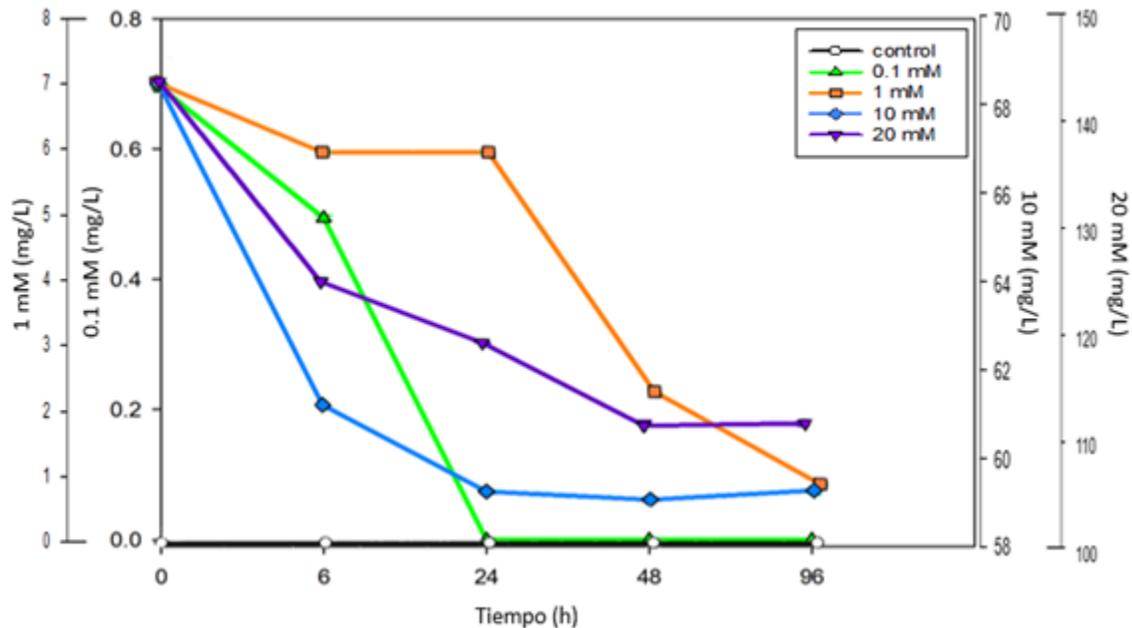


Figura 0.3. Contenido de Li en el medio acuoso después de tratamiento con plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones de LiCl (0, 0.1, 1.0, 10 y 20 mM) de 6 a 96 h de exposición. Cada concentración de exposición a Li tiene su eje Y.

2. 8 Parámetros de crecimiento

Con el propósito de evaluar el posible efecto tóxico del Li en *Salvinia minima*, se llevaron a cabo cultivos de estas plantas en distintas concentraciones de LiCl: 0, 0.1, 1, 10 y 20 mM, y a diferentes intervalos de exposición. Durante este proceso, se examinaron diversos parámetros de crecimiento para determinar cualquier alteración.

En la figura 2.4 se observa las fotografías de las plantas de *Salvinias mínimas* sometidas a estas concentraciones de LiCl, se observaron modificaciones en la coloración de las hojas a las 24 horas de exposición. Este cambio fue más pronunciado a las 48 y 96 horas en el caso de la concentración más alta, 20 mM de LiCl. Estas alteraciones en la coloración no se manifestaron en las plantas de control, que se mantuvieron sin mostrar daño aparente.

A través de estas observaciones, fue evidente que, a medida que el tiempo de exposición al LiCl aumentaba, las hojas de las plantas experimentales se volvían más frágiles y quebradizas, llegando a ser especialmente notorio en la etapa final de exposición a la concentración más alta, 20 mM de LiCl. Este contraste era notable en comparación con las hojas de las plantas control, que mantenían su apariencia y resistencia características.

Es importante destacar que, en periodos de incubación inferiores a 24 horas, las hojas no presentaron señales de toxicidad ante la exposición a 20 mM de LiCl, como se aprecia en la Figura 2.4. Este resultado subraya cómo el impacto tóxico se manifiesta con mayor claridad a lo largo del tiempo, especialmente en las condiciones más concentradas.

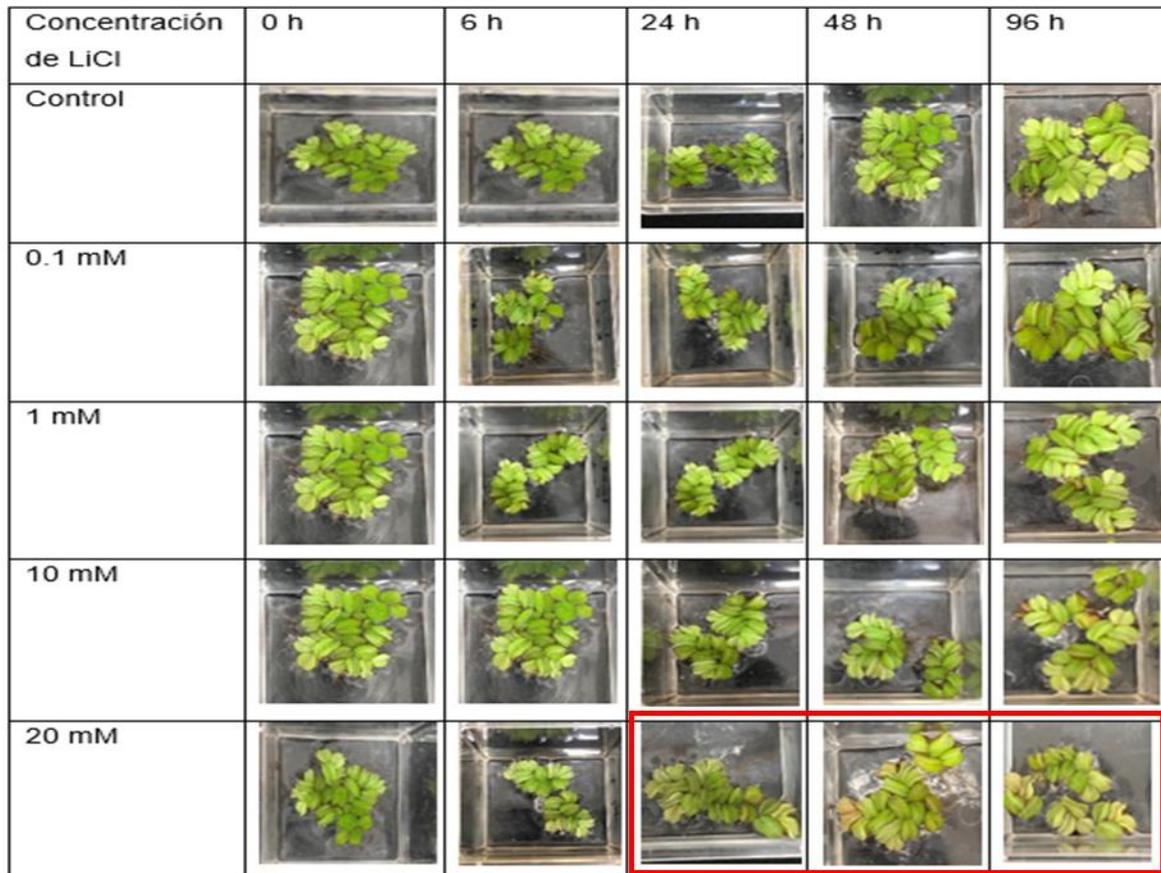


Figura 2.3. Apariencia de las hojas de *Salvinia mínima* expuesta a las diferentes concentraciones de LiCl a diferentes tiempos de incubación, en comparación con plantas en condiciones control a los mismos días de colecta que las plantas en exposición al metal.

Además, en relación a la apariencia de las raíces, no se detectaron cambios visuales en las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mM de LiCl en comparación con las plantas de control. Sin embargo, en el caso de la concentración más elevada, 20 mM de LiCl, se observó un cambio significativo. A las 48 horas de exposición, las raíces comenzaron a mostrar signos de fragilidad, lo que condujo a una reducción en la longitud de las mismas. Este fenómeno es particularmente notable en la (Figura 2.5).

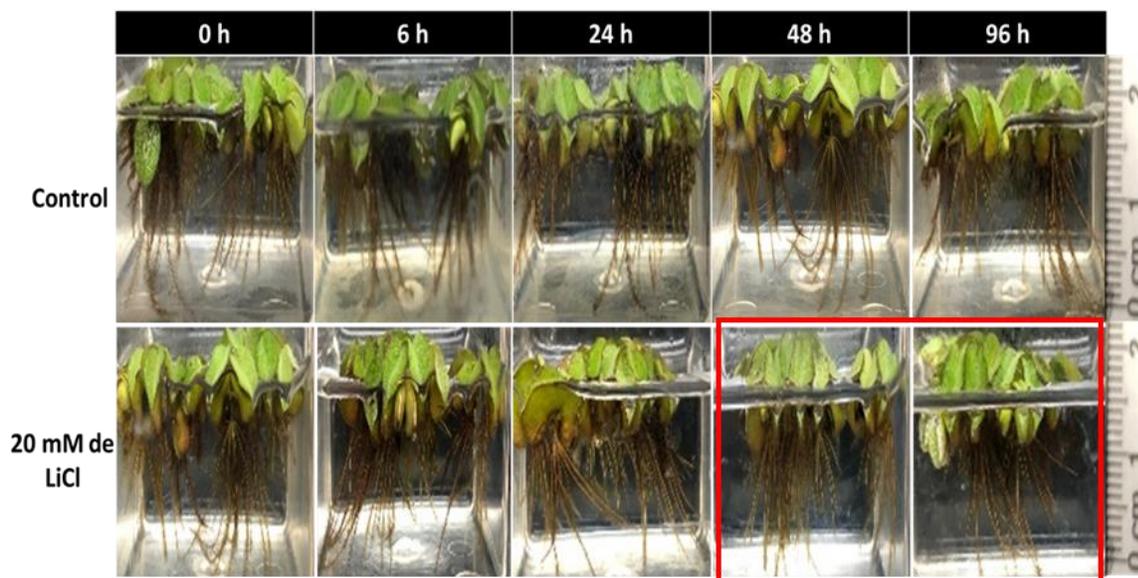


Figura 2.4. Apariencia de las raíces de *Salvinia mínima* a las diferentes concentraciones de LiCl a diferentes tiempos de incubación, en comparación con plantas en condiciones control a los mismos días de colecta que las plantas en exposición al metal.

2.8.1 Efecto del Li sobre la biomasa de *Salvinia mínima*.

Los metales pesados ejercen un impacto discernible en el crecimiento y la producción de biomasa en las plantas de *Salvinia mínima*. En este estudio, se priorizó la evaluación del peso seco de la planta como indicador, y los datos recolectados arrojaron conclusiones significativas. Desde una concentración de 0.1 mM de LiCl, se identificó una disminución en la producción de biomasa, manifestándose una falta de crecimiento en las raíces. A niveles de 1 y 10 mM de LiCl, se detectó una inhibición leve en la generación de biomasa en la raíz. Sin embargo, fue con la exposición a 20 mM de LiCl durante 96 horas, que se observó el efecto más pronunciado de inhibición en la biomasa de las raíces.

Por otro lado, el comportamiento en las hojas fue diferente. En plantas control y en aquellas expuestas a 0.1 y 1 mM de LiCl, se registró una producción de biomasa similar, lo que sugiere que estas concentraciones no presentaron un impacto significativo en la producción de biomasa de las hojas. En el caso de 10 mM de LiCl, no se presentó un cambio notorio en relación al inicio del tratamiento, mientras que en la concentración de 20 mM de LiCl se observó un efecto negativo en la producción de biomasa de las hojas, con un descenso marcado desde las 24 hasta las 96 horas de exposición.

Tanto en las hojas como en las raíces, la concentración más alta de 20 mM de LiCl durante períodos prolongados de exposición (96 horas) resultó en una pérdida considerable de biomasa, como se refleja en la Figura 2.6. Estos resultados resaltan la sensibilidad de *Salvinia mínima* a las concentraciones más altas de litio y su impacto perjudicial en la producción de biomasa en tiempos prolongados de exposición.

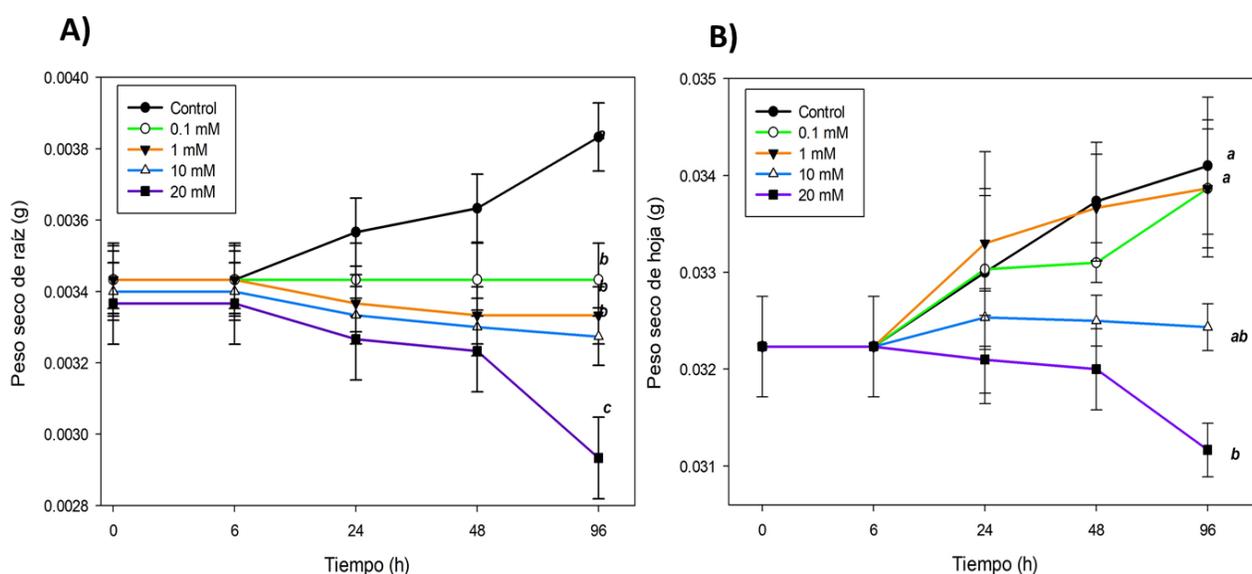


Figura 2.5. Efecto de Li en peso seco de plantas de *Salvinia mínima* tanto en A) raíz y en B) hojas, en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de LiCl. Las barras corresponden al promedio \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras minúsculas indican la significancia estadística ($p < 0.05$).

2.8.2 Efecto del Li sobre la longitud de raíz

Se procedió a analizar el posible impacto del Li en el crecimiento de las plantas de *Salvinia minima* en términos de la longitud de raíz exponiéndola a diversas concentraciones de LiCl durante diferentes intervalos de tiempo. Al examinar la longitud de las raíces en relación con estos factores, se observaron patrones claros.

Particularmente, en la concentración de 20 mM de LiCl, se evidenció una disminución progresiva en la longitud de las raíces a partir de las 6 horas de exposición. El efecto negativo más marcado se presentó a partir de las 48 horas de exposición a LiCl. En contraste, las plantas del grupo control mostraron un incremento en la longitud de las raíces a partir de las 24 horas, y este crecimiento se mantuvo hasta las 96 horas. Los datos obtenidos en este análisis revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En las concentraciones de 0.1 y 1 mM de LiCl, no se observaron diferencias notables en la longitud de las raíces. Sin embargo, a 10 mM de LiCl se registró una disminución en la longitud de las raíces en comparación con las condiciones iniciales. Estos datos se representan en la Figura 2.7.

En resumen, los resultados de este análisis indican que el Li, en particular en la concentración más alta de 20 mM, tiene un impacto negativo en la longitud de las raíces de *Salvinia mínima*, mientras que concentraciones más bajas no mostraron efectos significativos. Las diferencias observadas en las longitudes de las raíces respaldan la conclusión de que la exposición al Li influye en el crecimiento de las plantas de manera significativa.

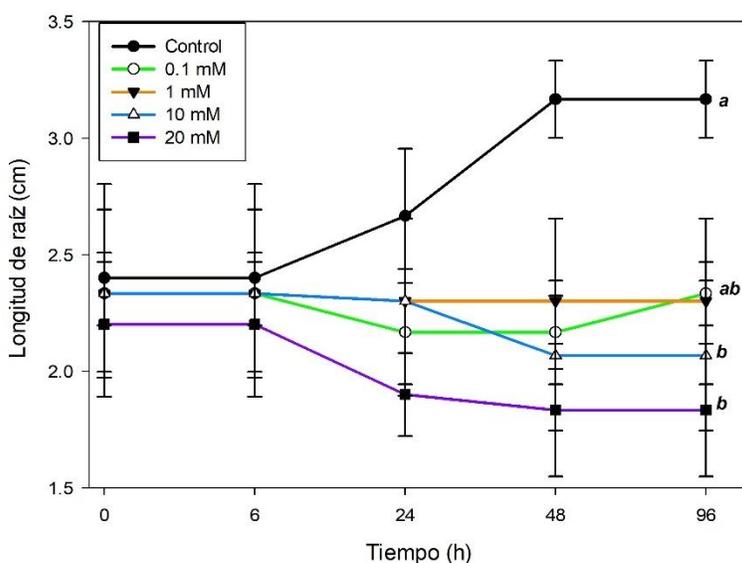


Figura 2.6. Efecto de Li en longitud de las raíces en plantas de *Salvinia mínima* en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones en comparación con plantas control. las barras corresponden al promedio \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras minúsculas indican la significancia estadística ($p < 0.05$).

2.8.3 Efecto del Li sobre el número de hojas

Como ya se había mencionado anteriormente en la estrategia experimental se seleccionaron al inicio del experimento 10 unidades (una unidad corresponde a un par de hojas y raíces) con un total inicial de 20 hojas; y en este experimento se observó una mayor proliferación de hojas nuevas en las plantas control y en las concentraciones de 0.1, 1 mM de LiCl con un total de 25 hojas, mientras que la concentración de 10 mM mantuvo el crecimiento con 21 hojas después de 96 h de exposición, pero a 20 mM de exposición a LiCl indujo la mayor pérdida de hojas de todos

los tratamientos, se observaron hojas muertas con coloraciones pálidas quedando solamente con 16 hojas a las 96 horas de exposición al LiCl (Figura 2.8).

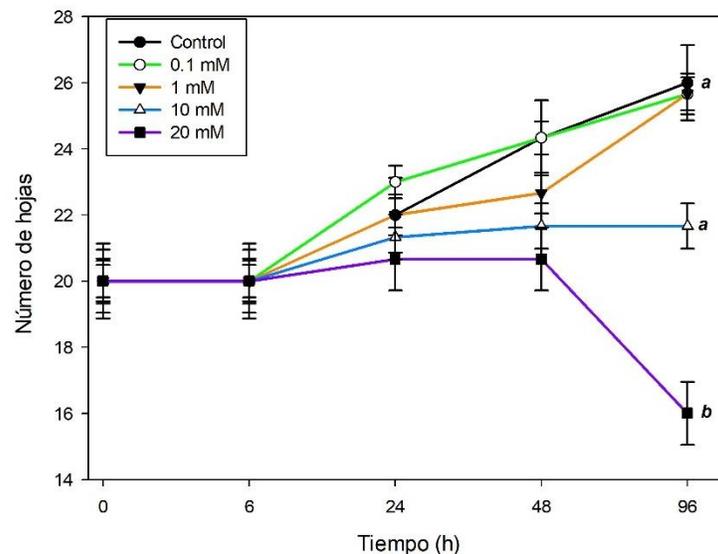


Figura 2.7. Número de hojas de plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones de LiCl durante 96 horas. Cada línea representa el promedio de 3 mediciones, y las barras corresponden al \pm error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$)

2.9 Parámetros fisiológicos

2.9.1 Efecto del Li sobre la fotosíntesis en *Salvinia mínima*

Para caracterizar el efecto de Li a nivel fisiológico se llevó a cabo la determinación de fotosíntesis. En fotosíntesis (P_n) pudimos observar que las plantas de *Salvinia mínima* control y las plantas que fueron expuestas a 0.1 y 1mM de LiCl, mostraron una tasa fotosintética de $5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ manteniéndose sin cambios significativos durante el experimento hasta las 96 horas. Mientras que las plantas que fueron expuestas a altas concentraciones de LiCl (10 y 20 mM), la tasa fotosintética mostró una tendencia a disminuir en relación con la concentración y el tiempo de exposición transcurrido. Sin embargo, la tasa fotosintética no mostró cambios significativos durante las primeras 6 horas de exposición, siendo que, a las 24 horas de exposición, ya se observa una diferencia significativa en fotosíntesis en las concentraciones de 10 y 20 mM de LiCl, con una tasa fotosintética de 2.96 y $1.12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. En cuanto a las 48 horas de exposición a LiCl se observó una fotosíntesis de 3 y $0.08 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en 10 y 20 mM de LiCl. Al máximo tiempo de exposición (96 horas), las plantas de *Salvinia minima* en 10 mM presentaron valores de P_n de $1.43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mientras aquellas expuestas a 20

mM ya no tiene la capacidad de realizar fotosíntesis (P_n es de $-0.60 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 2.9).

