



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“EFECTO DEL NÍQUEL EN LA FISIOLOGÍA Y
BIOQUÍMICA DE *Salvinia minima* Baker”**

Tesis que presenta

Ignacio Ismael Fuentes Franco

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología

**Mérida, Yucatán, México Junio
2017**

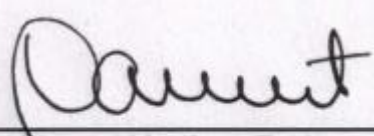
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **IGNACIO ISMAEL FUENTES FRANCO**, titulado “**EFECTO DEL NÍQUEL EN LA FISIOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA DE *Salvinia minima* BAKER**”, fue realizado en los laboratorios de Fisiología Vegetal Molecular de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección de Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de Junio de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

DECLARO QUE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN LA SECCIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES, LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ESTE DOCUMENTO PROVIENE DE LAS ACTIVIDADES DE EXPERIMENTACIÓN 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 DICHA INFORMACIÓN LE PERTENECE EN TÉRMINOS DE LA LEY DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL, POR LO QUE ME RESERVO NINGÚN DERECHO SOBRE ELLO.

MERIDA 12 DE JUNIO DEL 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ignacio Fuentes Franco', is centered on the page. The signature is stylized and written in a cursive-like font.

IGNACIO ISMAEL FUENTES FRANCO

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., en especial a la unidad de Biotecnología, por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada (663198)

Al Dr. Jorge M. Santamaría por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por la asesoría en la elaboración de la tesis, por su apoyo y confianza brindada.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz, a quien le quiero agradecer por asesorarme durante todo este proceso, por todos sus sabios consejos que fueron de gran importancia. Gracias por estar al pendiente y preocuparse tanto, gracias por involucrarse tanto en el proyecto, gracias por creer en mí siempre, pero sobre todo gracias doctora porque en esos momentos, en que mis ánimos decaían siempre me alimentaba diciendo que yo podría, gracias por creer en mí siempre. Gracias por todo Doctora Gaby.

Al M.C. Francisco Espadas y Gil por sus consejos y apoyo técnico durante la realización de la fase experimental del trabajo. Una vez más Gracias por todo socio.

Al M.C. Felipe Barredo Pool por la ayuda brindada en el microscopio, gracias por su grata colaboración.

A los compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular por su apoyo constante, en especial al Dr. Humberto Estrella, por el apoyo brindado en la parte bioinformática, que será continuación de dicha tesis. .

A mi Comité Tutoral: Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, Dra. Neyi Eloisa Estrella y al Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor por las observaciones y comentarios realizados en todo el proceso de elaboración de la tesis.

Con los resultados obtenidos en la presente tesis participamos en VIII congreso de Biotecnologías e Ingenierías del Sureste, llevado cabo en el Tecnológico de Merida, en el año 2016, con el trabajo “aspectos fisiológicos y moleculares de la respuesta de *salvinia minima* Baker a la exposición al níquel”.

Los resultados obtenidos en la presente tesis fueron publicados en el Journal Aquatic Toxicology, con el nombre de: Nickel accumulation affects water relations, and cell membrane photosystems and also induces the synthesis of proline in the water fern *Salvinia minima* Baker

DEDICATORIA

Primeramente, quiero darle las gracias a Dios por ser quien ha estado a mi lado en cada momento, dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y por permitirme salir adelante siempre.

A mi madre por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. **TE AMO MAMÁ.**

A mi familia por inspirarme día con día a seguir adelante, por creer en mí en cada momento, pero sobre todo por enseñarme que nunca hay que dejar de luchar, gracias por tanto apoyo ♥.

CON AFECTO

IGNACIO ISMAEL FUENTES FRANCO

ÍNDICE

Índice general	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	v
Abreviaturas.....	vi
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	2
1.2. Antecedentes.....	2
1.2.1. Metales pesados	2
1.2.2 Níquel.	3
1.2.3 Criterios para plantas hiper-acumuladoras	6
1.2.4 Plantas acuáticas hiper-acumuladoras.	7
1.2.5. Mecanismos de desintoxicación de metales pesados.	9
1.2.6. Transporte de metales pesados	11
1.2.6.1. Quelación de metales pesados	13
1.2.7. Taxonomía y ciclo de vida de <i>S. minima</i>	16
1.2.8. <i>S. minima</i> como planta hiper-acumuladora de metales pesados.....	18
1.3. Justificación..	20
1.4. Hipótesis	21
1.5. Objetivo general	21

1.5.1. Objetivos particulares	21
1.6. Estrategia experimental.....	22
CAPÍTULO II	23
2.1. Introducción	23
2.2. Materiales y metodos.	24
2.2.1. Material vegetal.	24
2.3. Tratamiento experimental.....	24
2.4. Cuantificación de níquel	26
2.5. Análisis morfológicos de <i>S. minima</i> ante la exposición al Ni.....	26
2.6. Crecimiento de biomasa.....	27
2.7. Determinación de Pn.	27
2.8. Determinación de Fv/Fm.	28
2.9. Rendimiento cuantico del PSII.	28
2.10. Relaciones hidricas.	28
2.11. Malondialdehido	28
2.12. Determinación del contenido de prolina	29
2.13. Determinación del contenido de glutation	30
2.14. Determinación del contenido de proteínas.....	30
2.15 Análisis de datos.	31
2.16. Resultados.....	32
2.16.1. Morfología.....	32
2.16.2 Cuantificación de Ni.....	33
2.16.3 Efecto de Ni en biomasa	35