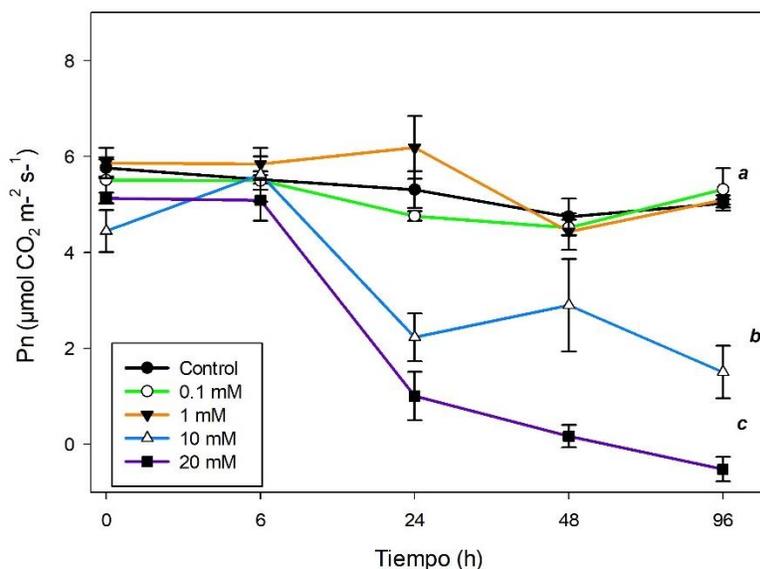


Figura 2.8. Efecto de Li en la tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de *Salvinia mínima* ante la exposición de diferentes concentraciones de LiCl en función del tiempo de exposición. Las barras corresponden al promedio \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p < 0.05$).

2.9.2 Efecto del Li en la eficiencia fotoquímica del PS II (Fv/Fm) en plantas de *Salvinia mínima*.

Se realizó la evaluación de la eficiencia fotosintética, medida mediante la relación Fv/Fm (PSII), en *Salvinia minima*. Esto abarcó tanto las plantas control como aquellas expuestas a diferentes concentraciones de LiCl (0.1, 1, 10 y 20 mM), en distintos intervalos de exposición. Nuestros resultados revelaron que las plantas control mantuvieron valores estables hasta las 96 horas, con un Fv/Fm de 0.82. En contraposición, las plantas expuestas a LiCl experimentaron una disminución en su Fv/Fm.

Es esencial resaltar que durante las primeras 24 horas de exposición, no se identificaron diferencias notables entre las plantas control y las sometidas a diversas concentraciones de LiCl, manteniéndose en un Fv/Fm de 0.79 (Figura 2.10).

La perturbación en la eficiencia fotoquímica del PSII se hizo evidente en las concentraciones de 10 y 20 mM de LiCl a las 48 horas de exposición. En estas condiciones, el valor promedio del

Fv/Fm descendió a 0.70 en ambas concentraciones, situándose por debajo del umbral característico de una planta saludable (0.82). Este declive sugiere un nivel moderado de estrés, manifestándose en la fluorescencia de la clorofila como una indicación del deterioro en el transporte de electrones en el PSII. La reducción en el valor del Fv/Fm se volvió aún más ostensible con el aumento del tiempo de exposición a 20 mM de LiCl, evidenciándose a las 96 horas con un Fv/Fm de 0.57. Esta cifra representó una disminución del 64% en comparación con las plantas control (Figura 2.10).

En síntesis, los resultados revelan que las plantas de *Salvinia minima* sometidas a concentraciones elevadas de LiCl experimentan un daño significativo en su fotosistema PSII, reflejado en la reducción del valor Fv/Fm. Estos datos aportan evidencia del impacto negativo del litio en la eficiencia fotosintética de las plantas y el deterioro progresivo en tiempos prolongados de exposición.

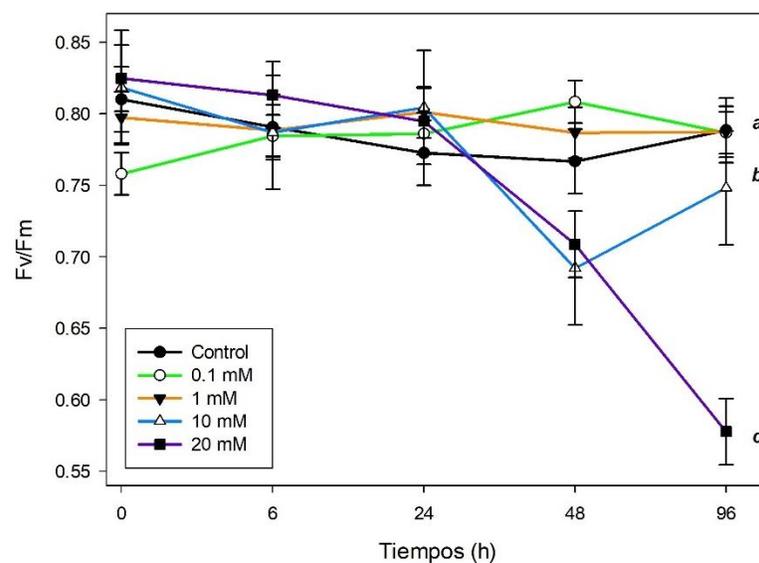


Figura 2.9. Efecto del Li en la fluorescencia de la clorofila Fv/Fm (PS II), en plantas de *Salvinia minima* en función del tiempo de incubación. Las barras corresponden a la media \pm el error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p < 0.05$).

2.9.3 Rendimiento cuántico de transporte de electrones del PS II en plantas de *Salvinia minima* ante la exposición al Li.

El estudio realizado involucra la exposición de plantas de *Salvinia minima* a diferentes concentraciones de LiCl (0, 0.1, 1, 10 y 20 mM) durante 96 horas, con el objetivo de examinar el efecto del estrés oxidativo en la eficiencia de la fotosíntesis. Para evaluar los cambios, se

utilizaron curvas OJIP que representan la cinética de la subida de la fluorescencia y se midieron utilizando un fluorómetro (M-PEA, Hansatech).

En la figura 2.11 se muestran los resultados de una respuesta compleja en la subida de la fluorescencia bajo estrés oxidativo. Se observa que hay una serie de fases en la cinética de la fluorescencia en todos los intervalos de tiempo de exposición. Se identifica que a concentraciones más altas de LiCl (10 y 20 mM) y a exposiciones prolongadas (96 h), hay un mayor daño en el fotosistema II (PSII) o una disminución en la eficiencia de la fotosíntesis. Estas plantas presentan una fluorescencia más baja (11,500 mV) en comparación con las plantas control y las expuestas a concentraciones más bajas de LiCl (0.1 y 1 mM).

Un hallazgo interesante en la figura 2.11 es que las plantas expuestas a 0.1 y 1 mM de LiCl durante 96 horas muestran una mayor fluorescencia (16,000 mV) en comparación con las plantas control (14,000 mV). Esto podría indicar que en estas concentraciones y en este período de tiempo, la transferencia de electrones en el fotosistema II es más eficiente.

En general, La respuesta de las plantas de *Salvinia minima* al estrés oxidativo inducido por el LiCl varía según la concentración y el tiempo de exposición. Las concentraciones más bajas de LiCl (0.1 y 1 mM) parecen favorecer la transferencia de electrones, mientras que las concentraciones más altas (10 y 20 mM) y tiempos prolongados resultan en un daño significativo en el PSII y una disminución en la fluorescencia.

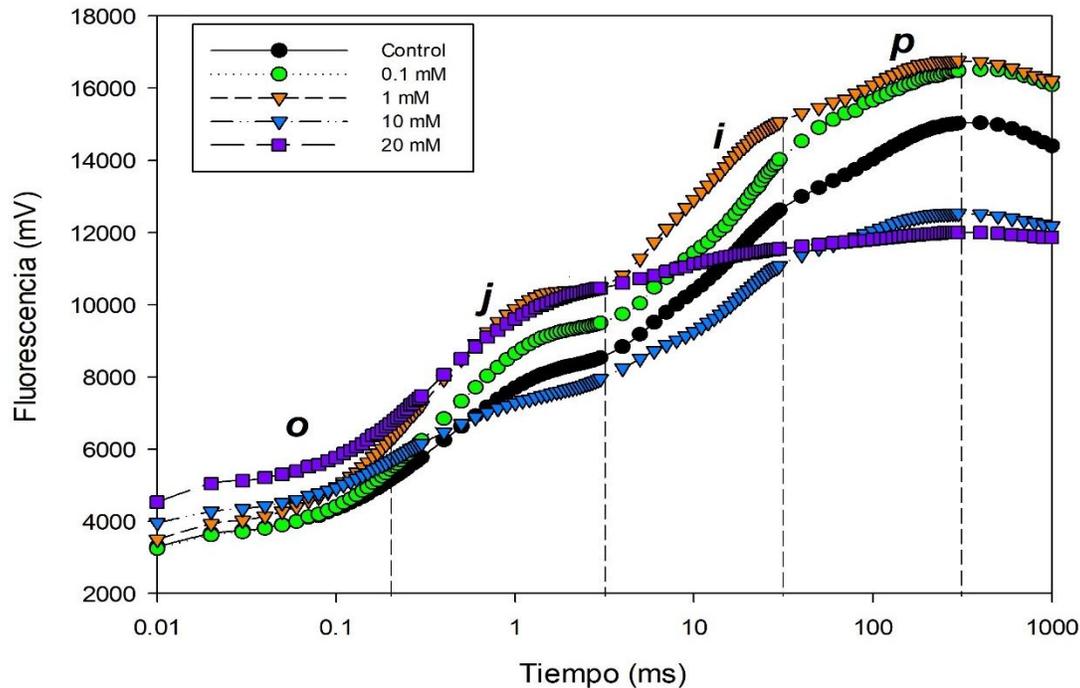


Figura 2.10. Rendimiento cuántico del PSII en plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes concentraciones de LiCl y después de 96 h de exposición.

2.9.4 Efectos de Li sobre los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides).

El contenido de clorofila a y b en plantas control fue de 650 y 500 $\mu\text{g/gPF}$, respectivamente. Las clorofilas totales fueron de 1200 $\mu\text{g/g PF}$ manteniéndose así hasta las 96 h. Mientras que las plantas que fueron expuestas a LiCl, aun en concentraciones bajas provocaron una disminución de contenido de clorofilas totales de 1,200 $\mu\text{g/gPF}$ a 400 $\mu\text{g/gPF}$ a las 96 h de exposición a (0.1, 1 y 10 mM de LiCl) lo cual representado un daño a un en concentraciones bajas, mientras que el mayor daño se observó a la concentración de 20 mM de LiCl con valores de tan solo 9 $\mu\text{g/gPF}$ de contenido de clorofila a (Figura 2.12C).

En cuanto al contenido de carotenoides, se observó una tendencia de aumentar de manera progresiva desde las 6 horas de exposición a LiCl pasando de 40 a 60 $\mu\text{g/gPF}$ en las diferentes concentraciones expuestas de LiCl y llegando a valores de 100 $\mu\text{g/gPF}$ en tiempos de 24 y 48 h, el mayor aumento se observó en las concentraciones de 10 y 20 mM de LiCl a las 96 h con valores de 160 y 190 $\mu\text{g/gPF}$ (Figura 2.12D). Este incremento sostenido en el contenido de carotenoides sugiere un papel fundamental en la protección del sistema fotosintético contra los efectos perjudiciales de las reacciones oxidativas desencadenadas por el estrés asociado a la

acumulación de Li. Estos carotenoides parecen desempeñar un papel crucial al salvaguardar la integridad del aparato fotosintético ante los daños potenciales inducidos por el estrés oxidativo resultante de la acumulación de LiCl.

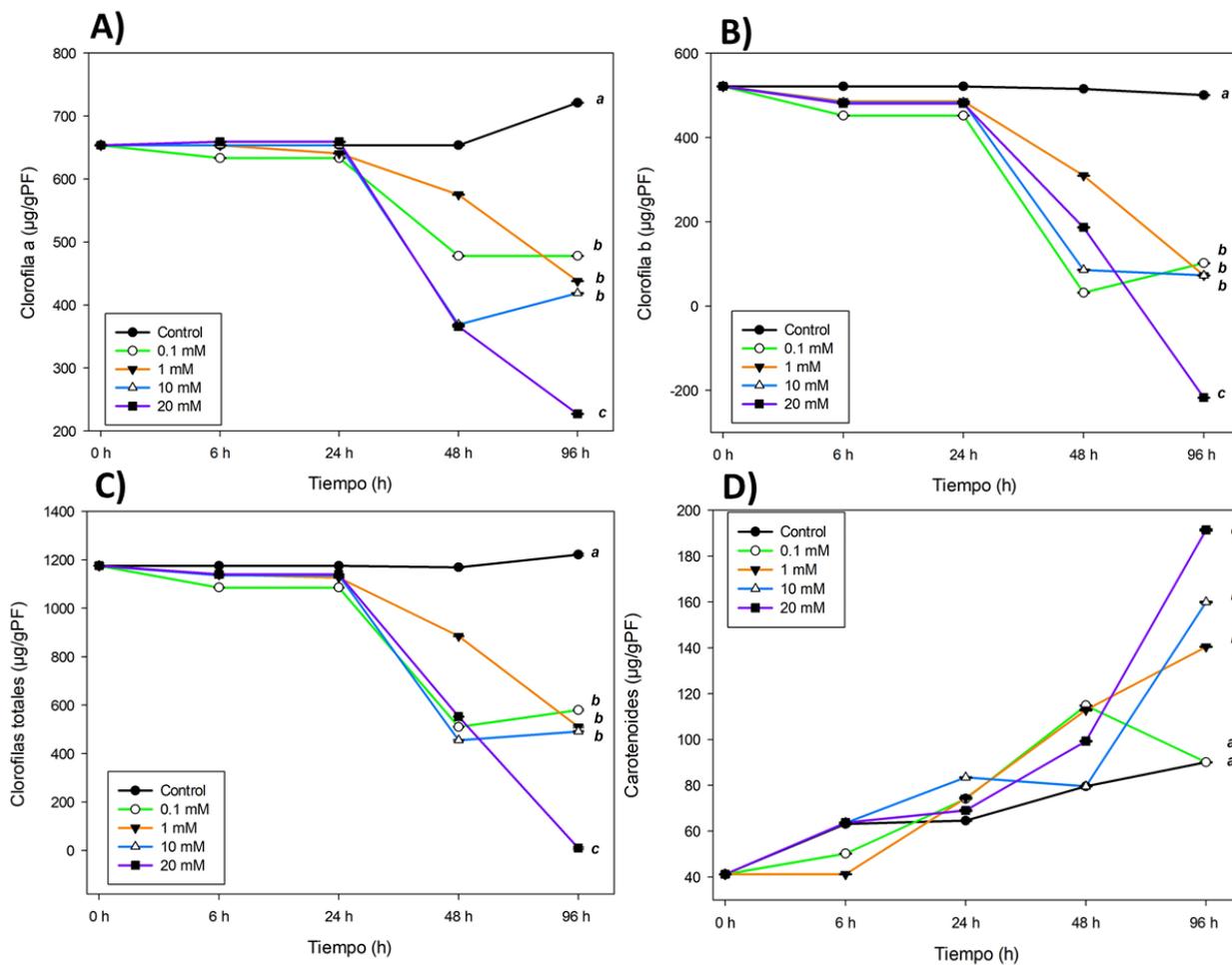


Figura 2.11. Contenido de pigmentos fotosintéticos durante la exposición a LiCl a) clorofila a b) Clorofila b c) Clorofilas totales d) carotenoides. Las barras en cada punto corresponden al promedio \pm el error estándar. Las letras en minúscula representan las diferencias significativas entre tratamiento ($p < 0.05$)

2.9.5 Efecto del Li en las relaciones hídricas (potencial hídrico (Ψ_w), osmótico (Ψ_π) y turgencia (Ψ_p)) de plantas de *Salvinia minima*.

El potencial hídrico (Ψ_w) es utilizado como indicador del contenido de agua en las plantas, por lo que en este estudio se midió este parámetro en hojas de las plantas control y de las plantas

que fueron expuestas a diferentes concentraciones de Li y en diferentes tiempos. En este estudio se evaluó que el potencial hídrico en las plantas control de *Salvinia minima* mantuvieron valores de -0.02 MPa. La exposición a bajas concentraciones (0.1mM) de litio, provocó una disminución en el potencial hídrico a las 24 y 48 horas de exposición con valores de -0.2 y -0.16 MPa, para finalmente a las 96 h regresar a valores de -0.02 MPa (Figura 21). En concentraciones de 1 mM de LiCl se observó una disminución desde las primeras 6 h de manera progresiva a las 24 y 48 h con valores de (-0.2 y -0.37 MPa), para las 96 h se observó un potencial hídrico de -0.16 MPa (Figura 2.13).

Sin embargo, altas concentraciones del metal en el medio de 10 y 20 mM de Li, causaron una caída del potencial hídrico después de 6 horas de exposición a LiCl, y siguió disminuyendo a lo largo de las 96 h que duró el experimento, hasta alcanzar valores de potencial hídrico de -0.75 MPa, en ambas concentraciones de Li. El resultado inmediato de este fenómeno fue una significativa pérdida en el contenido de agua presente en las plantas (Figura 2.13).

Se evaluó también el potencial osmótico para evaluar si hubo un posible ajuste osmótico que presentaron las plantas de *Salvinia minima* al ser expuestas a diferentes concentraciones de LiCl (0.1, 1, 10 y 20 mM) a diferentes tiempos de exposición (0, 6, 24, 48 y 96 h). Observamos que las plantas control se mantienen sin cambios en los diferentes tiempos, con un potencial osmótico de -0.46 MPa.

Pero en presencia de Li en el medio en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 20 mM de LiCl, se observó un aumento (datos más negativos) del potencial osmótico a las 24 horas de exposición con valores de (-0.52, -0.59, -0.60 y -0.64 MPa, respectivamente). A concentraciones de 1 mM LiCl, las plantas no sufren un efecto en las relaciones hídricas ya que el aumento de potencial osmótico compensa la pérdida de potencial hídrico y la turgencia se mantiene, por lo tanto, las células se mantienen turgentes.

Pero a concentraciones altas de Li en el medio (10 y 20 mM), aunque la planta aumentó el potencial osmótico, pero no fue capaz de compensar la pérdida de potencial hídrico por lo tanto a las 48 h de exposición a Li la turgencia se cae a valores de cero, provocando posiblemente una plasmólisis en las células, llevando a la planta a un daño en su estado hídrico que puede llevar a la marchitez permanente (Figura 2.13).