2.16.4. Efecto de Ni en Pn.....	38
2.16.5. Efecto de Ni en Fv/Fm.....	39
2.16.6. Rendimiento cuántico.....	40
2.16.7. Efecto de Ni sobre MDA.....	43
2.16.8. Efecto de Ni sobre prolina	45
2.16.9. Efecto de Ni sobre potenciales (Ψ_w , Ψ_π).....	46
2.16.10. Correlaciones.	48
2.17 Contenido de proteínas.....	51
2.18 Contenido de GSH	52
2.19 Discusión.....	54
2.19.1 Efecto de Ni en la morfología y crecimiento de <i>S. minima</i>	54
2.19.2 <i>S. minima</i> como planta hiper-acumuladora de Ni	56
2.19.3 Daños en los fotosistemas (PSI, PSII) y rendimiento cuantico	58
2.19.4 Peroxidación lipídica en membrana (MDA) y el contenido de prolina en <i>S. minima</i>	64
2.19.5 Efecto del Ni en potenciales (Ψ_w , Ψ_π) en <i>S. minima</i>	67
2.19.6 Efecto del Ni en proteínas y GSH en plantas de <i>S. minima</i>	69
2.20 Conclusiones	72
CAPÍTULO III	73
3.1 Discusión general	73
3.2. Conclusiones	75
3.3. Perspectivas	77
3.4. Referencias bibliográficas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismos celulares en desintoxicación celular en plantas	10
Figura 1.2. Sistemas de transporte de metales pesados	12
Figura 1.3. Síntesis de glutatión y fitoquelatinas.....	15
Figura 1.4. Morfología de <i>S. minima</i>	17
Figura 1.5. Metodología general	22
Figura 2.1. Respuesta morfológica en respuesta a Ni.....	33
Figura 2.2. Cuantificación de Ni en <i>S. minima</i>	34
Figura 2.3. Longitud de raíces en <i>S. minima</i>	35
Figura 2.4. Efecto del Ni en peso fresco y seco en hojas en <i>S. minima</i>	36
Figura 2.5. Efecto del Ni en peso fresco y seco en raíces en <i>S. minima</i>	38
Figura 2.6. Efecto del Ni sobre la fotosíntesis.....	39
Figura 2.7. Efecto del Ni sobre Fv/Fm	40
Figura 2.8. Rendimiento cuántico del PS II.....	41
Figura 2.9. Rendimiento del fotosistema PI abs	43
Figura 2.10. Efecto del Ni en peroxidación lipídica de membrana (MDA)	44
Figura 2.11. Efecto de Ni en el contenido de prolina	46
Figura 2.12. Efecto de Ni en el potencial hídrico	47
Figura 2.13. Efecto de Ni en el potencial osmótico.....	48
Figura 2.14. Correlaciones polinomiales cuadráticas	50
Figura 2.15. Cuantificación de proteínas	51
Figura 2.16. Cuantificación de GSH.....	53
Figura 2.17. Modelo de integración.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Plantas hiperacumuladoras.....	7
Tabla 1.2. Macrofitas acuáticas con potencial de acumulación de metales pesados	8

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>S. minima</i>	<i>Salvinia minima</i>
Ni	NÍQUEL
MTP1	TRANSPORTADOR DE METAL
IRT1	TRANSPORTADOR REGULADOR DE HIERRO
GS	GLUTATION
γ -ECS	GAMMA-GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA
Cys	CISTEÍNA
PCs	FITOQUELATINAS
PSI	FOTOSISTEMA 1
PSII	FOTOSISTEMA 2
Pn	FOTOSÍNTESIS
ROS	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
H ₂ O ₂	PEROXIDO DE HIDRÓGENO
HPLC	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN
Ψ_w	POTENCIAL HIDRICO
Ψ_π	POTENCIAL OSMÓTICO
EL	FUGA DE ELECTROLITOS
mV	MILIVOLTIOS
ms	MILISEGUNDOS
PF	PESO FRESCO
PS	PESO SECO
μ M	MICRO MOLAR
T	TIEMPO
EDTA	ÀCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO
TCA	ÁCIDO TRICLOROACETICO
MDA	MALONDIALDEHÍDO
PPFD	DENSIDAD DE FLUJO DE FOTONES FOTOSINTÉTICOS
Fv	FLUORESCENCIA VARIABLE
Fm	FLUORESCENCIA MÁXIMA
(Fv/Fm)	EFICIENCIA MÁXIMA DEL FOTOSISTEMA II
SD	DESVIACIÓN ESTANDAR
mg L ⁻¹	MILIGRAMOS POR LITRO
g cm ⁻³	GRAMO POR CENTÍMETRO CÚBICO
nmol g ⁻¹	NANOMOLES POR GRAMO
mg·kg ⁻¹	MILIGRAMOS POR KILOGRAMOS

RESUMEN

En la presente tesis se evaluó, la relación que existe entre la toma de níquel, acumulación y sus efectos en algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de *Salvinia minima* Baker. Se demostró que la absorción del metal afecta a cada uno de los parámetros fisiológicos evaluados a tiempos prolongados de exposición al níquel (144 horas). Se pudo observar que, a mayor tiempo de exposición, se registraba una mayor absorción del metal y un mayor daño. Es probable que la absorción de altas concentraciones de níquel haya afectado la integridad de las membranas celulares, alteración de los transportadores de electrones afectando al estado redox de la célula, la deficiencia de la asimilación de carbono, ocasionando alteración en la eficiencia fotosintética, PSII y daño a la membrana celular, daño en peroxidación de lípidos (MDA), al igual que daño en los potenciales (Ψ_w , Ψ_π). Sugiriéndonos que el potencial hídrico es afectado a tiempos prolongados de exposición al níquel (144 horas), donde posiblemente la integridad de las membranas de raíces están fuertemente afectadas, ya que se encuentra en contacto directo con el medio, y no sean eficientes en la conducción del agua a la parte aérea causando un estrés hídrico inducido por el metal. Sin embargo, parece ser que las plantas de *S. minima* contrarrestan parcialmente dicho estrés hídrico inducido por el metal mediante ajuste osmótico para mantener turgencia. Este ajuste se consigue mediante la acumulación activa de solutos, como lo son azúcares, aminoácidos (prolina, glicínbetaína). En el caso de *S. minima* expuesta a níquel parece ser que prolina es uno de los osmolitos que se acumulan activamente para mantener turgencia a medida que el potencial hídrico se hace más negativo. De hecho, se encontró una alta correlación entre un incremento en el potencial osmótico con un incremento en los niveles de prolina. Por lo que podemos concluir que la acumulación de prolina como osmolito, es uno de los mecanismos de tolerancia al estrés causado por níquel en plantas de *S. minima*.