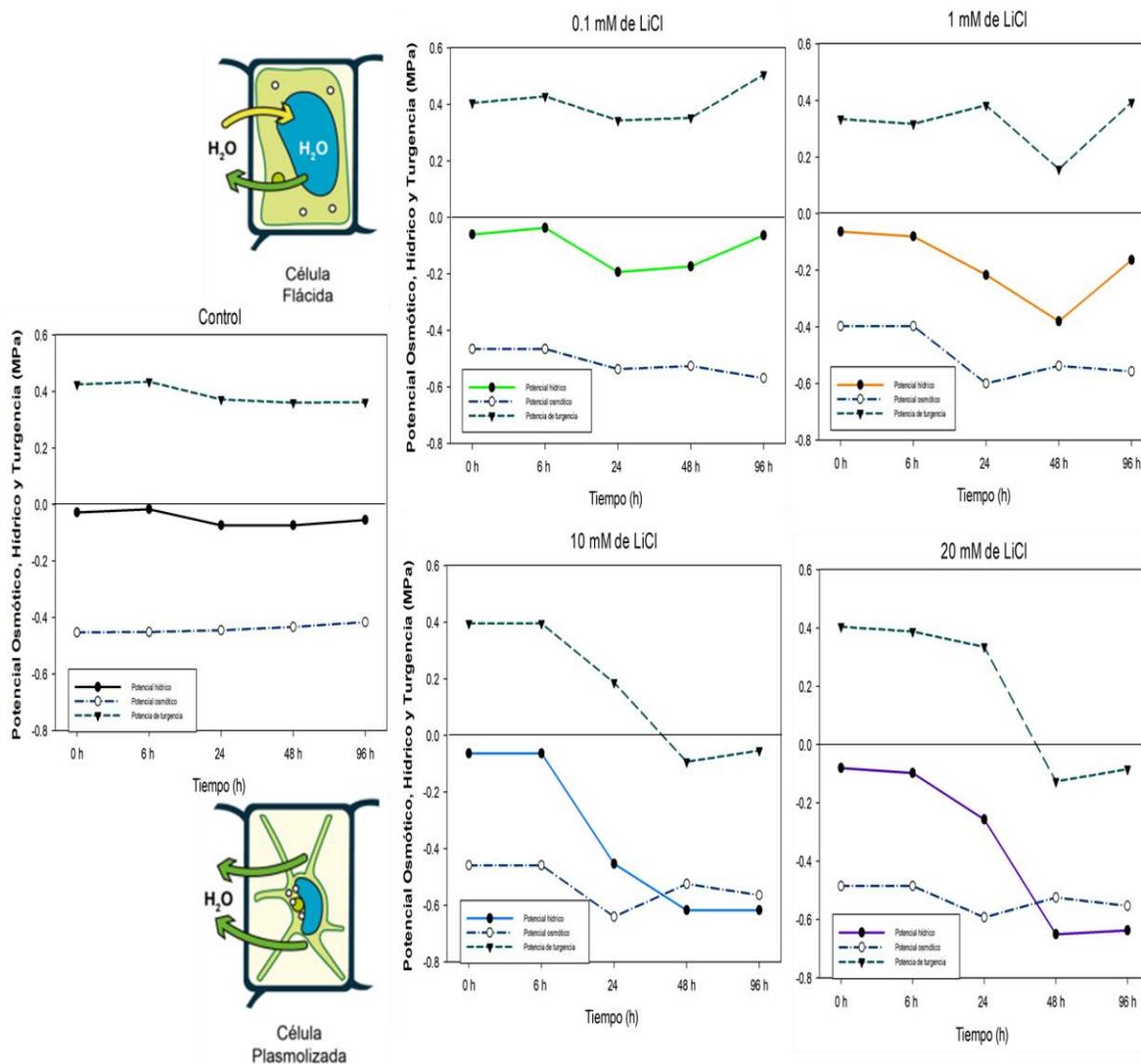


Figura 2.12. Efecto del Li en las relaciones hídricas: potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de turgencia, de las plantas de *Salvinia minima* expuesta a diferentes concentraciones de Li (0.1, 1, 10, y 20 mM de LiCl) a diferentes tiempos de incubación.

2.9.6 Fuga de electrolitos en plantas de *Salvinia minima* expuesta a Li

Se pudo observar que los niveles de fuga de electrolitos (F de E) en las raíces de las plantas control se mantuvieron estables en un 35 % al comienzo (0 y 6 h). Posteriormente, se registró un aumento a las 24 h, llegando al 37 %. Sin embargo, este valor volvió a la marca inicial de 35 % a las 48 h y se mantuvo constante hasta las 96 h. En contraste, la exposición al LiCl ocasionó un aumento notable en los valores de F de E, que indican daño en la integridad de la membrana en las raíces, incluso en concentraciones reducidas como 0.1 y 1 mM de LiCl. A medida que la

concentración de LiCl aumentaba, el daño se incrementaba, alcanzando un impactante 86 % en las raíces expuestas a una concentración de 20 mM de LiCl al cabo de 96 h (Figura 2.14A).

En referencia a las hojas, las plantas de control presentaron una tasa de F de E del 23 % al inicio (0 y 6 h). Se notó una leve disminución a las 24 h, llegando al 19 %, pero este valor se elevó nuevamente al 25 % para las 96 h. Similar a lo observado en las raíces, la presencia de litio en el medio, incluso en concentraciones bajas como 0.1 y 1 mM de LiCl, ocasionó un aumento en los niveles de F de E, alcanzando el 49 % y 55 % respectivamente a las 96 h. No obstante, las concentraciones elevadas de LiCl (10 y 20 mM) generaron un incremento drástico en la fuga de electrolitos desde las primeras 6 h de exposición, llegando a valores del 55 % y 60 % respectivamente. Estos valores se mantuvieron relativamente estables hasta las 24 h, con un segundo pico en las tasas de F de E a las 24 h y 48 h, llegando a 60 % y 73 % respectivamente, y persistiendo en estos niveles hasta las 96 h de exposición a LiCl (Figura 2.14B)

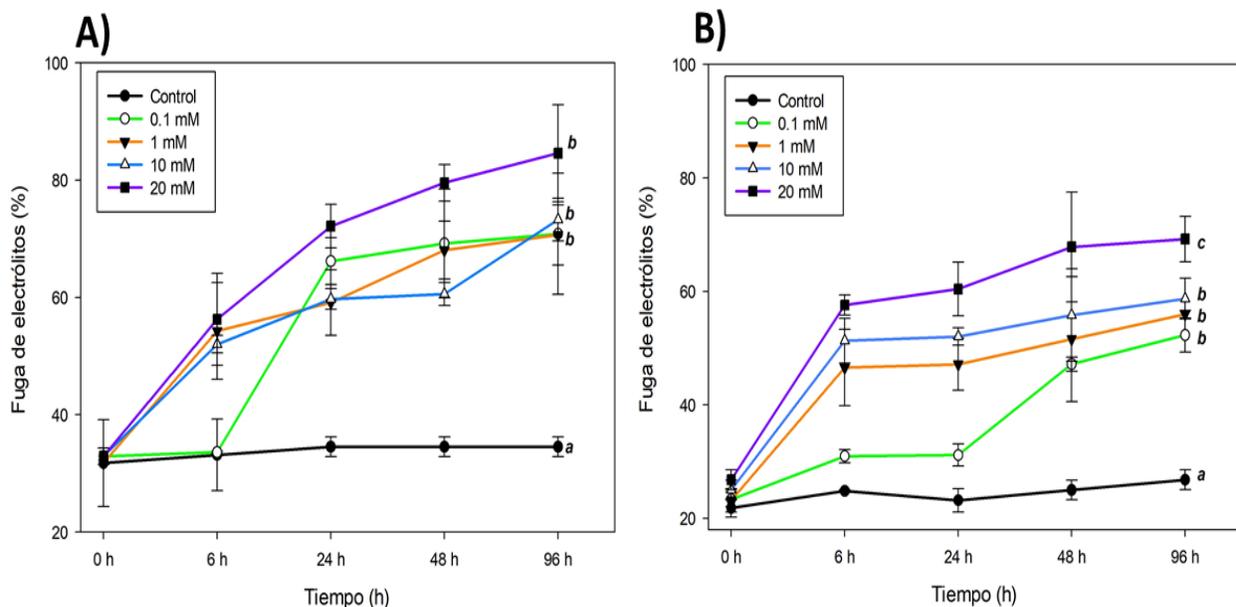


Figura 2. 13. Fuga de electrolitos A) raíz B) hoja de plantas de *Salvinia minima* expuestas a concentraciones de (0.1, 1, 10 y 20 mM de LiCl). los datos fueron analizados en a) raíz y b) hoja, por triplicado. Las barras indican la media \pm el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$).

2.9.7 Curva de dosis respuesta en los diferentes parámetros de crecimiento

Para determinar el grado de toxicidad de Li en plantas de *Salvinia mínima*, las plantas fueron retadas a diferentes concentraciones de LiCl (0, 0.1, 1, 10, y 20 mM), a tiempos largos de

exposición (96 horas), donde observamos el grado de toxicidad en los diferentes tejidos de las plantas, tanto hojas como raíz. Con los datos obtenidos pudimos apreciar que en concentraciones de 0.1 y 1 mM las plantas de *Salvinia mínima* no presentan daños significativos, a diferencia de las concentraciones más altas de 10 mM y 20 Mm de LiCl donde la plantas presenta daños significativos, como disminución tanto en hojas sanas y longitud de raíz, daños en la fluorescencia de clorofila y disminución de la tasa fotosintética. Con el aumento de la disponibilidad de Li en el medio, la concentración de Li en las plantas de *Salvinia minima* aumento significativamente tal como se aprecia en la (Figura 2.15). Donde se observa que la acumulación de Li fue de A) 0.8336 mg g⁻¹ PS cuando se le expuso a una concentración de 0.1 mM; B) 2.476 mg g⁻¹ PS en la concentración de 1 mM; C) 9.0645 mg g⁻¹ PS en 10 mM y D) 18.1789 mg g⁻¹ PS en la concentración más alta de 20 mM de LiCl. El aumento del contenido de litio dentro de la planta difirió significativamente entre las diferentes partes de la planta, tal como se observa en la Figura 2.15.

También observamos una concentración umbral mayor a uno antes de la cual no hay cambios significativos, pero a mayores concentraciones de este umbral se perciben daños fisiológicos en la mayoría de los parámetros (Figura 2.15). Sin embargo, podemos observar que la longitud y biomasa de raíz fue mas sensible al litio que otros parámetros fisiológicos an la parte aérea.

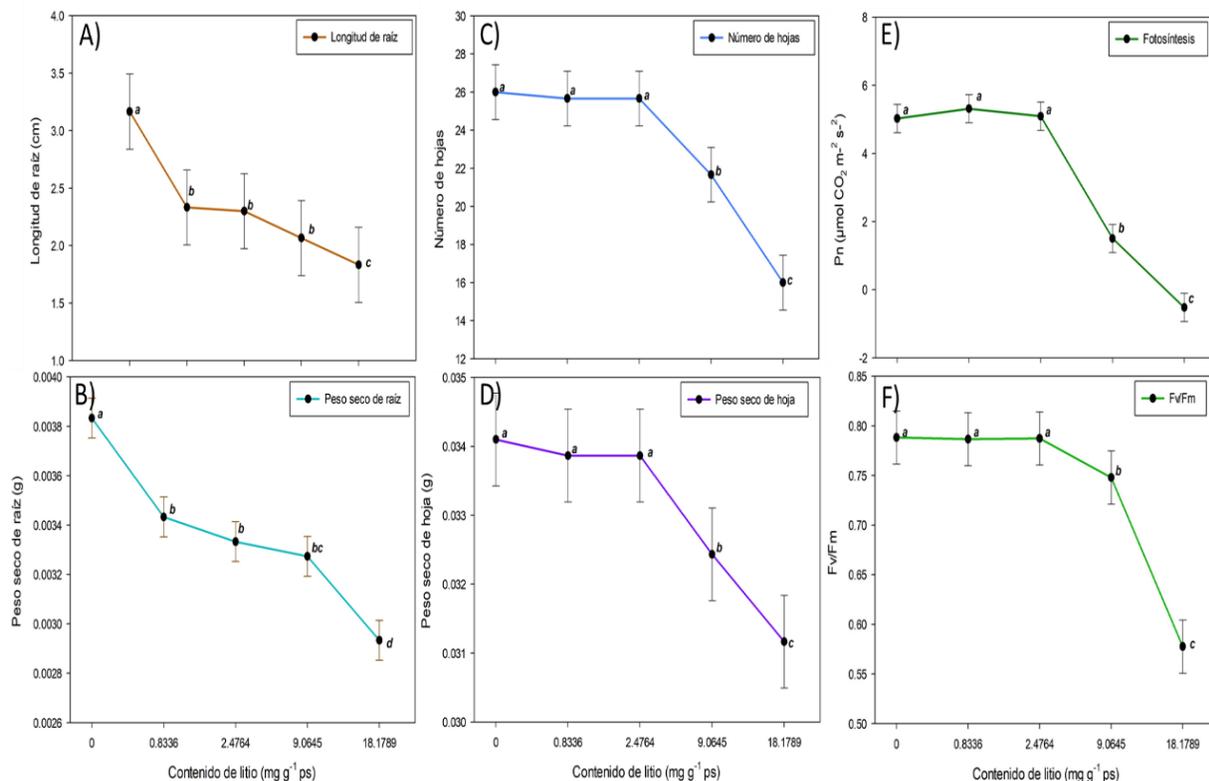


Figura 2. 14. Curva de dosis respuesta en los diferentes parámetros, a) longitud de raíz, b) peso seco de raíz, c) número de hojas, d) peso seco de hoja, e) fotosíntesis, f) Fv/Fm. Las barras indican \pm el error estándar. Las letras designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

2.9.8 Correlación entre la acumulación de Li y diferentes parámetros de crecimiento

Se elaboró una gráfica multivariante de datos de correlación en los diferentes parámetros para identificar una correlación ya sea positiva o negativa entre el aumento de contenido de Li y cómo influye en la planta. Se observó una correlación alta (con una r^2 arriba de -0.75) entre la biomasa de raíz y el contenido de Li endógeno, también se encontró una alta correlación de ($r^2 = -0.98$) entre la biomasa de las hojas y el contenido de Li. En cuanto al potencial hídrico, se observa una alta correlación de ($r^2 = -0.79$) indicando que, a mayor concentración endógena de litio, se encontraron valores más negativos de potencial hídrico. Mientras que, en la fuga de electrolitos tanto en hoja como en raíz, los datos muestran una correlación positiva relativamente más baja ($r^2 = 0.43$ y 0.60 , respectivamente). Las correlaciones entre el aumento del litio y los pigmentos fotosintéticos Chl a, b y totales con correlaciones negativas altas ($r^2 = 0.94, 0.99, 0.98$) mientras que los carotenoides fueron positivas altas 0.96 . Los parámetros de fotosíntesis y fluorescencia de clorofila (Fv/Fm), estuvieron altamente influenciados por el contenido de Li endógeno ($r^2 = -$

0.95 y -0.90, respectivamente), en este caso las correlación negativa sugiere que un aumento de absorción y acumulación de litio dentro de la planta, influye en la disminución de biomasa, la fotosíntesis, la clorofila, (Fv/Fm) y el potencial hídrico mientras que un aumento en absorción y acumulación de litio en la planta aumenta la fuga de electrolitos (ya sea en hojas y en raíz) así como del contenido de carotenoides da como resultado correlaciones positivas (Figura 2.16).

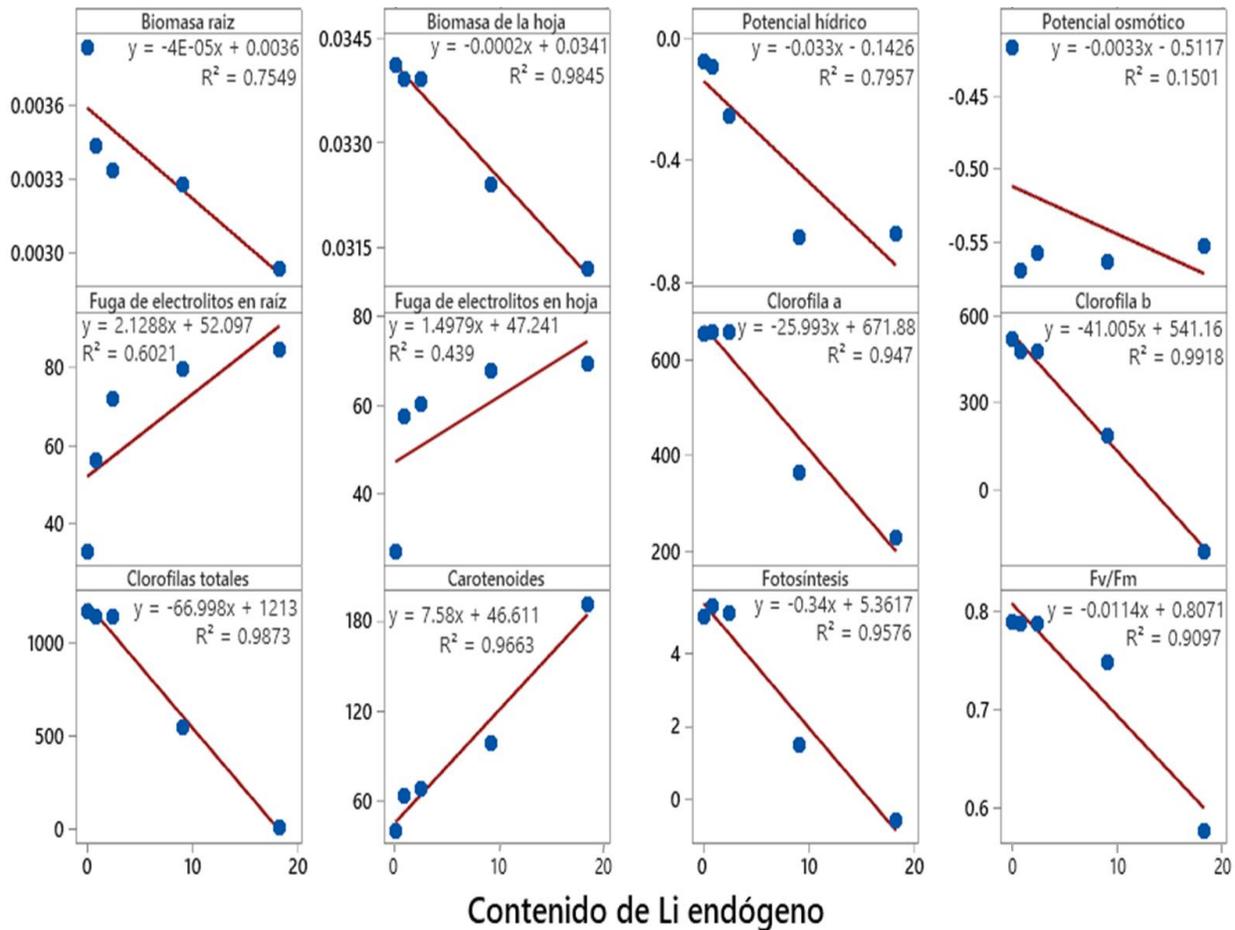


Figura 3.16. Correlación de diferentes parámetros fisiológicos en las plantas de *Salvinia minima* y contenido endógeno de Li al máximo tiempo de exposición (96 h). Se observa la gráfica de correlación de Pearson entre el contenido de litio y en número de hojas, peso seco de hoja, longitud de raíz, peso seco de raíz, fotosíntesis, Fv/Fm, concentración de pigmentos, potencial hídrico y fuga de electrolitos.

2. 10 Discusión de resultados

Capacidad de toma de Li

En nuestros datos obtenidos identificamos que *S. minima* es capaz de tomar Li del medio. Y que el Li no solo es tomado por la raíz, sino que es translocado a las hojas. También encontramos que el Li es tomado en tiempos cortos de exposición a Li por parte de las raíces y que este es rápidamente traslocado a la parte aérea. En la cuantificación de Li acumulado en la raíz observamos una respuesta rápida de absorción de Li en las primeras seis horas de exposición, seguido de un segundo aumento en el contenido de Li a las 48 h de exposición, donde fue máxima concentración, con valores de 12 mg g^{-1} PS (peso seco), en la concentración de 20 mM de LiCl, manteniéndose así después de 96 horas de exposición. En hojas, se observó un incremento en la toma de Li desde las 6 h pero fue máxima hasta las 24 h de exposición donde el contenido endógeno fue de 7 mg g^{-1} PS, manteniéndose así hasta las 96 h de exposición, en plantas expuestas a 20mM de Li. La raíz toma Li y luego la transloca a las hojas.

Mientras que en la concentración de 10 mM de LiCl tanto en raíz como en hojas, se observó una toma de Li máxima desde las 6 h con 5.5 y 2 mg/g^{-1} PS, respectivamente, manteniéndose así hasta las 96 h de exposición. En la exposición a 0.1 y 1 mM de Li, las raíces tomaron menos de 1 mg g^{-1} PS. Mientras en las hojas se observó menos de 1 mg g^{-1} PS en exposición a 1 mM después de 96 h.

Se observó toma de Li en *Salvinia minima* que fue mayor contenido de Li en raíz que en hojas, en las diferentes concentraciones. El aumento la acumulación de Li es proporcional a la concentración presente en el medio, entre mayor fue la concentración en el medio se observó una mayor absorción por parte de *Salvinia minima*, por lo que podemos concluir que la toma de Li fue concentración-dependiente y tiempo-dependiente. Este patrón ha sido reportado en otros estudios en plantas de *A. venetum* donde al tener mayor disponibilidad de Li en el suelo, las concentraciones de Li en la planta de *A. venetum* aumentaron significativamente (Li *et al.*, 2014).

En plantas de *Salvinia minima* expuestas Li, el metal se observó mayor acumuló en las raíces. Las diferencias entre el contenido del Li en las distintas partes de la planta dependieron de la concentración aplicada. Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los obtenidos en otros trabajos, que informan que el aumento de la concentración del Li en la zona radicular puede causar un aumento del contenido del Li en las partes aéreas de los cultivos agrícolas (Jurkowska *et al.*, 1995; Jurkowska *et al.*, 1998). Sin embargo, en nuestro estudio, se

observo contenido de Li en raíz y en hojas, pero el mayor contenido de Li se detectó en la raíz mientras que en las hojas fueron generalmente más bajos particularmente en concentraciones más bajas de 0.1 y 1 mM.

Las plantas pueden acumular metales en distintos grados, dependiendo de su fisiología específica. Las adaptaciones fisiológicas permiten a algunas especies tolerar y resistir condiciones iónicas adversas que son tóxicas para la mayoría de las demás plantas, la capacidad de tolerancia extremadamente alta es el carácter crucial para las acumuladoras de iones (Li *et al.*, 2014). No se observó una disminución significativa en el crecimiento de las plantas de *Salvinia minima* a concentraciones de menores de 10 mM de LiCl en el medio, pero se observó una disminución a concentraciones más altas de 20 mM LiCl. Por lo tanto, *Salvinia minima* puede caracterizarse por ser tolerante a concentraciones menores de 10 mM de LiCl en el medio de crecimiento.

La clorosis interveinal de las hojas provocadas por Li, se desarrolla a concentraciones altas de 20 mM de LiCl y en tiempos largos de exposición de 48 h. Este comportamiento se ha descrito para citrus por Bradford (1961), con una suplementación de 100 mg kg⁻¹ de Li. Otros estudios anteriores, demostraron que 50 mg Li dm⁻³ en suelo, era el nivel máximo al que podían sobrevivir las plantas de girasol y maíz provocando una disminución en la biomasa, el área foliar y la fotopigmentos sintéticos (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2012).

Nuestros datos indican que *Salvinia minima* puede acumular elevadas concentraciones de Li en sus órganos, pero simultáneamente, la acumulación tan elevada provocó cambios en la fisiología de la planta. Kalinowska *et al.* (2013), indicaron que uno de los síntomas de fitotoxicidad de Li fue la formación de manchas necróticas de varios tamaños en las hojas de lechuga más viejas. En cultivos de tabaco se ha observado la formación de hojas necróticas y enrollamiento de hojas más viejas expuestas a 50 mM de LiCl (Naranjo *et al.*, 2003). Lo cual coincide con los datos que obtuvimos ya que a concentraciones altas (20 mM) se observaron hojas cloróticas y reducción en el tamaño de las mismas.

Efectos fisiológicos durante la exposición a Li;

Fotosíntesis y fluorescencia

La planta completa de *Salvinia minima* pueden acumular 2.4764 mg g⁻¹ PS de Li de la cual no muestras ninguna afectación a nivel de fotosíntesis y clorofila (Fv/Fm) con una tasa fotosintética de 5 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, comparable a la de una planta sana (planta control), pero a concentraciones de Li mayores de este umbral, tiene efectos negativos en estos parámetros, ya que se observó que la acumulación de 9.0645 mg g⁻¹ PS la tasa fotosintética empieza a disminuir a valores de 1.43 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, la disminución más drástica se observó en la acumulación endógena de 18.1789 mg Li g⁻¹ PS donde se observaron valores de fotosíntesis negativo (Pn de - 0.60 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) en este caso la planta ya se encontraban realizando respiración. Se observa algo similar en cuanto a la eficiencia fotoquímica, a mayor acumulación de Li (de 9.0645 y 18.1789 mg g⁻¹ endógeno) las plantas de *Salvinia minima* presentaron una menor fluorescencia de clorofila de 11,500 mV, siendo las de menor rendimiento en comparación con las plantas control y las plantas que acumularon 2.4764 mg g⁻¹ PS de Li, teniendo un valor de fluorescencia más alta (14,000 y 16,000 mV, respectivamente).

Los datos encontrados en las curvas OJIP, nos proporcionó el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) en este estudio se midió la proporción de energía absorbida, dándonos datos importantes sobre la eficiencia de transporte de electrones en su función fotosintética. Se observo que contenidos de litio iguales o menores a 2.47 mg Li g⁻¹ PS, la planta no sufre ningún daño en PS II, se observa una eficiencia de transporte de electrones con un valor de hasta (16,000 mV), de hecho, estos valores son más altos que una planta control con valores de (14,000 mV) al parecer el Li en bajas concentraciones aumenta la transferencia de electrones, se observa un mayor rendimiento cuántico al PSII a los entre los 100 y 100 ms con presencia de una curva bifásica, esto posiblemente que esté cumpliendo una función que aun desconocemos. Pero a contenidos de litio endógeno mayores a este umbral empieza a ver una obstrucción de transferencia de electrones a nivel de J y P de la curva, se presenta un rendimiento cuantico menor a exposición a 10 y 20 mM de Li, desde 100 ms y ya no se observa cuarva bifásica entre los 100 y 100 ms. esto nos indica que el daño puede estar a nivel de plastoquinona (Q_A) a plastocianina (Q_C), donde la plastoquinona no es capaz de transferir (o hay una transferencia deficiente) estos electrones esto puede explicar por qué la caída de la tasa fotosintética, ya que al obstruirse la transferencia fotosintética de electrones, afecta directamente la síntesis de ATP y NADPH en los cloroplastos. Esto da como resultado una incapacidad o baja capacidad de

fijación de CO₂, necesarios para la producción de carbohidratos indispensables para la supervivencia de la planta. Por otra parte, estudios realizados por Fuentes (2017), en plantas de *Salvinia minima* en presencia de 40 µM de Ni en tiempos de exposición prolongados desde 96 y hasta 144 h provocó un descenso del transporte de electrones, que midió mediante curvas OJIP, concluyendo que las plantas de *Salvinia minima* estaban sufriendo un daño en sus propiedades estructurales y funcionales. Otros estudios se han realizados en plantas de *Sinapis alba* L., para evaluar la toxicidad de talio a concentraciones de 1,000 µg L⁻¹ donde observaron una disminución sustancial de proteínas del núcleo del PSII, esto además de una oxidación masiva de los pigmentos fotosintéticos, conllevando a las plantas a presentar un rendimiento cuántico (que midió mediante la aplicación repetitiva de pulsos de saturación para la evaluación de las curvas de fluorescencia a partir de los cuales se calculó los parámetros específicos del fotosistema II (PSII) bajo en presencia del metal (Mazur et al., 2016). Los metales pesados, si están presentes en cantidades excesivas, afectan a las proteínas y sus funciones a través de la unión a residuos de histidina, triptófano y tirosina o la función fotoquímica de los complejos clorofila-proteína al interactuar con metales funcionales y, en consecuencia, afecta negativamente el flujo de electrones fotosintéticos (Kalaji y Loboda 2007; Maksymiec, 2007).

Clorofila a, b, totales y carotenoides

La exposición a Li aun en bajas concentraciones provocó una disminución significativa en la concentración de pigmentos de plantas de *Salvinia minima* después de las 24 h de exposición a LiCl, en comparación con plantas control que mantuvieron sus valores desde el inicio y al final del experimento.

Estudios realizados en plantas de *Apocynum pictum* Schrenk cultivadas a 200 y 400 mg/kg Li, documentaron una reducción significativa en los contenidos de Clorofila a y b (24.09 y 76.75 %, respectivamente) en comparación con los de plantas control (Li et al., 2018). También se han realizados estudios en plantas de *Apocynum venetum* donde reportado que la concentración de clorofila se vio afectado significativamente por los altos niveles de Li, el contenido de clorofila a y clorofila b en las hojas no disminuyó significativamente con 50 mg kg⁻¹, sin embargo la suplementación con 200 y 400 mg Li kg⁻¹ provocó una reducción significativa de la concentración de clorofila y los parámetros de intercambio de gases, tendencia similar a la concentración de clorofila a y b que disminuyeron con el aumento de los niveles de Li en el suelo. (Li et al., 2014).

Trejo (2012) reporta una disminución en el contenido de clorofilas totales en plantas de *Salvinia minima* expuestas a 20, 40 y 80 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en relación al control sin plomo. Dicha reducción del contenido de clorofilas fue mayor conforme aumentó la concentración de plomo en el medio.

Se ha observado que la degradación de clorofilas puede deberse al incremento de la actividad de la enzima clorofilasa (Drazkiewicz, 1994). Además, en abetos nórdicos, se ha observado que la clorofila b, fue más afectada por un tratamiento con plomo, que la clorofila a (Vodnik et al., 1999).

Relaciones hídricas

El estado hídrico, de una planta y la magnitud del estrés es comúnmente caracterizado por el potencial hídrico, donde puede considerarse un síndrome complejo, integrado por una numerosa serie de procesos, algunos de los cuales son deletéreos y otros son adaptativos (Chaves et al., 2002), debido a estos es virtualmente imposible pormenorizar la totalidad de los procesos que sufren algún daño por el estrés provocado por Li. Sin embargo, en este estudio se decidió evaluar el potencial hídrico en las plantas de *Salvinia minima* en diferentes concentraciones de Li (0.1, 1, 10 y 20 mM) en los diferentes puntos de tiempos de exposición (0, 6, 24, 48 y 96 h). En los datos observados una planta sana (control) mantiene su potencial hídrico en -0.02 MPa, este mismo potencial se observó en concentraciones de 0.1 mM de LiCl, pero a concentraciones mayores como a 1 mM empieza a tener una tendencia de pérdida de potencial hídrico, y entre mayor fue la concentración de Li en el medio mayor fue la pérdida de potencial hídrico. Posiblemente el Li esté afectando la membrana de las raíces, lo que pudiera resultar en una limitación en la toma de agua en el medio o una deficiente retención de agua. Reportes con otros metales como Ni, indican también una disminución en el potencial hídrico en plantas de *Salvinia minima* (Fuentes., 2017). Estudios realizados en plantas de *Triticum aestivum*, después de cuatro días de exposición a una concentración de 10 mM de Ni, las plantas de trigo presentaron una disminución en el contenido de agua, produciendo un potencial hídrico más negativo, por lo que los autores concluyen que esta disminución en el contenido de agua es parte de un mecanismo de defensa que las plantas emplearon, hasta cierto punto para limitar la toma de Ni en el medio al que fueron expuestas. Posiblemente los valores tan negativos que observamos en el potencial hídrico en las plantas de *Salvinia minima* en presencia del Li se deba, hasta cierto punto a una limitada toma del agua en el medio, como consecuencia a la exposición a concentraciones elevadas de Li y a largos tiempos de exposición, tal como lo reporta Bishnoi et al. (1993). Con nuestros datos

obtenidos con el potencial hídrico se puede concluir que la presencia de Li en el medio provocó un estrés hídrico inducido por la presencia de Li, aún en bajas concentraciones.

Con la finalidad de entender a más profundidad el efecto de Li en las relaciones hídricas de la planta, se decidió evaluar a la par el potencial osmótico en las plantas de *Salvinia minima*. En este caso observamos, valores de potencial osmótico de -0.45 en las plantas control y valores un poco más negativos del potencial osmótico a las 24 y 48 h de exposición a Li a 1, 10 y 20 mM. Esto posiblemente como un tipo de mecanismo de respuesta de un ajuste osmótico, que se puede darse por un aumento de moléculas osmóticamente activas (posiblemente prolina, glicina betaína, manitol, trehalosa, potasio etc.) que podrían estar participando en la osmorregulación. La acumulación de osmolitos se ha reportado en presencia de metales pesados, donde se reportó un aumento de prolina en plantas de *Salvinia minima* expuestas a 40 μ M de Ni, concluyendo que prolina está contribuyendo a un ajuste osmótico (Fuentes, 2017). Estudios realizados en plantas de *Nicotiana tabacum* expuesta a 100 M de Cd, evaluaron el papel de prolina ante un posible ajuste osmótico, los autores confirmaron la importancia de este osmolito como osmoregulador en plantas de Tabaco en altas concentraciones de Cadmio. En este estudio al disminuir el potencial hídrico y mantenerse el potencial osmótico nos indica que la planta disminuye su potencial de turgencia y puede llegar a sufrir plasmólisis y muerte celular (Morgan 1984), indica que la disminución de la turgencia con un bajo ajuste osmótico es una importante adaptación fisiológica de las plantas relacionado con los efectos perjudiciales del incremento en el déficit hídrico, que se observó en la exposición a altas concentraciones de Li (10 y 20 mM) en los tiempos de 48 y 96 h.

Fuga de electrolitos

Otros de los daños observados en este estudio, fue el daño de la integridad de membrana tanto en la raíz como en la hoja de la planta, este provocó la creciente fuga de electrolitos en ambos tejidos conforme aumento la concentración de Li en el medio.

Esta tendencia, fue reportada en otros estudios con diferentes metales; por mencionar algunos, Ni (Fuentes et al., 2014), y plomo (Leal et al., 2016) en plantas de *Salvinia minima*, y es posible que esté asociada a la formación de especies reactivas de oxígeno a través de una reacción entre superóxido y H₂O₂ (reacción de Haber-Weis), que provoca cambios en la permeabilidad, organización e integridad de las membranas biológicas (Sadmann y Böeger, 1980).

Por otro lado, observamos que las plantas de *Salvinia minima* tiene una mayor tolerancia a Li en comparación con otros metales reportados. Trejo *et al.*, (2012), reportó que, a concentraciones de 40 µM de plomo, presentaron una reducción en la biomasa de las plantas aun en tiempos de 120 h, comparando con nuestros datos obtenidos, nos atrevemos a decir que *Salvinia minima* es más tolerante a Li ya que nosotros llegamos a observar daños en la planta a concentraciones mucho más altas (20 mM) de LiCl, concentración muy superior que la evaluada en plomo.

Otra evidencia de que *Salvinia minima* presenta una mayor tolerancia a Li que a otros metales, es el hecho de que a 40 µM de Ni²⁺, se observaron daños significativos (Fuentes *et al.* 2017), mientras en el presente trabajo encontramos daños en presencia de Li a concentraciones mucho mayores (20 mM).

Como lo mencionado en los antecedentes, los metales a nivel tóxico tienen la capacidad de interactuar con varias biomoléculas celulares como las proteínas nucleares y el ADN, lo que conlleva al aumento excesivo de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto provoca graves anomalías morfológicas, metabólicas y fisiológicas en plantas que van desde la clorosis, disminución de biomasa, peroxidación de lípidos, daño en membranas, disminución en la fotosíntesis, afectación en el transporte de electrones (en la fase de luz) como lo observado en las curvas OJIP.

Como ya se ha reportado en la literatura, las plantas hiperacumuladoras poseen mecanismos de tolerancias claves, de estos son los metales quelantes, como es el caso del litio, que forma el complejo metálico del glutatión (GSH) o las fitoquelatina (PCs), a nivel intra e intercelular, que es seguido por la eliminación de los iones metálicos de sitios sensibles o el secuestro vacuolar del

complejo ligando-metal. Por lo que las plantas de *Salvinia minima* muestran una compleja red de mecanismos homeostáticos que le pudieran servir para contrarrestar el daño en presencia de agentes tóxicos, como es el caso del litio.

2. 11 CONCLUSIÓN

La planta *Salvinia mínima* demostró su capacidad para eliminar el Li de soluciones acuosas, mostrando un comportamiento hiperacumulador. A concentraciones de 0.1 mM, se logró una completa eliminación del metal del medio después de 96 h. En la concentración de 1 mM, se observó una reducción del 90 % del metal inicial. En cuanto a las concentraciones más altas, 10 y 20 mM, se registró una disminución del 30 % del metal inicial a las 96 h.

En este contexto, se destaca la presencia de Li en ambas raíces y hojas, siendo las raíces las que contenían mayor cantidad. Esta absorción se evaluó a lo largo del tiempo, sugiriendo un movimiento del Li desde las raíces hacia las hojas.

Salvinia minima demostró ser resistente a concentraciones bajas de Li, no presentando daños significativos después de 96 h. Sin embargo, concentraciones mayores, a partir de 10 y 20 mM de LiCl, ocasionaron daños considerables, incluyendo un cambio de coloración en las hojas, de verde esmeralda a tonos blancos, especialmente evidente después de 96 h.

Las concentraciones más altas de Li, junto con exposiciones prolongadas, provocaron un daño notable que incluyó una reducción en la fotosíntesis y en la fluorescencia de clorofila. Estos efectos podrían relacionarse con cierres estomáticos inducidos por el Li, reducción de la disponibilidad de CO₂ y posibles daños en el transporte de electrones.

Además, se observó una degradación de pigmentos fotosintéticos, clorofila a y b, correlacionada con el contenido endógeno de Li en las células. Esta degradación podría ser el resultado de un estrés oxidativo causado por la presencia del metal en las células, aunque se requiere cuantificar ROS para confirmar esta hipótesis.

El estrés hídrico inducido por el Li podría deberse a daños en las membranas radiculares, limitando la absorción de agua como una respuesta para reducir la entrada de Li. En línea con

esto, se observó una mayor fuga de electrolitos en plantas expuestas a Li, incluso en concentraciones bajas, con el punto máximo en la concentración de 20 mM de LiCl.

Salvinia mínima parece tener umbrales de tolerancia a concentraciones de 0.1 y 1 mM de LiCl, con ligeros cambios en algunos parámetros fisiológicos. No obstante, daños fisiológicos graves se hacen evidentes a concentraciones superiores.

Las altas concentraciones de Li provocaron acumulación en hojas y raíces, lo que se correlacionó directamente con la disminución de varios parámetros de crecimiento y fisiológicos. Correlaciones negativas fuertes ($r^2=-0.75$ a $r^2=-0.9$) entre el contenido de Li y estos parámetros indican que ciertos procesos son más sensibles a la exposición al Li que otros.

CAPÍTULO III

Selección de genes posiblemente involucrados en la respuesta a Li en *Salvinia mínima*.

3.1 Introducción.

Se cuenta con un banco sustractivo que se realizó a partir de plantas de *Salvinia mínima* expuestas a 40uM de Pb (NO₃)₂ (Uh, 2008). Las secuencias obtenidas del banco sustractivo fueron analizadas usando BLAST. El análisis inicial reportó una colección de 365 de secuencias expresadas ó EST (Expressed Sequence Tag, por sus siglas en inglés). Este análisis de secuenciación fue realizado en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, LANGEBIO, en el CINVESTAV-Irapuato, usando un secuenciador ABI300 Prism Genetic Analyzer (Bioscience, USA).