Otros mecanismos de tolerancia a metales incluyen mecanismos complejos para regular la absorción, movilización y la concentración intracelular de los iones metálicos para contrarrestar el daño al estrés inducido por metales pesados. En la presente tesis evaluamos la capacidad de *S minima* de acumular glutatión en respuesta a níquel como un posible mecanismo de desintoxicación. El níquel es absorbido en grandes cantidades por *S minima* en las primeras horas de exposición. Es interesante que el glutatión también presenta una rápida acumulación en las primeras 3 horas de exposición al metal, tanto en raíces como en hojas. Sin embargo, la acumulación de glutatión disminuye

después de este tiempo y a las 144 h casi baja a los niveles originales. Es posible que glutatión este participando dentro de los mecanismos tempranos de desintoxicación al níquel, tal vez contrarrestando el estrés oxidativo generado por una posible acumulación de ROS, pero que posteriormente los niveles de GSH disminuyan como resultado de su metabolización para formar fitoquelatinas. Obviamente, se requiere de mayor investigación para profundizar en el posible papel de glutatión como mecanismo de respuesta a níquel, y a otros metales en *S minima*.

ABSTRACT

In the present thesis, the relationship between nickel uptake, accumulation and its effects on some physiological and biochemical parameters in *Salvinia minima* Baker plants was evaluated. Metal absorption was shown to affect each of the physiological parameters evaluated at prolonged exposure times to nickel (144 hours), it was clearly observed that, at a longer time of exposure, a higher absorption of the metal was recorded and greater damage. It is likely that the absorption of high concentrations of nickel had affected the integrity of cell membranes, caused alteration of the electron transporters affecting the redox state of the cell, had caused a deficiency of carbon assimilation, causing alteration in photosynthetic efficiency, PSII and cell membrane damage, lipid peroxidation damage (MDA), as well as a drop in the water potential (Ψ_w , Ψ_π). Suggesting that *S. minima* plants might have experienced certain degree of metal induced water stress. after long exposure times to nickel (144 hours). Indeed our data suggest that the integrity of the root membranes were strongly affected, (as they are in direct contact with the medium). However, to counteract this reduction of water potential, *S. minima* plants experienced certain degree of osmotic adjustment via accumulation of proline. Thus, it is likely that proline is an osmolyte that is involved in a mechanism of tolerance to stress caused by nickel uptake in plants of *S. minima*.

Other tolerance mechanisms to regulate the mobilization absorption and the intracellular concentration of the metal ions to counteract the stress damage induced by heavy metals involved the accumulation of glutathione (GSH). For we measured the accumulation of GSH in response to nickel *S. minima* accumulated Ni in its tissues during the first hours of exposure, it is interesting that during the first 3 h of exposure to Ni, *S. minima* plants showed a peak of GSH. However, the concentration of GSH decreased in the following hours. It is possible that GSH might be indeed participating in mechanisms of tolerance to the metal, perhaps counteracting the negative effects of a possible metal-induced oxidative stress (a burst of ROS), but later SH concentration decreased as a result of its metabolization to form phytochelatins. Indeed more research is needed to clarify the possible role of SH as a tolerance mechanism in response to Ni and other metals in *S. minima*.

1.1. INTRODUCCIÓN

La fitorremediación hace referencia a una serie de tecnologías que se basan en el uso de plantas para limpiar o restaurar ambientes contaminados, como aguas, suelos, he incluso aire, siendo una tecnología sustentable que se basa en el uso de plantas para reducir *in situ* la concentración o peligrosidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos de suelos, sedimentos, agua y aire. A partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a su sistema de raíz que conducen a la reducción, mineralización, degradación, volatilización y estabilización de los diversos tipos de contaminantes (Nuñez *et al.*, 2004).

La contaminación por metales pesados representa uno de los principales problemas ambientales y de salud humana a nivel mundial. Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica, ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002).

Los muchos metales pesados conocidos en la naturaleza, el níquel es un elemento esencial como un elemento traza para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, a niveles tóxicos puede afectar a los procesos bioquímicos y fisiológicos de las plantas, como por ejemplo disminución de biomasa, daño en membrana celular, daño en los fotosistemas, mayor producción de especies reactivas de oxígeno, provocando estrés oxidativo (Seregin *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo se produce como resultado de la aparición de especies reactivas de oxígeno tales como radicales superóxidos, radicales hidroxilos, o el peróxido de hidrógeno. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daños en los lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, amino ácidos, carbohidratos y moléculas complejas, producido en las células.

El níquel induce una amplia gama de efectos adversos para los organismos vivos, incluidos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Donde a altas concentraciones el Ni afecta el crecimiento de las plantas, la división celular, el desarrollo de las mismas, la producción de clorofila, inhibición de la actividad

enzimática, etc (Maestri *et al.*, 2010). Sin embargo, la magnitud de estos efectos es variable y mucho depende de la concentración de Ni y del tiempo de exposición a las que las plantas sean expuestas.

Las plantas acuáticas han sido propuestas para completar los tratamientos de depuración de aguas contaminadas ya que poseen un inmenso potencial para eliminar los metales pesados de las aguas residuales. Las tecnologías convencionales para la remoción de metales en aguas y efluentes son costosas e ineficientes, particularmente si las concentraciones de los metales pesados son bajas (menores que 100 mg.L^{-1}) (Wilde y Benemann, 1993), de allí que se plantee el interés por la fitorremediación, en los que se esperan efectos fitotóxicos mínimos (Olguín *et al.*, 2005).

Las plantas presentan 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. Algunas plantas desarrollan un complejo mecanismo de homeostasis para minimizar los efectos dañinos de los metales pesados, controlando la absorción, y la translocación de los metales en los tejidos. Presentando un inmenso potencial para eliminar los metales pesados de las aguas residuales, sin embargo, no todas las plantas tienen la misma eficacia para la eliminación de metales pesados (Suñé *et al.*, 2007).

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 METALES PESADOS

Los metales pesados están presentes en el suelo como consecuencia de las actividades antropogénicas o componentes naturales del mismo (Bosiacki y Wojciechowska, 2012). Los metales pesados son definidos como aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g.cm^{-3} cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0.1 % y casi siempre menor del 0.01 % (Vardanyan y ignole, 2006).

La presencia natural de los metales pesados no debería ser peligrosa, ya que es parte del equilibrio de la naturaleza, sin embargo, los niveles de emisión de dichos metales al medio ambiente se han incrementado, sobre todo desde la revolución industrial y

una vez emitidos pueden permanecer en el medio ambiente durante cientos de años (Fergusson, 1990).