A partir de las 365 secuencias obtenidas, se realizó la selección de los fragmentos de adaptadores, vectores y virales con ayuda de la herramienta VecScreen del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Utilizando el programa Blast2GO se determinó las secuencias similares de las 365 ESTs mediante el algoritmo BLASTx contra la base de datos no-redundante (nr) del NCBI (Conesa et al. 2005), aplicando los criterios de selección del valor de $E < 1e^{-03}$ considerado con similitud significativa, aquellos con un valor de $E > 1e^{-03}$ se considero que no tiene ninguna similitud significativa y fueron asignados a la categoría de no clasificados (Brandle et al., 2002). Mientras las ESTs con ninguna similitud (no hay aciertos) se definieron como "desconocido". Las secuencias fueron clasificados por Gene Ontology (GO) (valor $E \leq 1e^{-03}$) a través del programa Blast2GO (Conesa et al. 2005). También se analizaron las secuencias para obtener anotaciones de acuerdo con la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y la identificación de las KEGG PATHWAY en las cuales están involucradas las ESTs (Kanehisa y Goto, 2000). Para lograr la clasificación funcional de las secuencias con HIT significativo se usó la modalidad BLASTx, con el que se clasificó en base a la categorización de los péptidos reportados en Arabidopsis y, en estrés abiótico y metales pesados (Gene Ontology). En este análisis se emplearon los programas Softberry (Sagitov V. www.softberry.com). y Fr33 (Pawlowski N. <http://www.fr33.net>)

3.2 Anotación funcional de las ESTs

Las 365 secuencias de la biblioteca SSH fueron analizadas con el programa Blast2GO. De los 365 ESTs, 141 (39,18%) presentaron homología con al menos una proteína registrada en el GenBank con un valor de $E < 1e-03$ (Tabla 3.1), mientras que 224 ESTs no presentaron homología con base de datos del GenBank, definiéndose como secuencias desconocidas. El hecho de que sólo un tercio de las ESTs presentaron resultados de homología contra la base de datos del GenBank, podría reflejar el hecho de que se han realizado muy pocos estudios genómicos en helechos acuáticos (Leal et al., 2016). En la Tabla 3.1, se muestran algunas de las ESTs obtenidas, donde se indica como se encontraron las secuencias de interés

Tabla 3.1. Información de los 141 ESTs clasificadas a partir de la biblioteca de SSH de *Salvinia minima* expuesta a una solución 40 μ M Pb (NO₃)₂ durante 12 h. Dentro de cada grupo sobre la base de la función molecular (GO términos), el nombre, la longitud, GI, anotación funcional putativo (basado en el mejor hit de BLASTx), el valor de E, procesos biológicos (GO términos), y enzima en la que codifica (KEGG). Los asteriscos (*) representan secuencias de alta relevancia en la respuesta al estrés a plomo en plantas de *Salvinia minima*

Nombre de la secuencia	Tamaño de la secuencia	GI	Mejor hit	E-Value	Proceso biológico (Go terms)	Enzima en la que codifica	
Función molecular (Go terms)							
Unión (nucleotide, RNA, DNA, NADP, GTP)							
Sm003_f02	257	JZ898283	Acyl-CoA N-acyltransferase domain-containing protein	3.1e-25	biosynthetic process	Transferring groups other than amino-acyl groups EC: 2.3.1	
Sm003_g02	600	JZ898287	Pyruvate orthophosphate dikinase, Partial	2.9e-107		Pyruvate, phosphate dikinase EC: 2.7.9.1	
Sm002_h10	416	JZ898269	C-type lectin receptor-like tyrosine-kinase Atlg52310	7.1e-73	Cell-cell signaling; response to stress	Protein-tyrosine kinases EC: 2.7.10	
Sm001_b12	339	JZ898222	Casein kinase I isoform delta-like	4.7e-29	cellular protein modification process	Protein-serine/threonine kinases EC:2.7.11	
Sm002_e11	*	534	JZ898264	ATP-dependent zinc metalloprotease F15H 2, chloroplastic	2.4e-75	protein metabolic process	In phosphorus-containing anhydrides EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15; Metalloendopeptidases EC: 3.4.24; Microtubule-severing ATPase EC: 3.6.4.3
Sm001_h08	*	291	JZ898245	Serine threonine-Kinase HT1	2.8e-33	signal transduction; response to stress	Dual-specificity kinase EC: 2.7.12.1
Sm004_d07	283	JZ898298	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, partial	3.7e-53	metabolic process	Carboxy-Lyases EC: 4.1.1; EC: 4.1.1.49	
Sm001_e07	*	604	JZ898235	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-4-like	2.0e-129	Biosynthetic process	Acid-Ammon(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 6.3.1; EC: 6.3.1.2
Sm003_h05	*	492	JZ898289	Glutamine synthetase	1.4e-101	biosynthetic process	Acid-Ammon(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 6.3.1; EC: 6.3.1.2
Sm004_c08	*	218	JZ898295	Glutamine synthetase	1.1e-33	biosynthetic process	Acid-Ammon(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 6.3.1; EC: 6.3.1.2

Nombre de la secuencia	Tamaño de la secuencia	GI	Mejor hit	E-Value	Proceso biológico (Go terms)	Enzima en la que codifica	
Función molecular (Go terms)							
Unión (nucleotide, RNA, DNA, NADP, GTP)							
Sm001_e12	414	JZ898236	Calmodulin-interacting 111	2.3e-47		Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15	
Sm001_f08	318	JZ898241	Kinesin heavy chain	6.4e-37	Cellular process	Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15	
Sm001_h04	*	336	JZ898244	ABC transporter G family member 15-like	4.2e-30	Cellular process	Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15
Sm001_h11	*	684	JZ898246	Plasma membrane ATPase 4	9.8e-114	biosynthetic process	Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.3.6; EC: 3.6.1.15
Sm003_b01	*	602	JZ898275	Multidrug resistance ABC transporter C family	5.0e-91	cellular process	Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15
Sm003_b07	*	335	JZ898277	ABC transporter C family member 4	1.6e-46	cellular process	Acid-Ammoni(or Amine) Ligases (Amide Synthases) EC: 3.6.1; EC: 3.6.1.3; EC: 3.6.1.15; EC: 1.3.1.74
Sm001_c01	250	JZ898223	Polypyrimidine tract-binding homolog 2-like isoform x5	4.2e-38	metabolic process	2-alkenal reductase (NAD(P)(+)) EC: 1.3.1.74	
Sm002_e10	*	348	JZ898263	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 9-like	4.2e-31	metabolic process	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase EC: 2.7.1.68
Sm002_a11	*	463	JZ898249	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase	2.9e-83		(s)-2-hydroxy-acid oxidase EC: 1.1.3.15
Sm001_a03	*	850	JZ898213	Luminal-binding protein 5	0.0e+00		
Sm001_b11	290	JZ898221	ADP-ribosylation factor, partial	4.6e-63	signal transduction		
Sm001_f07	753	JZ898240	Putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g68930	1.6e-51	biological process		
Sm002_b06	443	JZ898251	Pirin-like family protein	2.5e-47			
Sm002_d07	422	JZ898258	Pentatricopeptide repeat-containing At2g31400, chloroplastic	6.7e-59	signal transduction		
Sm002_g02	566	JZ898266	Angio-associated migratory cell protein-like	2.7e-71			
Sm002_g09	*	309	JZ898268	Protein Translation factor SUI1 homolog	2.9e-45		
Sm003_a05	201	JZ898273	Glycine-rich RNA-binding protein GRP1A-Like	1.3e-29			
Sm003_c05	*	327	JZ898280	Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor	1.9e-25	Cellular protein modification process	
Sm003_g04	270	JZ898288	Sigma factor	7.7e-19	biosynthetic process		
Sm003_h09	*	474	JZ898290	Autophagy-related protein 18c-like	9.0e-21		
Sm004_b07	243	JZ898293	Myb-like protein G	9.1e-21	Biosynthetic process		

S21

De los 141 ESTs, 131 ESTs, (92.9%) mostraron al menos una anotación GO (Gene Ontology). Los restantes 10 ESTs (7.1%) no mostraron anotaciones GO (Gene Ontology). Varias ESTs presentaron más de una anotación GO por lo cual se procedió a clasificarlos en las 3 categorías de Gene Ontology con la ayuda del programa Blast2GO. De tal manera, que se asignó un total de 72 ESTs a la categoría de proceso biológico (Grupo A) A), 60 ESTs a la función molecular (Grupo B) y 62 a componente celular (Grupo C).

3. 3 Análisis de las rutas metabólicas (KEGG PATHWAY)

Basándose en los resultados de anotación contra la base de datos KEGG, 41 ESTs codifican enzimas que fueron asignadas en 31 KEGG Pathway con un valor de $p < 0.05$. KEGG Pathway análisis se llevó a cabo con el fin de aclarar la distribución de las enzimas codificadas por estos ESTs en vías de metabolismo globales.

Los resultados de este análisis mostraron que los ESTs clasificados de la SSH están implicados en las vías metabólicas tales como metabolismo del piruvato (5 ESTs), glioxilato y el metabolismo dicarboxilato (4 ESTs), ciclo de citrato, metabolismo de las purinas, y la fijación de carbono, (cada una de ellas representada por 3 ESTs). Sólo 1 o 2 ESTs se agruparon en las otras 26 rutas metabólicas.

De las 365 ESTs, 141 ESTs (39%) mostraron similitud mediante BLASTx con la base de datos NCBI, compartiendo alta similitud con las secuencias reportadas de gimnospermas (*Picea sitchensis*), y la briofita (*Physcomitrella patens*). De las 141 ESTs que presentaron similitud, 131 ESTs (93%) tenían una o más anotaciones GO (Gene Ontology) clasificándose en las siguientes categorías: 1) Proceso biológico “GO: 0008150” principalmente se agruparon Proceso metabólico “GO: 0008152” y proceso celular “GO: 0009987”, 2) Función molecular “GO: 0003674” principalmente se agruparon en unión a compuestos heterocíclico “GO: 1901363” y union ciclicos organicos “GO: 0097159” y 3) Componente celular “GO: 0005575” principalmente se localizaron en plastidio “GO: 0009536”, nucleo “GO: 0005634” y citosol “GO: 0005829”.

Genes que codifican a 4 transportadores

Del analisis anterior, decidimos evaluar si estos transportadores que mostraron tener un papel en respuesta a plomo, tambien pudieran tener un ppael en rspuesta a litio

Gen ATPasa P3A

Por otra parte, el gen ATPasa P3A (JZ898246) presentó 6 anotaciones en términos GO (Gene Ontology), dándole las características de un transportador, 1) Localización en membrana (GO: 0016020). 2) Función de transportador macromolecular de iones (GO:0005215). 3) Proceso biosintético da energía para el metabolismo de compuestos (GO: 0009058). 4) Unión a nucleótidos interacciones de forma no covalente con nucleótidos (GO: 0000166). 5) Proceso metabólico de compuestos que contiene nucleobase (GO: 0006139). 6) Actividad de hidrolasa de enlaces como CO, CN, CC, etc (GO: 0016787) (Leal *et al.*, 2017)

Gen ABCC

El gen ABCC (JZ898275) (Sm003_b01) presentó 5 anotaciones en términos de GO (Gene Ontology), dándole las características de un transportador: 1) Localización en membrana (GO: 0016020). 2) Función de transportador macromolecular, iones (GO: 0005215). 3) Proceso celular, fisiología celular, mantenimiento celular (GO: 0009987). 4) Unión a nucleótidos, interaccionando de forma no covalente con nucleótidos (GO: 0000166). 5) Actividad de hidrolasa de enlaces como CO, CN, CC, etc (GO: 0016787) (Leal *et al.*, 2017).

Gen Na⁺/H⁺

Leal., *et al* identificó que el gen Na⁺/H⁺ (JZ898280) muestra homología con los antiporter NhaD Na⁺/H⁺ reportados en otras especies y sorprendentemente se encontró mediante el árbol filogenético que el gen Na⁺/H⁺ (JZ898280) está más relacionado evolutivamente con la proteína SELMODRAFT_179490 (GI: 302801119) reportado en *Selaginella moellendorffii*. Por otra parte, la EST Sm003_c05 presentó 4 anotaciones en términos GO (Gene Ontology), dándole las características de un transportador, 1) Localización en membrana (GO: 0016020). 2) Función de transportador de macromolecular, iones (Na⁺/H⁺) (GO: 0005215). 3) Plastidos, organelos localizados en el citoplasma de plantas (GO: 0009536). 4) Proceso celular, fisiología celular, mantenimiento celular (GO: 0009987) (Leal *et al.*, 2017).

Gen ABCG

El gen ABCG JZ898275 presentó 1 anotación en términos GO (Gene Ontology) correspondiente al dominio que presentó homología con transportadores ABCG de otras especies, 1) Unión a

nucleótidos interacciones de forma no covalente con nucleótidos (GO: 0000166) (Leal et al., 2017).

3. 4 Caracterización de la expresión de los genes candidatos en respuesta a Li en hojas y raíces de *Salvinia minima*.

La respuesta de las plantas a los metales es compleja. Los diferentes tipos de estrés abióticos, normalmente desencadenan estrés osmótico y oxidativo, de manera secundaria, provocan una alteración de la homeostasis iónica y osmótica en las células afectadas, y puede afectar a la estructura y función de las proteínas de las membranas.

Con el fin de hacer frente a estos tipos de estrés (osmótico y oxidativo), las plantas normalmente cuentan con sistemas para: a) percibir el estrés, b) transducir la señal, c) activar de factores de transcripción, que regulan otros genes corriente abajo y, por último, d) activar genes implicados en cuatro mecanismos diferentes de respuesta al estrés, tales como: 1) mecanismos de desintoxicación, 2) mecanismos de osmo-protección contra la alteración de la homeostasis osmótica e iónica, 3) mecanismos implicados en la protección de las membranas y proteínas, y por último 4) mecanismos implicados en el movimiento de iones, tales como transportadores de iones para restablecer la homeostasis iónica de la célula (Marco et al, 2015).

De las 365 ESTs, 141 ESTs (39%) mostraron similitud mediante BLASTx con la base de datos NCBI, compartiendo alta similitud con las secuencias reportadas de gimnospermas (*Picea sitchensis*), y la briofita (*Physcomitrella patens*). De las 141 ESTs que presentaron similitud, 131 ESTs (93%) tenían una o más anotaciones GO (Gene Ontology) clasificándose en las siguientes categorías: 1) Proceso biológico, principalmente se agruparon Proceso metabólico y proceso celular, 2) Función molecular, principalmente se agruparon en unión a compuestos heterocíclico y unión cíclicos orgánicos y 3) Componente celular principalmente se localizaron en plastidio, núcleo y citosol.

En el caso de las plantas de *Salvinia minima* expuestas al Pb, se identificaron 141 genes diferencialmente expresados en respuesta a una corta exposición (12 horas) a una solución de 40 μM de Pb (NO_3)₂ a partir de las secuencias reportadas en la biblioteca SSH (Uh-Ramos, 2008). Dentro de los genes que mostraron expresión diferencial en respuesta a plomo, se encontraron genes que pueden estar implicados en: a) La percepción del estrés inducido por la presencia de Pb, genes como Wall associated receptor kinase 2-like (Sivaguru et al., 2003). b) La transducción de señales, como los que codifican para-Calcium-dependent protein kinase like “CDPK” (Asano

et al., 2012). c) Factores de transcripción, como el MYB1r1-like (Shin et al., 2011); y el factor de transcripción GATA (Shaikhali et al., 2012), que en otros tipos de estrés abióticos han demostrado que desempeñan un papel crucial, ya que pueden activar otros genes corrientes abajo, es posible que estos genes pueden participar en los mecanismos de defensa para lidiar con el estrés inducido por Pb.

De igual forma, se identificaron genes que codifican para transportadores como:

1) Transportadores tipo ABCC involucrados en la desintoxicación de la célula (Bovet et al., 2003; Wojas et al., 2009).

2) Transportador tipo ATPasa 4 que podría estar implicado en el transporte de iones (Pedersen et al., 2012).

3) Antiporter Na^+/H^+ involucrado en el control de la homeostasis celular. Es posible que en *Salvinia minima* al ser expuesta al estrés por plomo, el antiporter Na^+/H^+ pueda contribuir a restaurar el desequilibrio iónico causada por el metal, de una manera similar a la documentada para el estrés de salinidad en otras plantas (Müller et al., 2014).

4) Transportadores ABCG de tamaño medio WBC están implicados en el transporte de cera a la cutícula (Buda et al., 2013), en particular se ha asociado con la acumulación de cutina bajo estrés por sequía (Jarzyniak & Jasiński, 2014).

Por lo anterior el objetivo del siguiente capítulo fue caracterizar los niveles de expresión de éstos 4 genes transportadores en respuesta a Li en plantas de *Salvinia minima* y evaluar si el patrón de expresión tiene alguna correlación con el el contenido de Li en los tejidos de raíz (absorción) y hojas (transporte) y con el comportamiento de los mparamtros fisiológicos estudiados en diferentes tiempos de exposición a Li.

3. 5 Materiales y métodos

3.5.1 Material Vegetal

El material vegetal se colectó en los experimentos de exposición al litio descritos en el capítulo II y se utilizaron para las evaluaciones de expresión de genes. En estas muestras inicialmente se

realizaron lavados con EDTA (50 mM) posteriormente se realizaron lavados con agua destilada con la finalidad de tener el material vegetal lo más limpio posible.

3.5.2 Método de Extracción de RNA y síntesis de DNAc

EL ARN total fue extraído de las plantas de *Salvinia minima* en cada uno de los tratamientos: 1) plantas expuestas a una solución 0.1 y 20 mM de litio a diferentes tiempos de exposición (6, 24, 48, 96 horas), 2) plantas control. Se utilizó el método de CTAB (Uh-Ramos, 2008) con modificaciones a partir de los tejidos de raíces y hojas de *S. minima*. El ADNc se sintetizó a partir de ARNm con SuperScript® transcriptasa reversa III (Invitrogen, Carlsbad, California) según las especificaciones del proveedor.

3.5.3 Diseño de oligos

A partir de las 4 secuencias de las ESTs JZ898275, JZ898246, JZ898280, JZ898244 y el homólogo del Factor de elongación 1-alfa (EF1-alpha), reportado en la especie *Arabidopsis thaliana* (GI: 145322982), se procedió a realizar el diseño de oligos específicos para RT-PCR (Tabla 4.3) con ayuda de los programas Primer Premier Software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) y Primer Express software (Applied Biosystems, Cheshire, United Kingdom).

Tabla 3.2. Información de los oligos correspondiente a cada uno de los genes que codifican para transportadores y el gen de referencia para RT-PCR (Leal et al 2016).

Gen	Oligos	Pb	Tm °C	Fragmento esperado pb
JZ898275	Forward	18	60.1	406
	Reverse	19	58.1	
JZ898246	Forward	18	61.7	492
	Reverse	19	57.5	
JZ898280	Forward	18	56.8	352
	Reverse	19	60.7	
JZ898244	Forward	18	58.9	197
	Reverse	18	60.7	

EF1-α	Forward	21	58.4	89
	Reverse	22	58	

3.6 Resultados

3.6.1 Calidad de ARN extraído.

Se observó la calidad del RNA extraído de las diferentes muestras en un gel de agarosa, donde se identificaron con claridad las bandas ribosomales 28S y 18S bien definidas tanto para las hojas y raíces de las plantas control y las plantas expuestas a 0.1 y 20 mM de LiCl en los diferentes tiempos de exposición (6, 24, 48 y 96 h) (Figura 3.1 y 3.2). Posteriormente se procedió a analizar el rendimiento y pureza del ARN extraído en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific USA). El ARN extraído presentó valores superiores a 2 en la longitud de onda de A260/280 (pureza) y la concentración de ARN se determinó en ng/ μ l con el cual se obtuvo el rendimiento de ARN extraído en 150 mg de tejido fresco en hojas y 300 mg en raíz (Tabla 3.3 y 3.4).

Tabla 3.3. Concentración y pureza de la extracción de ARN en hoja de *Salvinia minima* a diferentes tiempos de exposición a diferentes concentraciones de LiCl.

Carril	Tejido hoja	260/280	ng/μl	Rendimiento ug RNA g PF⁻¹
1	Control	1.99	377.4	75.48
2	0.1 mM- LiCl (6 h)	2.10	378.5	75.70
3	0.1 mM- LiCl (24 h)	2.06	271.4	54.28
4	0.1 mM- LiCl (48 h)	2.04	281.2	56.24
5	0.1 mM- LiCl (96 h)	2.04	48.7	9.74
6	20 mM- LiCl (6 h)	1.99	358.6	71.72
7	20 mM- LiCl (24 h)	1.98	428.8	85.76
8	20 mM- LiCl (48 h)	2	326.3	65.26
9	20 mM- LiCl (96 h)	2.08	91.4	18.28

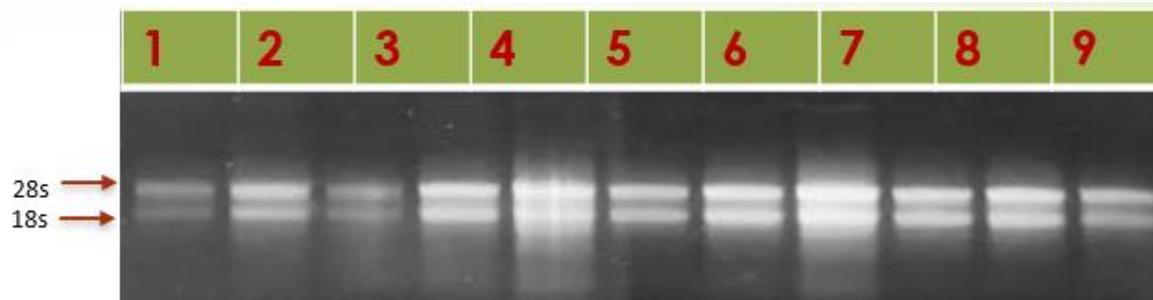


Figura 3.1. Calidad de RNA extraído en hoja de plantas de *Salvinia mínima*, se observan las bandas ribosomales 18S y 28S, tanto en la planta control como las plantas expuestas a 0.1 y 20 mM de LiCl en los diferentes tiempos de exposición. Gel de agarosa al 1%, teñido de bromuro de etidio

Tabla 3.2. Concentración y pureza de la extracción de ARN en raíz de *Salvinia minima* a diferentes tiempos de exposición a diferentes concentraciones de LiCl.

Carril	Tejido Raíz	260/280	ng/ μ l	Rendimiento ug RNA g PF ⁻¹
1	Control	2.01	234.7	46.94
2	0.1 mM- LiCl (6 h)	2.05	164.7	32.94
3	0.1 mM- LiCl (24 h)	2.0	171.6	34.32
4	0.1 mM- LiCl (48 h)	1.99	224.4	44.88
5	0.1 mM- LiCl (96 h)	2.04	48.7	9.74
6	20 mM- LiCl (6 h)	2.04	174.8	34.96
7	20 mM- LiCl (24 h)	2.01	239.2	47.84
8	20 mM-LiCl (48 h)	2.05	181.9	36.38
9	20 mM- LiCl (96 h)	2.08	31.5	6.30

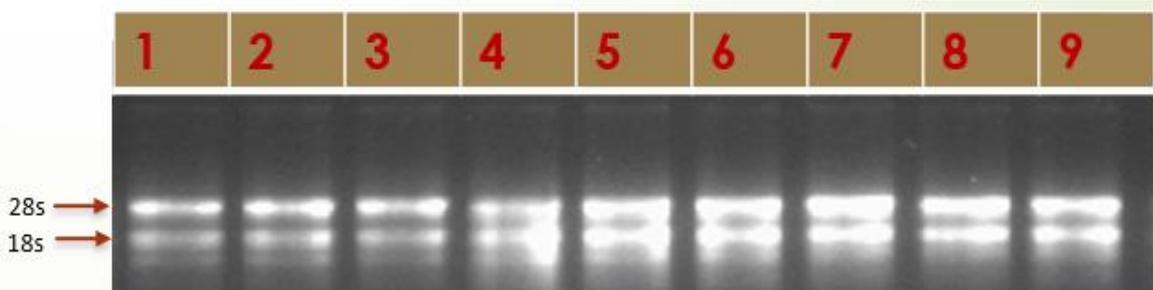


Figura 3.2. Calidad de RNA extraído en Raíz de plantas de *Salvinia mínima* se observa las bandas Ribosomales 18S y 28S, tanto en la planta control como las plantas expuestas a 0.1 y 20 mM de LiCl. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

3.7 Caracterización de la expresión de los genes: ATPasa P3A (JZ898246), ABCC (JZ898275), Antiporter Na⁺/H⁺ (JZ898280) y ABCG (JZ898244) en *Salvinia minima* en respuesta a Li

3.7.1 Gen SmATPasa P3A

Al comparar los patrones de expresión del homólogo a ATPasa P3A (JZ898246) en hojas y raíces, se puede observar las bandas con un patrón similar en respuesta a la exposición al LiCl, este patrón se observó tanto en hoja como en raíz en los diferentes tiempos de exposición (0, 6, 24, 48 y 96 h) y en las concentraciones de 0.1 mM y 20 mM de LiCl, en la que las plantas de *Salvinia minima* fueron expuestas, por lo que se sugiere una expresión constitutiva de este gen (Figura 3.3).

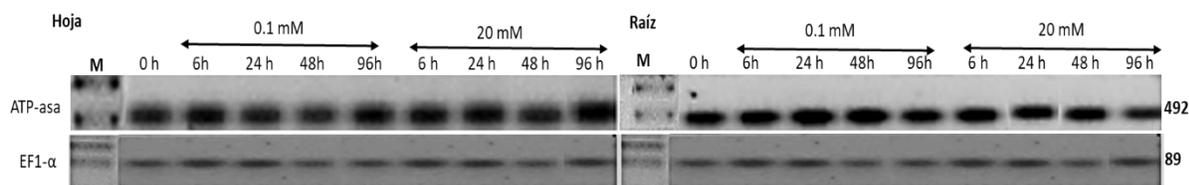


Figura 3.3. Expresión del gen SmATPasa P3A (JZ898246) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de *Salvinia minima*. A la derecha se indica el peso esperado de la banda. EF1a como gen constitutivo. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador de peso molecular.

3.7.2 Gen SmABCC

Al comparar los patrones de expresión del homólogo a ABCC (JZ898275) en hojas y raíces. En la hoja se observa que el gen se expresa al parecer de manera constitutiva ya que se observa la misma intensidad de las bandas en los diferentes tiempos de exposición en ambas concentraciones de 0.1 mM y 20 mM de LiCl en la cual fueron expuestas las plantas de *Salvinia minima*. Por otro lado, podemos observar que en la raíz el patrón cambia completamente; se muestra una expresión a las 0 h debido posiblemente a una expresión basal baja, sin embargo, la intensidad de la banda aumentó fuertemente a las 6 h y 24 h de exposición a Li, donde la mayor expresión se observó a las 48 h, para finalmente a las 96 h, regresar a la expresión basal observado en las 0 h. Este mismo patrón de expresión se observó tanto en las plantas expuestas a concentraciones de 0.1 mM como a 20 mM LiCl (Figura 3.4).

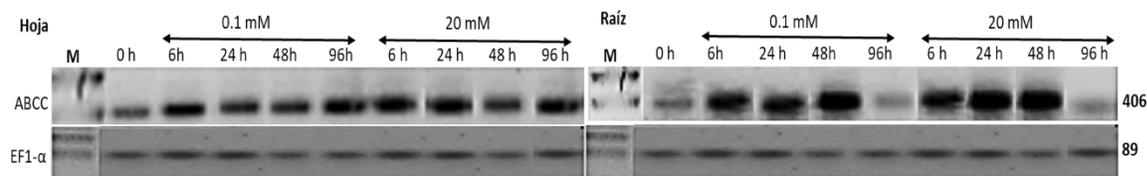


Figura 3.4. Expresión del gen *SmABCC* (JZ898275) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de *Salvinia mínima*. A la derecha se indica el peso esperado de la banda. EF1a como gen constitutivo. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador de peso molecular.

3.7.3 Gen *SmAntiporter Na⁺/H⁺*

Los patrones de expresión observados del homólogo antiporter Na^+/H^+ (JZ898280) tanto en hoja y raíz se observó una expresión diferencial en respuesta al metal. En las hojas se observó que en la exposición de la concentración de 0.1 mM de LiCl se observó que la mayor expresión se da a las 24 h, mientras que en condiciones control y en los otros tiempos de exposición (0 h, 6 h, 48 h y 96 h) se observó una menor intensidad de la banda, pero con la misma intensidad de la banda. Pero este patrón cambió completamente cuando se aumentó la concentración del metal en el medio ya que a 20 mM de LiCl en el medio, se observó que desde las primeras 6 horas se observó una expresión muy fuerte, vista como una banda muy intensa, esta intensidad de la banda se mantuvo igual hasta las 48 h de exposición, pero ya a tiempos más largos de exposición de 96 h, se observó que la intensidad de la banda comenzó a disminuir (Figura 3.5).

Por otro lado, en el caso de la raíz las plantas expuestas a concentraciones bajas de 0.1 mM de LiCl se observa una misma intensidad de la banda en las primeras 0 h y 6 h, que aumenta progresivamente conforme transcurre el tiempo de exposición y donde la mayor intensidad se da a las 96 h de exposición. En su caso al exponer la planta a concentraciones elevadas de metal de 20 mM de LiCl el patrón cambia ya que en este caso solo a las 24 h se observa la mayor intensidad de la banda posteriormente empieza a disminuir (a 48 y 96 h de exposición), teniendo la misma intensidad observada en condiciones control (0 h) (Figura 3.5).

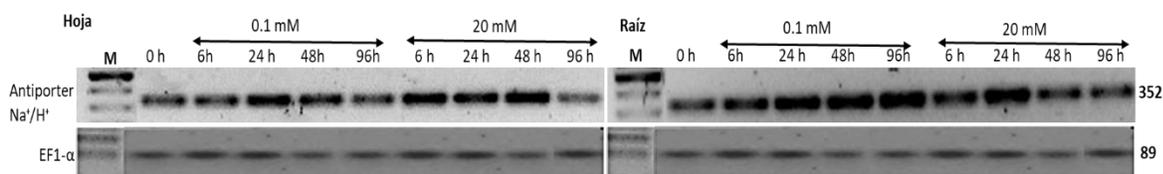


Figura 3.5. Expresión del gen antiporter *SmNa⁺/H⁺* (JZ898280) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de *Salvinia mínima*. A la derecha se indica el peso esperado de la banda. EF1a como gen constitutivo. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador de peso molecular.

3.7.4 Gen *SmABCG*

Los patrones de expresión del homólogo a ABCG (JZ898244) en hojas y raíces observamos presenta un patrón de expresión diferencial al ser expuestas a diferentes concentraciones de LiCl y de igual forma con una expresión diferencial entre hojas y raíz. En las hojas observamos que en concentraciones bajas de 0.1 mM de LiCl se logró visualizar una expresión basal a las 6 h que incremento a las 24 h de exposición a LiCl, y después de 96 h prácticamente no se observa la banda. Mientras que en la concentración de 20 mM se observó una expresión basal a los tiempos de 6 h y 24 h y se incrementó la intensidad de la banda a las 48 h de exposición, para finalmente a las 96 h no hubo expresión. Mientras que en la raíz los patrones de expresión cambian completamente y se observó que desde el inicio del experimento a las 0 h y a las 6 h se observa una expresión basal y esta expresión aumentó conforme transcurrió el tiempo de exposición a las 24 h se observó la misma expresión que a las 48 y 96 h de exposición a 0.1 mM de LiCl. Este patrón fue el mismo que se observó en respuesta a 20 mM de LiCl, donde a las 24, 48 y 96 h la expresión fue mayor en las plantas de *Salvinia minima* (Figura 3.6).

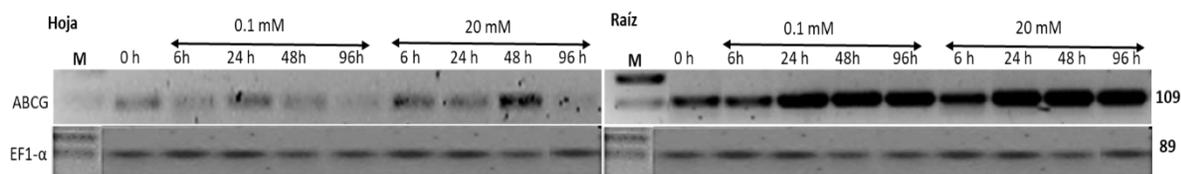


Figura 3.6. Expresión del gen *SmABCG* (JZ898244) evaluando 4 tiempos de exposición (h) a dos concentraciones de 0.1 y 20 mM de LiCl en hoja y raíz de *Salvinia minima*. A la derecha se indica el peso esperado de la banda. EF1a como gen constitutivo. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M corresponde al marcador de peso molecular.

3.8 Discusión de resultados

Gen *SmATPasa P3A*

El gen homólogo al ATPasa P3A (JZ898246) parece codificar un transportador Adenosine Triphosphate tipo P3A (ATPasa) que contiene el distintivo dominio ATPase-III_A_H, característico de los transportadores ATPasa del tipo P3A. Estos transportadores están implicados en la generación de un gradiente de protones que impulsa el transporte activo de nutrientes. Nuestro estudio sugiere que el gen ATPasa P3A (JZ898246) está más relacionado evolutivamente con la proteína SELMODRAFT_430150 (GI: 302820528) de *Selaginella moellendorffii*, en lugar de los transportadores ATPasa 4 comunes en otras especies.

En cuanto a la expresión, el gen ATPasa P3A parece tener una expresión constitutiva tanto en las hojas como en las raíces, independiente de la presencia y acumulación de LiCl. Esta expresión constante, marcada por una intensidad abundante de la banda, se observa en ambas concentraciones (0.1 y 20 mM) y en todos los tiempos de exposición a Li. Este patrón se asemeja a estudios previos realizados por (Leal en 2016) en relación con la exposición a plomo (Pb).

Un estudio anterior sobre el gen *SmATPS* realizado por (Trejo, 2012) identificó bandas definidas en hojas y raíces de *Salvinia minima*, con una intensidad que aumentó después de 6 y 12 horas de exposición a plomo (Pb²⁺), manteniéndose constante en tiempos posteriores. Esto sugiere que el gen se mantiene sin cambios desde las 6 hasta las 120 horas de exposición en hojas.

El gen Sm001_h11 (JZ898246) en *Salvinia minima* posiblemente codifica un transportador ATPasa con el dominio ATPase-IIIa_H, característico de los transportadores del tipo P3A. Estos transportadores están involucrados en la generación de un gradiente de protones que impulsa el transporte activo de nutrientes y la respuesta de la planta a diversas señales ambientales y hormonales.

Adicionalmente, investigaciones en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que la sobreexpresión constitutiva de ATP sulfurilasa (APS) permite la conversión de metales a formas menos tóxicas, lo que confiere mayor tolerancia a la planta ante la acumulación de metales. Esta investigación apunta a la importancia de los transportadores como reguladores de la respuesta de la planta a diferentes estímulos y al posible papel del gen Sm001_h11 en la tolerancia al Li en *Salvinia minima*.

Gen *SmABCC*

Nuestro análisis de expresión ha revelado que el gen homólogo al ABCC (JZ898275) (Sm003_b01) en *Salvinia minima* es inducible por el cloruro de litio (LiCl) en ambos tejidos, tanto en hojas como en raíces. Patrones de expresión similares han sido documentados en esta planta en respuesta al estrés causado por plomo (Pb), evidenciando un aumento en la intensidad de la banda en respuesta a 40 µM Pb(NO₃)². Este incremento posiblemente está relacionado con una mayor producción de conjugados de fitoquelatinas (PCs) en el citosol, los cuales son transportados por este transportador hacia la vacuola.

Trejo (2012) también observó un aumento en la expresión del gen en las raíces después de 12 horas de exposición a 40 µM Pb²⁺. Estudios sobre la compartimentalización vacuolar de metales

como Cd^{2+} han mostrado que el Cd entra en la vacuola unido a fitoquelatinas mediante canales tipo ABC.

Es importante destacar que transportadores ABCC con dominio MRP, localizados en el citoplasma, desempeñan un papel crucial en la tolerancia y acumulación de metales pesados en diversas plantas como *N. tabacum* y *A. thaliana*. Estudios previos realizados por Leal et al., (2016) identificaron que el gen JZ898275 (Sm003_b01) muestra similitud con los transportadores ATP-binding cassette tipo C (ABCC) reportados en otras especies. Además, el análisis filogenético reveló que el gen homólogo a ABCC (JZ898275), conocido como SmABCC (Sm003_b01), tiene una mayor relación evolutiva con el transportador reportado en *Selaginella moellendorffii* (SmABCC2; GI302776774).

El transportador AtABCC2/MRP2 presenta la capacidad de desintoxicar elementos como arsénico (As(V)), cadmio (Cd(II)) y mercurio (Hg(II)) en plantas transformadas de *A. thaliana*. Esto respalda la idea de que el gen SmABCC (Sm003_b01) en *Salvinia minima* puede tener un papel fundamental en la tolerancia y acumulación de metales pesados, siendo potencialmente una herramienta valiosa para abordar la desintoxicación en plantas expuestas a estas sustancias

Gen Antiporter *SmNa⁺/H⁺*

El gen Na^+/H^+ (JZ898280; Sm003_c05) en *Salvinia minima* codifica un homólogo al transportador antiporter Na^+/H^+ (NhaD) que contiene el dominio ArsB_NhaD_permease, esencial para la regulación del pH y la homeostasis celular. El desequilibrio en este proceso puede generar alteraciones metabólicas y disfunciones fisiológicas, llevando a daños severos o incluso la muerte de las plantas (Zhong et al., 2012). Los antiporters Na^+/H^+ desempeñan un papel crucial en la tolerancia a factores abióticos como la salinidad, dependiendo del pH (Dzioba et al., 2002; Liu et al., 2005; Kurz et al., 2006; Zhong et al., 2012).

En la planta modelo *Arabidopsis* se han identificado tres familias de antiporters Na^+/H^+ : CPA1 (NHX), CPA2 y NhaD. Los miembros más caracterizados de la familia CPA1 (NHX) son AtNHX1, que se encuentra en el tonoplasto, y SOS1, localizado en la membrana plasmática. La sobreexpresión de estos genes ha demostrado aumentar la tolerancia al estrés salino en las plantas (Apse et al., 1999; Shi et al., 2003; Yang et al., 2009). Sin embargo, se sabe poco sobre los antiporters NhaD en comparación con otras familias. En células de *E. coli* de tipo salvaje, se han identificado tres antiporters Na^+/H^+ (NhaD, NhaB y NhaA) que extruyen Na^+ de las células.

La ausencia de estos antiporters hace que las células no puedan sobrevivir en presencia de LiCl y NaCl.

En *Salvinia minima*, observamos expresiones diferenciales del gen Na⁺/H⁺ (JZ898280) en presencia de LiCl en el medio. A 24 h, se observa un aumento en concentraciones bajas de 0.1 mM de LiCl. Sin embargo, en concentraciones elevadas de 20 mM, el aumento es evidente desde las 6 h y persiste hasta las 48 h en las hojas, y hasta las 96 h en las raíces. Este aumento en la expresión podría estar relacionado con la regulación del pH y la homeostasis celular en respuesta al Li. Además, estudios previos también identificaron un aumento en la expresión de este gen en *Salvinia minima* expuesta a 40 µM Pb(NO₃)₂, indicando su papel en la respuesta al estrés provocado por el plomo (Leal *et al.*, 2016).

Gen SmABCG

Se postula que el gen ABCG (JZ898244) en *Salvinia minima* codifica un homólogo al transportador ATP-binding cassette type G (ABCG), ya que contiene el dominio ABC2_membrane superfamily, característico de los transportadores ABCG que juegan roles esenciales en procesos fisiológicos como el desarrollo celular, el crecimiento vegetal, el mantenimiento de membranas y la respuesta al estrés abiótico. Estudios en su mayoría realizados en Arabidopsis han resaltado la diversidad de funciones que los transportadores ABCG desempeñan en las plantas.

Los transportadores ABCG se conforman mediante motivos (NBD-TMD), los cuales se pueden dividir en proteínas medianas con un conjunto de motivos (NBD-TMD), conocidos como del tipo WBC (White-Brown Complex), y proteínas grandes con dos conjuntos de motivos (NBD-TMD), conocidos como del tipo PDR (pleiotropic drug resistance). En nuestro estudio, hemos identificado que el gen ABCG (JZ898244) muestra homología con transportadores ABCG reportados en otras especies, y a través de análisis filogenéticos, se ha observado una mayor relación evolutiva con los transportadores ABCG15 de *Pyrus x bretschneideri* y *Malus domestica*, los cuales son del tipo WBC. Estos transportadores WBC están principalmente involucrados en el transporte de lípidos (por ejemplo, AtABCG11/WBC11, AtABCG12/CER5, AtABCG13, AtABCG32, AtABCG15, etc.) (Buda *et al.*, 2013).

Por otro lado, el gen ABCG (JZ898244) ha sido anotado en términos de Gene Ontology (GO) con relación a los dominios homólogos presentes en otros transportadores ABCG (Leal *et al.*, 2017).

Las investigaciones mediante RT-PCR del gen homólogo ABCG (JZ898244) en hojas y raíces han revelado un aumento de la expresión en respuesta a diferentes concentraciones de LiCl (0.1 y 20 mM). En hojas, se observa una expresión basal a corto plazo (6 h), con el mayor aumento a las 24 h en 0.1 mM de LiCl. En concentraciones más elevadas (20 mM), la expresión es inicialmente basal a las 6 h, luego aumenta significativamente hasta alcanzar su punto máximo a las 48 h, pero disminuye a las 96 h. En contraste, en las raíces, que acumulan más Li, la expresión del gen ABCG aumenta de 6 h a 24 h, manteniéndose alta hasta las 96 h, tanto en concentraciones bajas como altas de LiCl. Esta expresión elevada sugiere que el gen ABCG podría estar implicado en la secreción de suberina en respuesta al estrés causado por la acumulación de LiCl. Estos hallazgos se alinean con otros estudios (Panikashvili *et al.* 2010), que demostraron la expresión diferencial del transportador DSO/ABCG11 en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*, involucrado en el metabolismo de cutina y suberina en las raíces.

3.9 Conclusión

Salvinia minima exhibe una notoria resistencia a la exposición al Li, una cualidad que podría derivar en parte del aumento en la expresión de tres de los cuatro genes transportadores investigados (*SmABCC*, antiporter *SmNa⁺/H⁺* y *SmABCG*), lo que sugiere una respuesta adaptativa de la planta ante este metal.