Los metales pesados contribuyen fuertemente a la contaminación ambiental, la cantidad de metal disponible en el suelo está en función del pH, el contenido de arcilla, contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico. Sin embargo, muchos de estos elementos son micronutrientes necesarios para la vida de los seres vivos y son absorbidos por las raíces de las plantas o llegan a formar parte de la dieta de los animales. Cuando por motivos naturales o por la acción del hombre se acumulan en los suelos o las aguas, se convierten en tóxicos peligrosos (Suave *et al.*, 2000).

1.2.2 NÍQUEL

El níquel es un metal pesado con número atómico 28 y peso atómico 58.69. Se encuentra rara vez en la naturaleza, presenta un color blanco-plateado, sus compuestos no tienen olor, ni sabor, por lo consiguiente es un metal puro. Las propiedades químicas del níquel (es decir, dureza, alto punto de fusión, ductibilidad, maleabilidad, algo ferromagnético, conductor justo de calor y electricidad) lo hace adecuado para ser combinado con otros elementos para formar muchas aleaciones (Tundermann *et al.*, 2005). Algunos de los metales con que el níquel puede alearse son hierro, cobre, cromo y zinc. El Ni se encuentra en el suelo en diversas formas, como niquelita, garnielita y en forma de sulfuros de Ni (Wood *et al.*, 2004). En la corteza terrestre el Ni aparece ligado a formas orgánicas, parte de las cuales pueden encontrarse en forma de quelatos fácilmente solubles. En el suelo, los metales pesados pueden estar presentes como iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas solubles o compuestos insolubles o parcialmente solubilizables (óxidos, carbonatos e hidróxidos) (Bai *et al.*, 2007).

El níquel puede existir en varios estados de oxidación diferentes, el estado de oxidación prevalente del níquel es el estado de valencia +2. Aunque otras valencias también pueden encontrarse (-1, +1, +3 y +4) con menor frecuencia (Coogan *et al.*, 1984; Clayton, 1994). Sin embargo, es importante mencionar que, en las regiones de pH bajo, el metal existe en forma de ion níquel Ni(II), como comúnmente lo solemos encontrar. En soluciones neutras a ligeramente alcalinas, precipita como hidróxido de

níquel, $\text{Ni}(\text{OH})_2$, que es un compuesto estable. Este precipitado se disuelve fácilmente en soluciones ácidas que forman $\text{Ni}(\text{III})$ y en condiciones muy alcalinas; forma ion de la niquelita HNiO_2 , que es soluble en agua (Young, 1995).

En condiciones muy oxidantes y alcalinas, el níquel existe en forma de óxido de níquel-níquelico estable (Ni_3O_4), que es soluble en soluciones ácidas. Otros óxidos de níquel, son inestables en soluciones alcalinas y se descomponen liberando oxígeno como el óxido níquel, (Ni_2O_3) y el peróxido de níquel (NiO_2). En las regiones ácidas, sin embargo, estos sólidos se disuelven produciendo Ni (Khodadoust *et al.*, 2004).

El número de coordinación de este ion metálico suele estar influido por el tamaño relativo del ion metálico y de los ligandos que lo rodean, como sabemos a medida que los ligandos se hacen más grandes, son menos los que se pueden coordinar con el ion metálico. Los ligandos que transfieren una carga negativa considerable al metal también producen números de coordinación más bajos. Por ejemplo, se pueden coordinar seis moléculas neutras de amoníaco al níquel(II) para formar $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$; en cambio, sólo se coordinan cuatro iones cianuro con carga negativa para formar $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$.

El níquel es de suma importancia en cuanto a su disponibilidad y potencial para lixiviarse de los perfiles del suelo hacia el agua subterránea, y difiere en cuanto a origen, ya que puede ser natural o antrópico (Polacco *et al.*, 2013). Este elemento es liberado al ambiente mediante actividades antropogénicas; tales como la minería, fundición, quema de combustibles fósiles, emisiones vehiculares, desechos domésticos, municipales e industriales, aplicación de fertilizantes, abonos orgánicos, refinerías de petróleo, capas brillantes y protectoras por electrodeposición (niquelados), metal monel, y la producción de pulpa de papel, textiles, entre otras (Reimann y Caritat, 1998; Cempel y Nickel, 2006; Kutman *et al.*, 2013).

También hay compuestos formados de níquel combinado con muchos otros elementos, como cloro, azufre y oxígeno (Mishra y Tripathi, 2008). El Ni varía en el suelo de 0.2 a $450 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Sin embargo, lo más común es que los valores se encuentren entre 5 y $22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Puede reemplazar al Zn , Fe y otros iones metálicos en algunas otras metaloenzimas de las plantas inferiores. La solubilidad del Ni se

encuentra inversamente relacionada con el pH del suelo (Halstead *et al.*, 1969; Mulrooney y Hausinger, 2003).

Este elemento se usa principalmente como materia prima en las industrias metalúrgica y de galvanoplastia, como catalizador en la industria química y alimentaria, así como componente de las baterías. Las concentraciones de Ni²⁺ pueden llegar a 0.2 mg·L⁻¹ y 26,000 mg·kg⁻¹, en agua superficial y suelos contaminados, respectivamente (20 a 30 veces más que lo encontrado en áreas limpias). Sin embargo, la cantidad de Ni²⁺ admisible para el agua de consumo humano radica entre 0.05 mg L⁻¹ (Sespas, 2006).

Este tipo de contaminación se ha convertido en un problema mundial (McGrath y Zhao, 2003). Ya que de acuerdo a la enorme lista de demanda que presenta el níquel, podemos observando un alto índice de contaminación en nuestros mantos freáticos y esto es alarmante porque sin un previo tratamiento esta es distribuida para el consumo humano, ya que en altas cantidades el Ni²⁺ puede ser peligroso para la salud humana, y puede llegar a ocasionar bloqueos en las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos –SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles para la salud humana y el medio ambiente (Chou, 1989; Canavi, 2005).

En un cierto número de estudios epidemiológicos, la exposición ocupacional a los compuestos de níquel se ha asociado a incremento de cáncer en el pulmón, nariz, laringe y próstata, embolia de pulmón, fallos respiratorios, defectos de nacimiento, asma y bronquitis crónica, insuficiencias renales, dermatitis, reacciones alérgicas como son erupciones cutáneas, y desordenes del corazón (Shen y Zhang, 1994; Kasprzak *et al.*, 2003). Con el objetivo de reducir la contaminación de suelos y aguas con Ni²⁺, actualmente se emplean el uso de plantas acuáticas con el propósito de fitorremediación. (Bosiacki y Wojciechowska, 2012).

Por otro lado, el níquel es un micronutriente requerido por las plantas en concentraciones muy bajas, en el orden de 1.7 nmol g⁻¹ o en menor concentración, esto dependiendo de la especie y del tamaño de la misma (Lin y Kao, 2005). El níquel es un metal esencial para el crecimiento de las plantas, animales y bacterias (Brown *et al.*, 1987), ya que el Ni es un componente clave en la activación de la enzima ureasa, que es necesaria para el metabolismo del nitrógeno (Bai *et al.*, 2013). Donde la ureasa

está presente en un rango muy amplio de especies vegetales y se ha mencionado que puede tener un papel en la síntesis de fitoalexinas y en la resistencia de las plantas a las enfermedades (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

También ha sido reportado que el Ni es un metal que compite con el hierro (Fe), en relación a la nutrición de las plantas (Nishida *et al.*, 2011). El Ni tiene varios estados de oxidación, pero su estado divalente (Ni^{2+}), es el tipo más estable en el medio ambiente y en los sistemas biológicos (Poonkothai y Vijayavathi, 2012). La concentración que representa toxicidad en las plantas varía en gran medida, pero se maneja un rango de 25 a 246 mg.g⁻¹ peso seco (PS), en el tejido de la planta, dependiendo de la especie de la planta y variedad (Iyaka, 2011).

1.2.3 CRITERIOS PARA PLANTAS HIPERACUMULADORAS

Algunas plantas no sólo son capaces de tolerar elevadas concentraciones de metales pesados, sino que tienen la capacidad de hiperacumularlos (Oporto *et al.*, 2001). Alrededor de 400 especies de plantas se encuentran descritas como hiperacumuladoras de metales pesados, siendo definidas como plantas que pueden acumular más de 1 mg.g⁻¹ PS del metal en sus tejidos (Baker y Brooks, 1989; Hoffmann *et al.*, 2004).

Las plantas hiperacumuladoras de níquel son numerosas, en comparación con otras plantas hiperacumuladoras de otros metales. Se conocen al menos 317 especies de plantas que hiperacumulan Ni, englobadas mayoritariamente en solo dos grupos: (1) especies y géneros pertenecientes a la familia como *Violaceae* y *Flacourtiaceae* (Orden *Violales*) y a la familia *Euphorbiaceae* (Orden *Euphorbiales*), de origen tropical, y (2) géneros pertenecientes a la familia *Brassicaceae* (Orden *Capparales*). Las especies reportadas para la bioacumulación de níquel son en su mayoría plantas terrestres, de acuerdo a los estudios reportados, siendo en su mayoría endémicas de Europa (Tabla 1.1) (Baker *et al.*, 2000).

El principal mecanismo en especies tolerantes a metales, parece ser la captación en el compartimento vacuolar, la aparente tolerancia de las plantas para incrementar niveles de elementos tóxicos en sus tejidos, puede ser resultado de la exclusión de los mismos elementos tóxicos de los sitios celulares, donde se llevan a cabo los procesos

vitales. Tales como la división celular y la respiración. Lo anterior provee a la planta con un efectivo mecanismo de protección (Hall, 2002).

Tabla 1.1. Hiperacumuladoras conocidas en el mundo (Reeves y Baker, 2000)

Metal	Número de taxones	Número de familias
Arsénico	2	1
Cadmio	2	1
Cobalto	26	11
Cobre	35	15
Plomo	14	7
Manganeso	9	5
Níquel	317	37
Selenio	20	7
Zinc	13	5

Existen numerosas especies de planta hiperacumuladoras de Ni; donde las más representativas son: *Alyssum bertolonii*, registrando una toma de Ni de 10,200 mg·kg⁻¹ PS, *Thlaspi caerulescens* registrando una toma de 16,200 mg·kg⁻¹ PS, *Walsura monophylla* registró una toma de níquel de 7,000 mg·kg⁻¹ PS, y la especie *Rinorea niccolifera* registró una toma de 18,000 mg·kg⁻¹ PS (Baker *et al.*, 1992; Fernando *et al.*, 2014).

1.2.4. 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 (Figura 1.2). 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 1.2. Macrofitas acuáticas con potencial de acumulación de metales pesados (Dhir et al., 2009).

Planta	Metal pesado	Acumulación	Referencias
<i>Azolla filiculoides</i>	Cd	2600-9000 mg.Kg ⁻¹ PS	Benaroya et al. (2004) Taghi Ganji et al. (2005)
	Zn	48-1200 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Ni	1000 mg.Kg ⁻¹ PS	
<i>Azolla caroliniana</i>	Hg	578 mg.Kg ⁻¹ PS	Bennicelli et al. (2004) Rahman y Hasegawa (2011)
	Cr	356 mg.Kg ⁻¹ PS	
	As	284 mg.Kg ⁻¹ PS	
<i>Pistia stratiotes</i>	Hg	156 ng.Kg ⁻¹ PS	Maine et al. (2004) Miretzky et al. (2004) Molisani et al. (2006)
	Cr	800-1600 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Cu	1000 mg.Kg ⁻¹ PS	
<i>Salvinia cucullata</i>	Cd	1636.1 µg.g ⁻¹ PS	Phetsombat et al. (2006)
	Pb	14305.6 µg.g ⁻¹ PS	
<i>Salvinia natans</i>	Cr	10.6 mg.Kg ⁻¹ PS	Dhir et al. (2008)
	Zn	4.8 mg.Kg ⁻¹ PS	
<i>Salvinia minima</i>	Cd	11262 mg.Kg ⁻¹ PS	Olguin et al. (2002) Hoffmann et al. (2004)
	Cr	3111 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Pb	9780 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Pb	34 mg.g ⁻¹ PS	
	As	0.5 mg.g ⁻¹ PS	
<i>Spirodela polyrhiza</i>	As	400-900 mg.Kg ⁻¹ PS	Zhang et al. (2011)
	Cr		
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cr	4000-6000 mg.Kg ⁻¹ PS	Hu et al. (2007) Molisani et al. (2006) Zhu et al. (1999) Low et al. (1994)
	Cu	6000-7000 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Cd	2200 µg.Kg ⁻¹ PS	
	Ni	1200 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Zn	10000 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Hg	1000 ng.Kg ⁻¹ PS	
<i>Lemna gibba</i>	As	1021 mg.Kg ⁻¹ PS	Mkandawire y Dudel (2005) Mkandawire et al. (2004a, b)
	Cd	14000 mg.Kg ⁻¹ PS	
	Ni	1790 µg.Kg ⁻¹ PS	
<i>Lemna minor</i>	Cd	13.3 g.Kg ⁻¹ PS	Zayed et al. (1998) Dirilgen (2011)
	Se	4.27 g.Kg ⁻¹ PS	
	Cr	2.87 g.Kg ⁻¹ PS	
	Ni	1.79 g.Kg ⁻¹ PS	
	Pb	0.63 g.Kg ⁻¹ PS	
	Hg	1959 µg.g ⁻¹ PS	
		490 µg.g ⁻¹ PS	