El patrón de expresión de estos transportadores, más notorio en las raíces (*SmABCC* y *SmABCG*), podría deberse a la función directa de las raíces en el contacto con el metal en el medio. Esto posiblemente está involucrado en la regulación del transporte y acumulación del Li en las vacuolas, manteniendo la homeostasis celular. Además, la expresión de los genes transportadores *SmABCC* y *SmABCG* muestra una relación directa entre la acumulación de Li en la planta y la intensidad de expresión de estos genes.

En el caso del gen ATPasa P3A, se observa una expresión constitutiva y alta, lo que sugiere su posible participación en la tolerancia al LiCl, posiblemente generando un gradiente electroquímico para diversos procesos de transporte, similar a lo visto en transportadores de tipo ABCC.

Dos de los cuatro genes estudiados se presentan como candidatos ideales para futuras transformaciones genéticas en plantas sensibles a metales, con el fin de aumentar su tolerancia a litio y, posiblemente, a otros metales. No obstante, persiste la necesidad de continuar esta

investigación para determinar la localización celular y la función precisa de estos genes en respuesta al estrés inducido por LiCl.

Capítulo IV

4.1 Discusión general

Los metales pesados, presentes naturalmente en la corteza terrestre, no pueden ser fácilmente degradados y tienden a acumularse en organismos vivos, volviéndose tóxicos en diversos cultivos. La absorción y acumulación en plantas dependen de la movilidad de los metales desde el suelo a la raíz. La contaminación del suelo por metales pesados inhibe el crecimiento de plantas y afecta el entorno.

La fitorremediación, proceso en el que plantas acumuladoras de metales se usan para eliminar estos contaminantes de suelos y aguas, ofrece ventajas como bajo costo y regeneración ambiental. A pesar de sus beneficios, se requiere más investigación para entender sus mecanismos de defensa moleculares y fisiológicos, ya que varían según el metal, la concentración y la especie de planta.

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la capacidad de *Salvinia minima* para hiperacumular Li, principalmente en sus raíces y en menor medida en las hojas. Se observó una rápida absorción de Li en las primeras 6 horas de exposición, con la máxima absorción ocurriendo seguida de una menor absorción de 24 a 48 horas. Posteriormente, la planta parece bloquear la entrada del metal, lo que podría ser un mecanismo de defensa.

A cortos períodos de exposición (6 a 24 horas), las plantas de *Salvinia minima* no presentaron daños fisiológicos notables, incluso en concentraciones más elevadas de 10 y 20 mM de LiCl. Sin embargo, a exposiciones prolongadas (más de 24 horas), se evidenciaron signos de estrés oxidativo debido al Li. Aunque se requieren más investigaciones para cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), se observó la degradación de pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y b. Además, se identificaron daños en el fotosistema II, lo que resultó en una reducción en la eficiencia del flujo de electrones, lo que a su vez llevó a una disminución en la fotosíntesis y en la fluorescencia de la clorofila. Estos cambios mostraron una correlación negativa fuerte (r^2 mayor a -0.95) con la concentración endógena del metal, lo que indica la relación entre la acumulación de Li y los parámetros fisiológicos mencionados

Una vez que los metales ingresan a las células de las plantas, tienen la capacidad de interactuar con diversas biomoléculas celulares, incluyendo proteínas nucleares y ADN. Esta interacción puede provocar un aumento excesivo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en daños significativos para la planta, como la aparición de clorosis, reducción en la biomasa, daño en las membranas, disminución de los niveles de clorofila y fotosíntesis, así como interferencias en el transporte de electrones durante la fase luminosa de la fotosíntesis y alteraciones en las relaciones hídricas. Para contrarrestar estos efectos dañinos, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa altamente regulados en respuesta a metales como el litio (Li).

Entre estos mecanismos de defensa, destacan los transportadores, que desempeñan un papel crucial en la eliminación de iones metálicos. Estos transportadores ayudan a capturar los iones metálicos en el citoplasma y los secuestran en compartimentos celulares como las vacuolas, formando complejos con ligandos como el glutatión y la fitoquelatina. Las plantas de *Salvinia minima*, por ejemplo, exhiben una intrincada red de mecanismos homeostáticos diseñados para contrarrestar el daño causado por metales, incluido el Li

Existen diversos tipos de transportadores de membrana que participan en la absorción de metales. Una vez que los metales ingresan a las células de la planta, pueden unirse a ligandos de baja afinidad o alta afinidad, que pueden estar presentes de manera constitutiva o ser inducidos en respuesta a la presencia de los metales. Estos complejos metal-ligando pueden ser transportados a diferentes compartimentos celulares, como las vacuolas u otros orgánulos, con el propósito de reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma. Esta regulación involucra una variedad de sistemas de transporte especializados para asegurar una gestión adecuada de los metales tóxicos en las células vegetales.

Un buen candidato para llevar a cabo este proceso de transporte es la familia de proteínas ATPasa de tipo P, que tiene la capacidad de trasladar una amplia variedad de cationes a través de las membranas celulares. Otra familia de proteínas transmembranales relevantes en este contexto es la familia ABC, que está involucrada en diversos procesos de transporte utilizando la energía liberada por la hidrólisis de ATP. Además, existen otras vías para el transporte y la acumulación de metales en las vacuolas, como el antiporter de Na^+/H^+ . En lo que respecta a la acumulación de algunos metales en la vacuola a través de la formación de complejos con fitoquelatinas, se utiliza un sistema de canales de tipo ABC en el proceso de compartimentalización vacuolar (Figura 5.1).

4.2 Conclusiones Generales

Al principio del proyecto se generaron preguntas de investigación, así como hipótesis la cual vamos a ir respondiendo en este capítulo final basados en nuestros resultados.

Acumulación de litio en la planta y eliminación de litio en el medio

Al principio nos preguntábamos si *Salvinia minima* era capaz de eliminar el litio de cuerpos de agua contaminados, mediante la toma y acumulación del metal en sus tejidos. En este trabajo de tesis se demostró que *Salvinia minima* tiene una alta la capacidad de absorber altas concentraciones de Li, acumulando cantidades de hasta 18 mg g⁻¹ PS, cuando fueron expuestas a 20 mM de LiCl, mientras que cuando fueron expuestas a 10 mM de LiCl la acumulación fue intermedia con 9 mg g⁻¹ PS y en 0.1 y 1 mM la acumulación fue de solo (0.83 y 2.47 mg g⁻¹ PS respectivamente), se observó que entre mayor concentración de Li en el medio acuoso, mayor fue la absorción de este metal. Debido a que la planta fue capaz de absorber litio a concentraciones mayores de 1 mg g⁻¹ PS, se puede clasificar como una planta hiperacumuladora de Li.

Por otro lado, nuestros resultados corroboran que *Salvinia mínima* efectivamente es capaz de remover litio de soluciones acuosas. Ya que a concentraciones de 0.1 mM de LiCl, la planta fue capaz de tomar todo el metal del medio después de 96 h. En la concentración de 1 mM, se observó una reducción del 90 % del metal inicial, mientras que en la concentración de 10 y 20 mM se observó una reducción del 30 % del metal inicial a las 96 h, por lo tanto, este helecho acuático sería un buen candidato a utilizar para tratar aguas contaminadas con Li.

Parámetros fisiológicos a la exposición a Li

Una segunda hipótesis que se planteó al inicio del proyecto era que *Salvinia minima* tiene la capacidad de remover litio de soluciones acuosas y acumular litio en sus tejidos, pero que, a ciertas cantidades, presenta afectaciones a nivel de crecimiento y desempeño fisiológico.

Para ello se determinó la concentración media letal para la planta, en este caso se realizó un barrido de concentraciones de (0.1, 1, 10 y 20 mM de LiCl) y se observaron los siguientes efectos:

Fotosíntesis y fluorescencia

Las plantas de *Salvinia minima* tienen cierta concentración umbral de 1 mM de litio ante la cual los daños son mínimos y tienden a recuperarse cuando la disponibilidad de Li en el medio disminuye, observamos que las plantas pueden acumular 2.4764 mg g⁻¹ PS de Li sin mostrar ninguna afectación significativa a nivel de fotosíntesis y fluorescencia de clorofila (Fv/Fm), con una tasa fotosintética de 5 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹. Sin embargo, a concentraciones de Li mayores de este umbral, se observaron efectos más graves en estos parámetros, ya que se observó que la acumulación de litio endógenos de 9.0645 mg g⁻¹ PS, la tasa fotosintética empieza a disminuir a valores de 1.43 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, y cuando el litio se acumula a concentraciones endógenas de 18.1789 mg g⁻¹ PS, la fotosíntesis bajó a niveles inferiores a 0 (Pn de - 0.60 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), en este caso las hojas dejan de asimilar CO₂ y valores negativos implican una ganancia de CO₂ (tal vez vía respiración).

En forma similar, a concentraciones de 1 mM de LiCl, Fv/Fm mantiene valores cercanos a 0.8 (lo que indica que no se presentó daño a nivel de eficiencia del PSII), dichos valores son comparables a la de una planta control, no expuesta al metal. Sin embargo, al ser expuestas a concentraciones superiores de LiCl, FV/FM disminuyó significativamente presentando valores menores a 0.7.

En cuanto a la eficiencia fotoquímica, a mayor acumulación de Li (de 9.0645 y 18.1789 mg g⁻¹) las plantas de *Salvinia minima* presentan una menor fluorescencia de 11,500 mV, siendo las de menor rendimiento en comparación con las plantas control y las plantas que acumularon 2.4764 mg g⁻¹ PS de Li teniendo fluorescencia más alta (14,000 y 16,000 mV respectivamente).

Es importante notar que ciertos parámetros parecen ser más sensibles a Li que otros, ya que observamos una disminución de contenido de pigmentos fotosintéticos, Chl a y Chl b, y en el contenido de clorofilas totales en la planta pasando de valores de 1,200 a 600 μg/g⁻¹ PF aun cuando las plantas fueron expuestas a 1mM de LiCl.

A mayores concentraciones de LiCl, la degradación de pigmentos fotosintéticos fue drástica, afectándose tanto Chl a como Chl b, ya que el contenido de clorofilas totales al final del experimento a las 96 h apenas llegaba a 9 μg g⁻¹ PF tomado en cuenta que una planta control, tiene valores de clorofilas totales de 1,200 μg g⁻¹ PF.

Relaciones hídricas

En este estudio se decidió evaluar el potencial hídrico para evaluar si la presencia de Li afecta el movimiento del agua en las plantas de *Salvinia minima* al ser expuestas a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 20 mM LiCl) y en diferentes tiempos de exposición (0, 6, 24, 48 y 96 h).

Las plantas control mantuvieron su potencial hídrico a -0.03 MPa, este mismo potencial se observó en concentraciones de 0.1 mM de LiCl con ligeros cambios durante el experimento, pero a las 96 h regresa a sus valores iniciales de -0.03 Mpa. Sin embargo, a concentraciones mayores a 1 mM LiCl, el potencial hídrico se hace más negativo y a las 96 h llega a un potencial de -0.1 Mpa. Entre mayor es la concentración de Li en el medio, mayor es la caída de potencial hídrico, ya que a concentraciones de 10 y 20 mM de LiCl se observó una disminución aun mayor, llegando a valores de -0.7 MPa.,

Lo anterior pudiera ser el resultado de que el Li esté afectando la membrana de las raíces, lo que pudiera resultar en una limitación en la toma de agua en el medio y por ende del status hídrico de sus hojas. Con nuestros datos obtenidos con el potencial hídrico se puede concluir que la presencia de Li en el medio provoco un estrés hídrico inducido por la presencia de Li.

Se decidió evaluar a la par el potencial osmótico para entender a más profundidad como afecta el litio en las relaciones hídricas. En este caso observamos, un aumento (valores más negativos) del potencial osmótico a las 24 y 48 h de exposición a Li. Esto posiblemente porque las plantas de *Salvinia minima* como un tipo de mecanismo de respuesta está realizando un ajuste osmótico, cabe mencionar que este ajuste osmótico se da por un aumento en el número total de moléculas osmóticamente activas, posiblemente la planta esté acumulando osmolitos tales como (prolina, glicina betaína, manitol trehalosa, etc.) que podrían estar participando en la osmorregulación, por lo que sería interesante evaluar el contenido de osmolitos en investigaciones futuras.

Las plantas tienden a acumular osmolitos compatibles como un mecanismo para mantener el potencial de turgencia y evitar plasmólisis y muerte celular. En el presente estudio, el litio a concentraciones bajas (1 mM de LiCl) pudiera tener un efecto osmótico. en concentraciones de. Mientras que a concentraciones de 10 y 20 mM de Li la planta ya no puede acumular más osmolitos para contrarrestar la pérdida de agua, por lo que se pierda la turgencia llegando a valores menores de cero lo que probablemente a esas concentraciones sufre ya un proceso de plasmólisis provocando la muerte celular.

Integridad de membrana

Una forma práctica y rápida para evaluar la integridad de la membrana es evaluando la fuga de electrolitos (F de E), ya que, si hay un daño a este nivel, los principales síntomas son la disrupción de la permeabilidad de sus membranas y la pérdida de la capacidad de retener solutos (iones y otros compuestos), lo que provoca un aumento de la conductividad eléctrica de una muestra. En nuestro experimento, las plantas control mostraron valores de F de E de 20% durante todo el experimento. En el caso de las plantas expuestas al metal, observamos que el litio, aún en bajas concentraciones de Li de 0.1 mM, provocó un aumento en la F de E en 70 y 80 % en la raíz siendo este caso el órgano más afectado, mientras que en la hoja en la concentración de 0.1 y 1 mM de LiCl se observa una fuga de 50% ya cual ya un cierto daño en la membrana, pero las más son en las concentraciones más altas de 10 y 20 mM de LiCl con una F de E de 70 % a las 96 h de exposición.

Expresión de genes transportadores por RT-PCR

Nuestra última hipótesis era que las plantas de *Salvinia minima*, poseen mecanismos de tolerancia al metal Li, que incluye transportadores, como un mecanismo para lidiar con el exceso del Litio en sus células. Y que los genes que codifican a estos, incrementan su expresión, conforme aumenta el contenido endógeno de litio.

Tal como mencionamos anteriormente, las plantas de *Salvinia minima* tienen cierto umbral de tolerancia durante el cual se presenta una importante acumulación de litio en sus células y era importante entender si los transportadores estudiados podían jugar un papel en dicha acumulación de litio en raíz y hojas. Para ello, nos propusimos evaluar los perfiles de expresión de los genes que codifican 4 transportadores (ATPasa tipo P, ABCC, ABCG Y Antiporter de Na^+/H^+) para definir si estos transportadores ayudan a la planta a acumular y eventualmente tolerar Li en sus tejidos.

Con los estudios de expresión (realizados por RT-PCR) podemos observar que los cambios en la expresión de dos genes (ABCC y ABCG) coinciden con los patrones de acumulación de Li. También observamos mayor expresión de estos 2 genes en la raíz por lo que concluimos que estos genes están más involucrados en la homeostasis y la protección a la membrana en la raíz de la planta y en menor medida se expresan en las hojas. Este patrón de expresión de estos transportadores observado en raíz posiblemente se deba a que la raíz está en contacto directo con el metal y probablemente están involucrados en el mecanismo de respuesta a LiCl, en el transporte y posterior secuestro del metal a la vacuola, mantenimiento en la homeostasis celular. De hecho, es la principal entrada del metal se da en la raíz, donde encontramos contenidos de $12 \text{ mg. g}^{-1} \times \text{PS}$ de litio, mientras que en la y en menor medida en las hojas encontramos solo $5.5 \text{ mg. g}^{-1} \times \text{PS}$ (Figura 4.1).

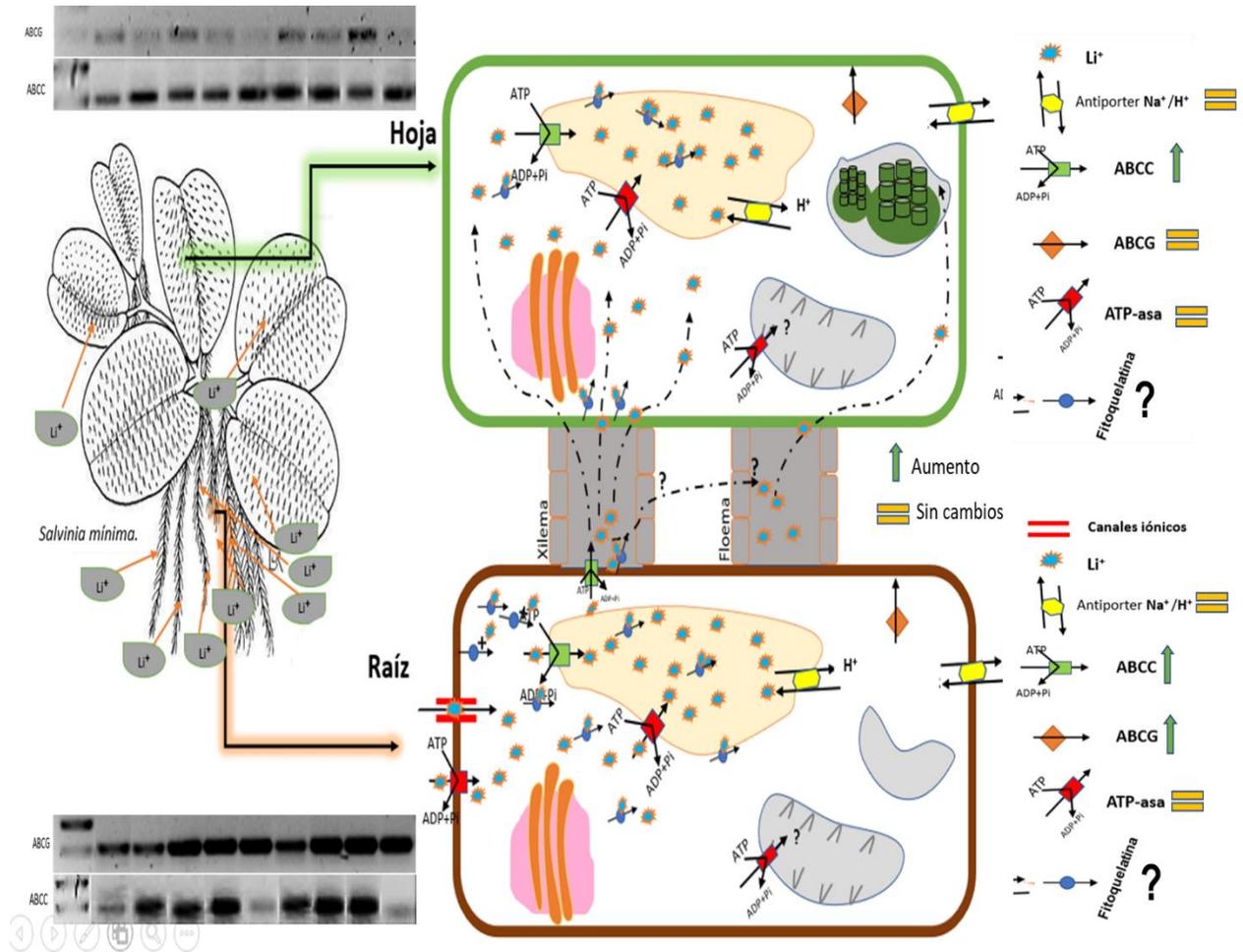


Figura 4.1. Propuesta de Modelo de trabajo del posible papel de los transportadores estudiados en la toma y traslocación de litio en planta de *Salvinia minima*.