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 los 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*, *Ludwigia 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).

1.2.5 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, reproducción, solubilización, acumulación, quelación y translocación. Algunas plantas y diferentes organismos han desarrollado un complejo mecanismo de homeostasis para minimizar los efectos dañinos de los metales pesados, controlando la absorción y la translocación de los metales en los tejidos. Con estos mecanismos protegen la célula de la acumulación de los iones libres en exceso en el citosol, resultando posteriormente en la posible tolerancia a los metales pesados.

Podemos observar en la figura 1.1, el mecanismo de translocación en especies hiperacumuladoras, donde claramente observamos que el primer paso es que la partícula del metal se adhiere a la pared celular, y se introduce a través de la membrana de las raíces. El segundo paso es la absorción, para posteriormente realizar la quelación en vacuolas y a su vez tener la capacidad de transportar hacia los siguientes brotes. Este es un mecanismo que presentan las plantas hiperacumuladoras de metales pesados ya que no solo presentan la capacidad de absorber o realizar la toma de esas partículas tóxicas, si no también tiene la capacidad de quelarlos y almacenarlos en vacuolas para hacerlos menos tóxicos y transportarlos hacia las hojas.

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).

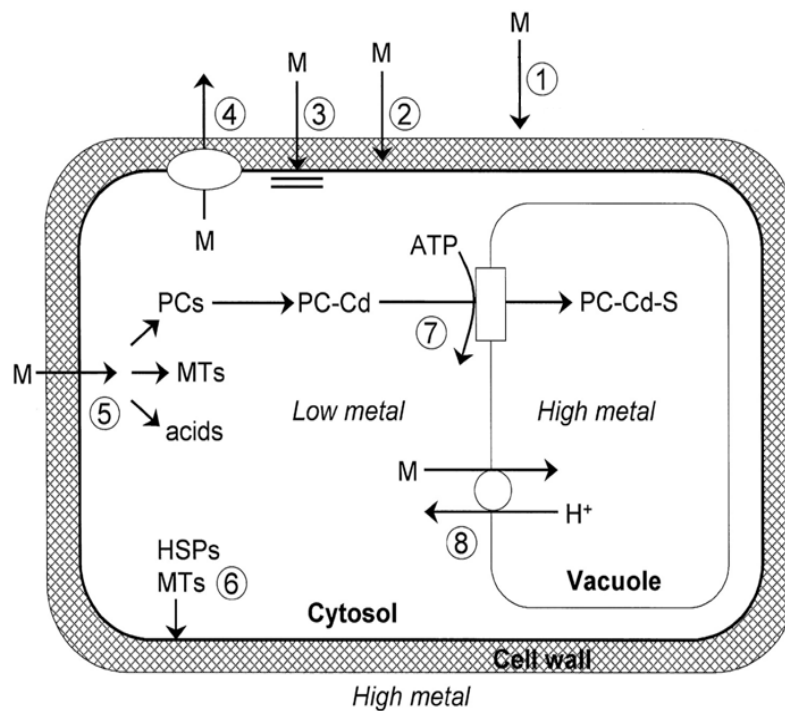


Figura 1.1 Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la detoxificación y tolerancia de metales en plantas. 1) Restricción del movimiento del metal a las raíces por micorrizas. 2) Unión a la pared celular y exudados de las raíces. 3) Entrada del flujo reducido frente a la membrana 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).

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. Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos (ácidos cítricos, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: glutatión y fitoquelatinas. Las fitoquelatinas involucran la desintoxicación, proceso por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola (Navarro *et al.*, 2007).

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 mecanismos más importantes en la desintoxicación de metales pesados (Estrella, 2008; Jozefczak *et al.*, 2012).

1.2.6 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 y 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 P-type 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 Gueriot, 2006).

Dependiendo del metal y de su estado de oxidación, los metales pesados son transportados por algunos de estos tipos de familias de transportadores. Mientras que los metales esenciales hacen uso de estos canales, 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, desplazándose en muchas ocasiones a metales u otros compuestos esenciales (Figura 1. 2).

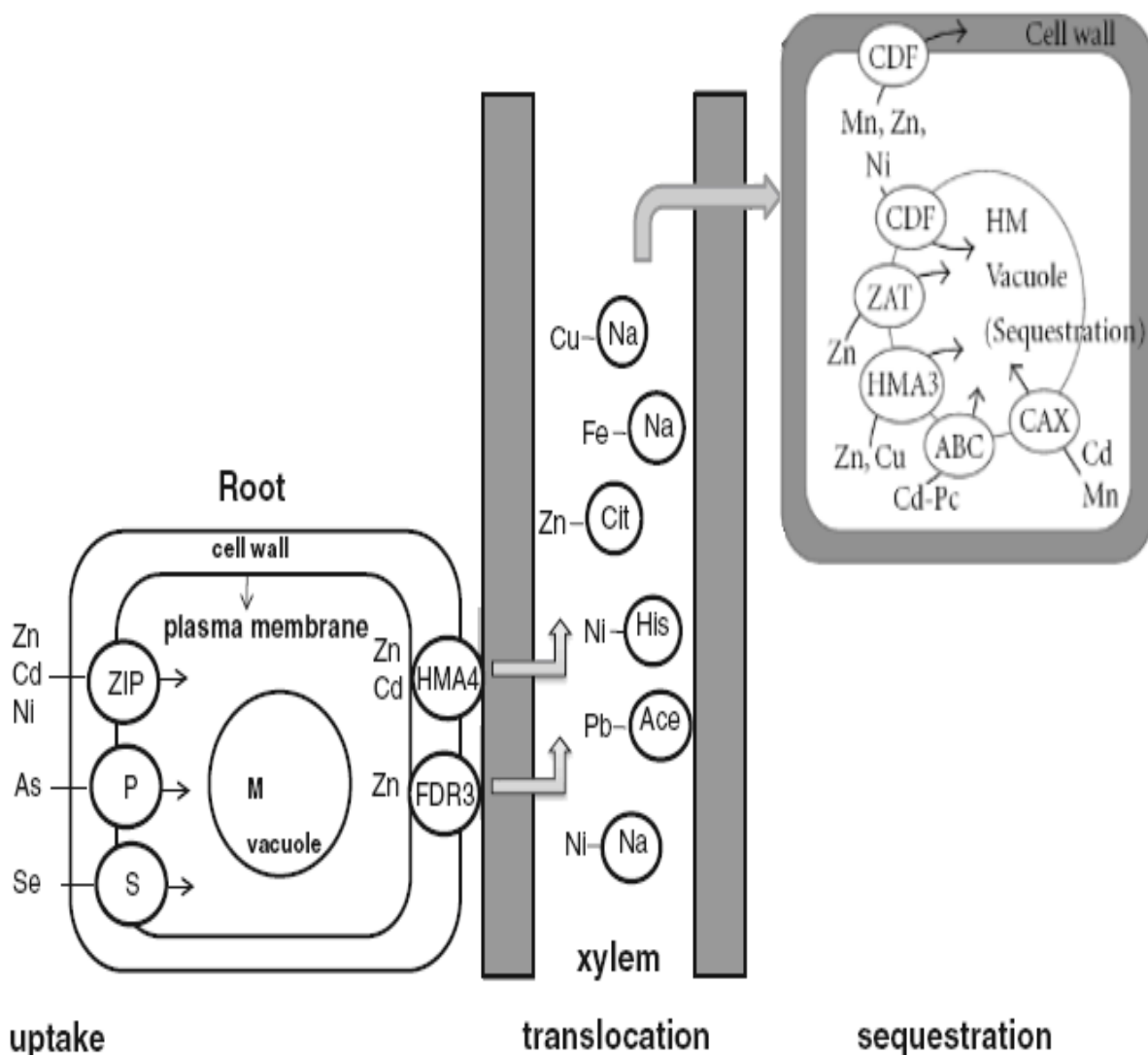


Figura 1.2. Esquema de los sistemas de transporte de metales (Zn, Cd, Ni, As, Se) relacionados con la entrada en la célula, la translocación a otras partes de la planta y la llegada a vacuolas (Monferrán y Underlin, 2013 con algunas modificaciones).

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 (NA), aminoácidos como la histidina (his), sales 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+} por transportadores ZIP y citrato, el Fe^{2+} y Ni^{2+} por transportadores ZIP y NA, el Pb por acetato y el As unido a grupos tioles y el Ni 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 Perez, (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-membrana plasmática o translocándolos a otros orgánulos de almacenamiento como son las vacuolas. Esto además de que las plantas pueden bloquear la transcripción de transportadores para evitar la entrada del metal a la célula. Esto además de otras de las estrategias que presentan las plantas es el almacenamiento en el compartimento vacuolar, impidiendo que el metal se encuentre disponible para reaccionar con los compuestos celulares, disminuyendo el grado de toxicidad.

1.2.6.1 QUELACIÓN DE METALES PESADOS

La quelación de metales pesados, es la transformación de especies químicas altamente tóxicas a especies menos tóxicas donde, las cuales pueden ser asimiladas y metabolizadas por las plantas. Una vez dentro del organismo, las especies metálicas experimentan una biotransformación al ser acomplejadas o “secuestradas” por un ligante existente o sintetizado. Esta estrategia, conocida como quelación, es uno de los mecanismos de detoxificación recurrentes en las plantas (Navarro *et al.*, 2007).

La quelación describe la formación de un complejo entre el metal y el ligando, en donde este último, en este caso la molécula orgánica, tiene varios sitios de unión que le permiten sujetar fuertemente un átomo central único (el metal), formando un complejo muy estable que puede ser transferido y acumulado en las vacuolas de la

planta. De tal manera, que el metal se encuentra secuestrado y no está disponible para ejercer su toxicidad (Patra *et al.*, 2004).

En general, los mecanismos de tolerancia son diferentes entre las distintas especies de plantas y estarán determinados por el tipo de metal. Siendo la quelación de metales pesados por ligandos un mecanismo muy importante de la detoxificación y tolerancia a los metales pesados. Donde los ligandos potenciales pudieran ser aminoácidos, ácidos orgánicos (AO) y dos clases de péptidos, que pudieran ser las fitoquelatinas (FCs) y el glutatión (GSH) (Hall, 2002).

El glutatión (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina; GSH) está generalmente presente en concentraciones elevadas en la mayoría de las células vivas, siendo el principal reservorio de la reducción no proteico de azufre, el GSH está presente en todos los organismos que participan en varios procesos metabólicos. En el caso de las plantas, cuando ellas se encuentran en un estrés ambiental, la síntesis de GSH les sirve para responden al estrés mediante la regulación de las vías metabólicas, para contrarrestar diversos daños celulares, regulación intracelular del estado redox, inactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS), regulación en el ciclo de ascorbato glutatión que elimina los peróxidos (Rouhier *et al.*, 2008).

El transporte de aminoácidos, desintoxicación metabólica de xenobióticos, herbicidas y desintoxicación de metales pesados, que este último ha sido muy estudiado, (May *et al.*, 1998; Estrella *et al.*, 2012). El glutatión también juega un papel crítico en resistencia de la planta de la que forma parte de un mecanismo de desintoxicación a nivel celular (Hall, 2002).