Todos los datos encontrados en este trabajo se resumieron como un modelo de trabajo del efecto del litio a bajas concentraciones 2.47 mg/g^{-1} PS VS los efectos a altas concentraciones de Li hasta 18.17 mg/g PS (Figura 4.2)

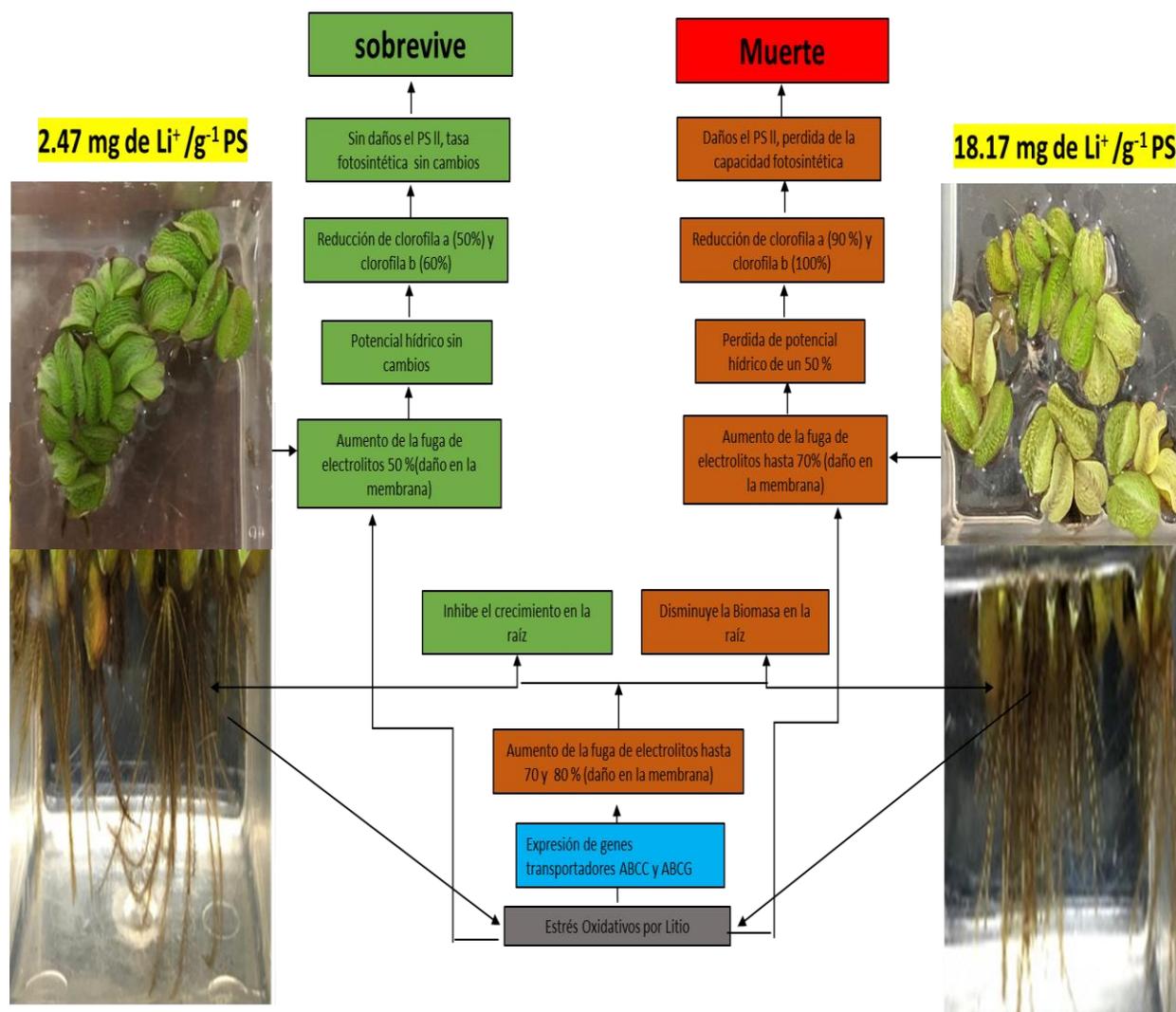


Figura 4.2. Propuesta de la serie de eventos que llevan a *Salvinia minima* a manejar concentraciones bajas de litio y sobrevivir vs serie de eventos que llevan a *Salvinia minima* a la muerte al ser expuesta a altas concentraciones del metal

Perspectivas

Con los estudios realizados y los datos encontrados, las perspectivas de trabajos futuros podrían estar orientadas en varias direcciones:

- ❖ Evaluar diferentes técnicas de cultivo de las plantas de *Salvinia minima* con la finalidad de producir gran cantidad de plantas en cortos tiempos.
- ❖ Evaluar si el PH del medio influye en la acumulación de Li, así también evaluar la acumulación de Li en presencia de micronutrientes para evaluar si existe competencia en la absorción de estos elementos.
- ❖ Evaluar las expresiones de los genes involucrados en la biosíntesis de glutatión y fitoquelatina en respuesta a exposición a litio, así como también evaluar la concentración de estos metabolitos tanto en raíz como en hojas de las plantas de *Salvinia minima* expuestas a litio.
- ❖ También sería interesante estudiar los cambios bioquímicos y estructurales que sufre el Li una vez que es absorbido por la planta.
- ❖ Debido al valor comercial que tiene el Li es importante evaluar si una vez que es absorbido por la planta podría ser recuperado para fines de reciclaje y utilizarlo para fines industriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. and Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 177.
- Alkorta, Hernandez Allica J, Becerril JM, Amezaga, Albizu, Garbisu C (2004) Recent Findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. *Rev Environ Sci Biotechnol* 3:71-90
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25: 3389-3402.
- Allen, M.D., del Campo, J.A., Kropat, J., and Merchant, S.S (2007): FEA1, and FRE1, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferriductase, are expressed in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126: 696-706.
- ANCEFN - Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2017.
- Angelova V., Ivanova, R., Delibaltova, V. and Ivanov, K. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19: 197–205.
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001) Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurement. *Environ Pollut* 115:49-64.
- Aravind, P. and Prasad, M.N.V. (2005). Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz. J. Plant Physiol.* [online] vol.17,;3-20
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., and Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plan J.* 20. 171-82.
- Arnon DI. (1949) Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15
- Axelsen, K.B. and Palmgren, M.G. (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps physiological observations. *Cytobios* 02: 101-109).
- Bakhat, H.F., Rasul, K., Farooq, A.B.U., Zia, Z., Natasha, Fahad, S., Abbas, S., Shah, G.M., Rabbani, F., Hammad, H.M., 2020. Growth and physiological response of spinach to various lithium concentrations in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27,39717–39725.
- Banci L, I. Bertini S, Ciofi-Baffoni, XC Su, R Miras, N Bal, E Mintz, P Catty, JE Shokes, RA Scott (2006) Structural basis for metal binding specificity: The Nterminal cadmium binding domain of the. P1-type ATPase CadA, *J. Mol. Biol.* 638- 650.
- Barceló J, Lugan M, Lombini A, Poschenrieder C. (2005). Glycine may contribute to the protection of *Silene armeria* against excess copper, In *Plant nutrition for food security, human health and environmental protection*. Tsinghua, University Press. Beijing (China) 634-635.
- Baxevanis AD, Ouellette BFF (2001) *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. John Wiley & Sons, NY.
- Bernard SM. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*. 608-620
- Bishnoi N.R., Sheoran I.S., Singh R. (1993) Influence of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and water Relations in Wheat Leaves of Different Insertion Level, *Photosynthetical*. 28: 473-479.
- Blum WH (1997). Cadmium uptake by higher plants. *Proc. Ext. Abstr. From Fourth Int. Conf. Biogeochem. Trace Elem.*; 109_110.
-

- Bourguignon J. (2008) The Arabidopsis Putative Selenium-Binding Protein Family: Expression Study and Characterization of SBP1 as a Potential New Player in Cadmium Detoxification Processes 1 [W]. Society. 147(May):239-251.
- Brack W, Frank H (1998) Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40:34-41.
- Bradford, g., 1961. Lithium toxicity: in southern California citrus. *Calif. Agric.* 15, 14.
- Brent P, Couch J, Al-Hamdani S. (2000) Selected Physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic botany* 68:313-319
- Brooks R. (1998) Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals their role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and 1 Phytomining, New Zeland: Cab International., 16-41, 203-223.
- Burzyn M. (2008) Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. *59(13):3721-3728.*
- Carrillo-Niquete G, Andrade JL, Hernández-Terrones L, Cobos-Gasca V, Fuentes G, Santamaría JM. (2022) Copper accumulation in the aquatic fern *Salvinia minima* causes more severe physiological stress than zinc. *Biometals.* Oct;35(5):1043-1057.
- Caviedesrubio, Diego Iván; Delgado, Daniel Ricardo and Olaya Amaya, Alfredo. Remoción de metales pesados comúnmente generados por la actividad industrial, empleando macrófitas neotropicales. *Rev. P+L [online].* 2016, vol.11, n.2, pp.126-149. ISSN 1909-0455.
- Chaves M., Pereira J., Maroco J., Rodrigues M., Ricardo C., Osório M., Carvalho i., Faria T., Pinheiro C. (2002). How plants cope with wáter stress in the field. *Photosynthesis and growth. Annals of Botany.* 89: 907-916.
- Chen, Y., m Wang, Y., Wu, W., Lin, Q., and Xue, S. (2006). Impacts of chelate-assisted Phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Sci. Total, Environ.* 356: 247-255)
- Chothia C, Lesk AM. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5:823-826. <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>.<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homesostasis. *Planta* 212:4 75-486.
- Clemens S, Palmgren MG, Kramer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci,* 7:309-315.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P, (2002), Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu, Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- D.A. Leal-Alvarado, H. Estrella-Maldonado, L. Sáenz-Carbonell, J.H. Ramírez-Prado, Omar Zapata-Pérez, J.M. Santamaría, Genes coding for transporters showed a rapid and sharp increase in their expression in response to lead, in the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 147, 2018, Pages 1056-1064, ISSN 0147-6513.
- Daniel A. Leal-Alvarado, A. Martínez-Hernández, C.L. Calderón-Vázquez, D. Uh-Ramos, G. Fuentes, J.H. Ramírez-Prado, L. Sáenz-Carbonell, J.M. Santamaría, Identification of up-regulated genes from the metal-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, in response to lead exposure, *Aquatic Toxicology*, Volume 193, 2017, Pages 86-96, ISSN 0166-445X.
- Dar S. H., Agnihotri R. K., Sharma R., Ahmad S., 2010 Nickel and lead induced variations in pigment composition of *Triticum aestivum* L. *Research Journal of Agricultural Sciences* 1:128-131.
- Domínguez Ortega, L., Medina Ortiz, O., & Cabrera García-Armenter, S.. (2006). Intoxicación con litio. *Anales de Medicina Interna*, 23(9), 441-445. Recuperado en 26 de junio de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992006000900010&lng=es&tlng=es.
- Drazkiewicz, M. (1994). Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. *Photosynthetica.* 30: 321-331.

- Estrella, S Duch, O. Zapata, JM Santamaría (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb 2 + damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS. *Environmental and Experimental Botany*. 75 188-194.
- Estrella-Gómez, D Mendoza-Cózatl, R. Moreno-Sánchez, D. González-Mendoza, O. Zapata-Pérez, A. Martínez-Hernández, J.M. Santamaría (2009). The Pb hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, respond to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology* 91: 320-328.
- EFE Monterrey (México) (2020). Alertan sobre impacto en el medioambiente de la extracción de litio en México. Recuperado de <https://www.efc.com/efe/america/mexico/alertan-sobre-impacto-en-el-medioambiente-de-la-extraccion-litio-mexico/50000545-4187073>
- Fodor E. ZSabo-Nagy A. Erdei L (1995) The effects of Cadmium on the fluidity and H⁺ATPase activity in plasma membranes from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiology* 14 7:87-92
- Frausto Da Silva J.J.R and Williams R.J.P (2001). *The Biological Chemistry of the Elements*. (Clarendon Press: Oxford).
- Fuentes II, Espadas-Gil F, Talavera-May C, Fuentes G, Santamaría JM. (2014) Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquat Toxicol*. 2014 155:142-50.
- García V, D. (2006) Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Tesis Doctorado en Ciencias. Universidad de Barcelona, pp -1-127.
- Garza A, Chávez H, Vega R, Soto E, (2005) Mecanismos Celulares Y Moleculares De La Neurotoxicidad Por Plomo. *Salud Mental*, vol. 28, número 002 Instituto Mexicano de Psiquiatría Ramón de la Fuente Distrito Federal, México pp. 48-58
- Gardner J. y Al-Hamdani S. (1997) Interactive effects of Aluminum and Humic Substances on *Salvinia*. *J. Aquat. Plant Manage* 35:30-34.
- González-Guerrero M, Benabdellah K. (2010) GintABC1 encodes a putative ABC transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*. 137-146.
- González Moreno, Sergio; Perales Vela, Hugo; Salcedo Alvarez, Martha O (2008) la fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas *Revista de Educación Bioquímica*, Vol. 27, Núm. 4, pp. 119- 129
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10118- 10123.
- Greger M, (2004) Metal availability, uptake, transport and accumulation. In: Prasad MNV. *Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*. Springer- Verlag, pp 1-27.
- Greger M (2004) Metal availability, uptake, transport and accumulation. In: Prasad MNV. (*Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*. Springer- Verlag, pp 1-27.
- Hawrylak-Nowak, B., Kalinowska, M., Szymánska, M., 2012. A study on selected physiological parameters of plants Trace grown under lithium supplementation. *Biol. Elem. Res*. 149, 425–430.
- Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M.L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schäffner, A.R, Smrcek, S. and Werck-Reichhart, D. 2002. *Phytoremediation of Polyaromatic Hydrocarbons, Anilines and Phenols*. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 29-47.
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1-11.
- Hamer, D.H. (1986). (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Hoffmann, T., Kutter, C., Santamaría, J.M., 2004. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Eng. Life Sci.* 4, 61–65.
- <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>.
- <http://www.premierbiosoft.com/primerdesign>

- Jurkowska H, Rogóż A, Wojciechowicz T (1998) Comparison of lithium toxic influence on some cultivars of oats, maize and spinach. *Acta Agraria et Silvestria/Agraria* 36:37–42.
- Jurkowska H, Rogóż A, Wojciechowicz T (1995) The effect of sodium on lithium uptake by plants. *Polish J Soil Sci* 28:135–138
- Jiang L, Wang L, Zhang L, Tian C. Tolerance and accumulation of lithium in *Apocynum pictum* Schrenk. *PeerJ*. 2018 Aug 29;6: e5559. doi: 10.7717/peerj.5559. PMID: 30186702; PMCID: PMC6119463.
- Kalinowska, M., Hawrylak-Nowak, B. & Szymańska, M. 2013. The Influence of Two Lithium Forms on the Growth, L-Ascorbic Acid Content and Lithium Accumulation in Lettuce Plants. *Biol Trace Elem Res* 152, 251–257
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Buria, B., Kretschmar, T., Lee, Y., and Martinoida, E. (2011). Plant ABC Transporters *Arab. B.* 9: e0153.
- Kalaji M.H., Loboda T. (2007). Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant, Soil and Environment*. 53: 511-516.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2000) Trace elements in soil and plants. 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, FL. 413 pp.
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J*, 50:207- 218.
- Kim DY, Bovet L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, Lee Y (2006) AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140:922-932.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol*, 40:37-44
- Králova K, Sersen F, Blahová (1994) Effects of Cu(II) Complexes on Photosynthesis in Spinach Chloroplasts. Aqua (aryloxyacetato) copper (11) complexes. *Gen Physiol. Biophys.* (1994), 13: 483-491
- L. Jiang, L. Wang, S.Y. Mu, C.Y. Tian, *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol.Plants.* 209, 285 (2014).
- Leal Alvarado, Daniel Alfredo, Sáenz-Carbonell, L., Ramírez-Prado, J.H., Zapata-Pérez, Omar, Santamaría, Jorge. (2017). Genes coding for transporters showed a rapid and sharp increase in their expression in response to lead, in the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Lengauer T (2002). *Bioinformatics from genomes to Drugs*. Wiley-VCH verlag GmbH: 184-527 p. Liu T, Reyes Caballero H, Li C, Scott R. A, Giedroc DP (2007) Multiple Metal Binding Domains Enhance the Zn (11) Selectivity of the Divalent Metal Ion Transporter *AztA*. *Biochemistry*. 46:11057-11068. Pawlowski N. <http://www.fr33.net>.
- LENNTECH AGUA RESIDUAL & PURIFICACIÓN DEL AIRE HOLDING B.V. Copyright© 1998-2006. Disponible en <http://www.lennotech.com/espanol/tablaeiodica/Cd.htm> Holanda.
- Lin K, MayA, C, W, William R. Taylor. (2002) Threading Using Neural Network (TUNE): the measure of protein sequence-structure compatibility. *Bioinformatics*, 18: 1350- 1357
- Lucho, C.A., Álvarez, M., Beltrán, R.I., Prieto, F. and Poggi, H. 2005a. A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International*, On Line: 0160- 4120-D 2004
- Mazur R., Sadowska M., Kowalewska L., Abratowska A., Kalaji H.M., Mostowska A., Garstka M., Ostrega K.B. (2016). Overlapping toxic effect of long-term thallium exposure on white mustard (*Sinapis alba* L.) photosynthetic activity. *Plant Biology* 16: 191-197.
- Maksymiec W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29: 177-187.
- Martin, C.W. 2000. Heavy Metals Trends in Floodplain Sediments and Valley Fill. *Catena* 39, 53-68 Méndez, J.P., Ramírez, C.A., Gutiérrez, A.D., & García, F.P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 29-44.

- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-668.
- Macnair MR. (1997) The evolution of plants in metal-contaminated environments. In: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Bijlsma RL, Loeschcke V (eds). Birkhauser, Switzerland pp 3-24
- Mohanty N, Vass, Demeter S (1989)- Copper toxicity affects photosystem 11 electron transport at the secondary quinone acceptor QB. *Plant Physiol* 90, 175-179.
- Naranjo MA, Romero C, Belles JM, Montesinos C, Vicente O, Serrano R (2003) Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta* 217:417-424
- Pertsemlidis A, Iii JW (2002) Having a BLAST with bioinformatics. *Genome*. :1-10. Rapley Ralph, Manning DL (1998) Introduction to isolating RNA In: *Methods in Molecular Biology: RNA isolation and characterization protocols*. Human Press Inc. Totowa, NJ. USA. 1-7. Sagitov V. www.softberry.com.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (8): 2444-8.
- Piñero G, Berg R, Andersen ND, Setton-Avruj P, Monje PV.(20017). Lithium Reversibly Inhibits Schwann Cell Proliferation and Differentiation Without Inducing Myelin Loss. *Molecular Neurobiology*. PMID [27917448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27917448/)
- Pilon-smits, E.a. and Ledue, D.L. (2009). Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 207-212.
- Pilon, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.k., Morse, D., and Colepicolo, p. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in maalgae. *J. Phycol.* 39:1008-1018
- Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L.s., Aromolo, R., Costantino, P., and Carderelli, M. (2006). Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances cd^{2+} tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* 223: 180-190.
- Rausser, W.E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48).
- Rashid. A.; Camm, E. L.; Ekramoddoullah, K. M. (1994). Molecular mechanism of action of Pb and Zn^{+2} on water oxidizing complex of photosystem 11. *FEBS Lett.* 350: 296-298
- Reed R. (1990). Tolerancia a los metales en algas eucarióticas y procarióticas. *Revista CRC Press*. Pp 105-118.
- Sansom, C. (2000). Database searching with DNA and protein sequences: An introduction. *Briefings in Bioinformatics* 1 (1): 22-32.
- Sandmann, G., Böger, P. (1980). Copper induced exchange of plastocyanin and cytochrome C_{553} in cultures of *Anabaena variabilis* and *Plectonema boriuanm*. *Plant Science Letters*. 17: 417-424.
- Schrauzer, G.N. (2002). Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 14-21.
- Sereseñ F., Balgavy P., Devínsky F. (1990): Electron spin resonance study of chloroplast photosynthetic activity in the presence of amphiphilic amines. *Gen Physiol. Biophys.* 9, 625-633
- Shakoor, N., Adeel, M., Ahmad, M.A., Hussain, M., Azeem, I., Zain, M., Zhou, P., Li, Y., Xu, M., Rui, Y., (2023). Environment relevant concentrations of lithium influence soybean development via metabolic reprogramming. *J. Hazard Mater.* 441, 129898.
- Sneva, F.A. (1979). Lithium toxicity in seedlings of three cool season grasses. *Plant Soil* 53, 219-224.
- Tattersall E.A.R., Ergul A., Alkayal F., Deluc L. Cushman J.C y G.R. (2005) comparison of methods for Isolating High-Quality RNA from Leaves of Grapevine. *Am. J. Enol. Vitic* 56:400-407.
- Theodoulou, F.L. and Kerr, I.D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.* 43: 1033-40.

- Thomine, S., Wang, Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 4991-4996.
- Uh, Ramos David (2008) Aislamiento e identificación de genes expresados diferencialmente en respuesta a Plomo en *Salvinia minima*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Vert G, Briat JF, Curie C (2001) Arabidopsis IRT2 gene encodes a root periphery iron transporter. Plant J, 26:181-189.
- Vodnik, D, Jentschke, G. Fritz, E, Gogala, N, Godbold, (1999). Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings. Physiol. Plant. 106:75-81
- Watt DA. (2003) Aluminium responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. Experimental Biology. 54(385): 1163-1174.
- Zhu J, Zhang MQ (1999) SCPD: a promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bioinformatics. 15(7-8):607