La síntesis de este tripeptido químicamente se produce en dos etapas dependientes de ATP (Figura 1.3 A). En la primera reacción, el glutamato-cisteína ligasa (GCL, también conocida como sintetasa y glutamylcisteína: CE 6.3.2.2) cataliza la formación de γ -glutamylcisteína a partir de cisteína y glutamato en el segundo paso, glutatión sintetasa (GS: EC 6.3.2.3), cataliza la adición de glicina a γ -glutamylcisteína para producir glutatión como sintetizada, la forma reducida de glutatión, proporciona un sustrato, para múltiples reacciones celulares que producen glutatión oxidado, es decir, dos moléculas de glutatión unidos por un enlace disulfuro, reductasa dehidroascorbato consume glutatión reducido para producir ascorbato, que luego se utiliza para la

desintoxicación de peróxido de hidrogeno (Figura 1.3 B). (Mendez *et al.*, 2010). El equilibrio entre la forma reducida y oxidadas de glutatión es un componente central en el mantenimiento del estado celular redox (Meister, 1995).

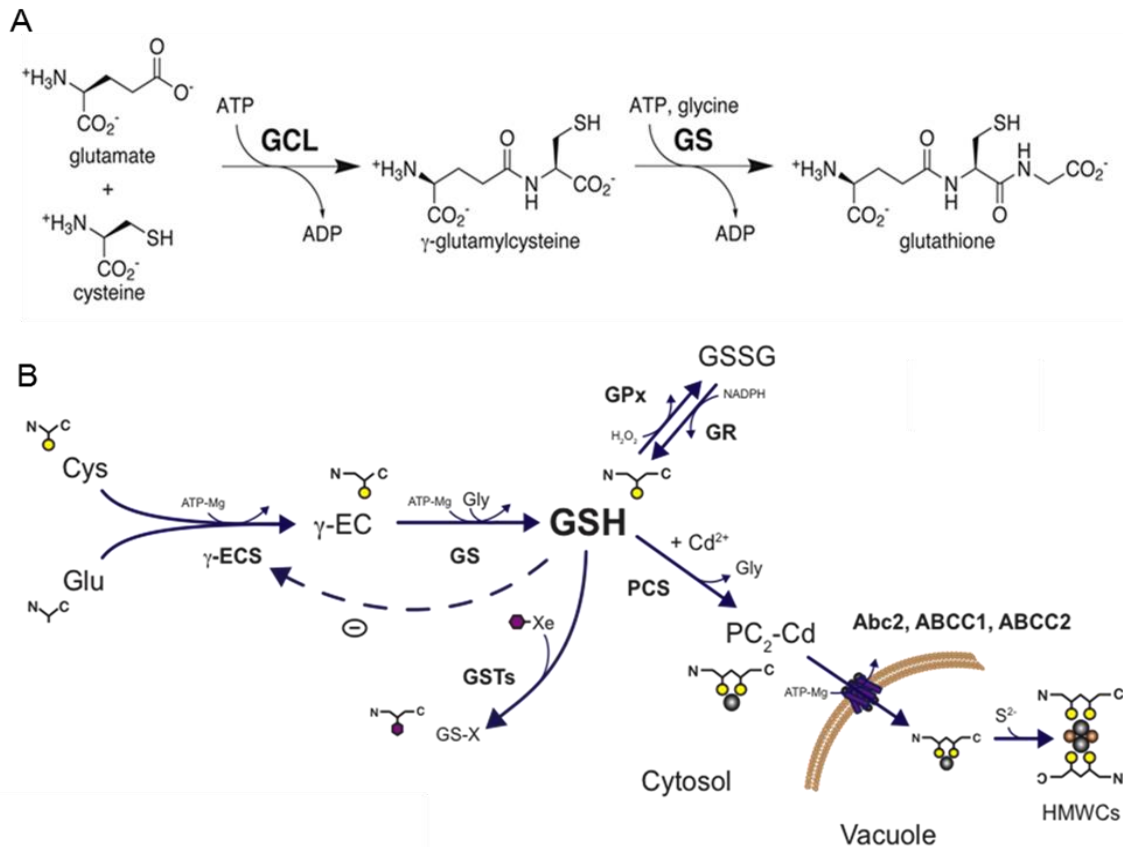


Figura 1.3. Síntesis de glutatión (A, B) y fitoquelatinas (B) (Mendez *et al.*, 2010)

De acuerdo a lo descrito por Cobbett y Goldsbrough, (2002) las fitoquelatinas (PCs) son una familia de péptidos ricos en cisteína con repeticiones del monómero (γ -GluCys)_n-Gly donde n puede ser un número entre 2 y 11, siendo lo más común de 2 a 5. Las PCs son sintetizadas a partir del glutatión reducido (GSH) por la enzima PC sintetasa. Donde su síntesis (PCs) está inducida por los metales pesados

La primera demostración del papel de las fitoquelatinas en la desintoxicación de los metales pesados, fue tras la caracterización de mutantes en plantas de *Arabidopsis thaliana* y *S. pombe* en una PC sintetasa, resultando más sensibles a diversos metales pesados. Además del papel de desintoxicación de los metales pesados, se han

buscado otras funciones para las fitoquelatinas relacionándolas con la homeostasis de metales y con el metabolismo del azufre, aunque no se han encontrado evidencias directas de esto (Perez, 2015).

1.2.7 TAXONOMÍA Y CICLO DE VIDA DE *Salvinia minima*

El helecho acuático *Salvinia minima* Baker presenta una amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales con una amplia distribución desde Florida, Georgia, Luisiana, Estados Unidos de Norteamérica, México, las Antillas, hasta América Central. Se encuentra clasificada como perteneciente a la Clase: Filicopsida, Orden: Hidropteridales, Familia: *Salviniaceae*, Genero: *Salvinia*, Especie: *minima*, por el Institute Natural Resources Conservation Service. Donde se reconocen 11 especies que pertenecen al género, existiendo dos especies reportadas para la Provincia Biótica de la Península de Yucatán: *Salvinia auriculata* Aubl. y *Salvinia minima* Baker (Figura 1.4), (Crow, 2002).

Entre las características comunes de estas especies, destacan sus hojas flotantes con longitudes que van de 0.4 a 2.0 cm. Las hojas tienen formas orbiculares, redondeadas a elípticas, cubiertas por tricomas de 2-3 mm de largo, presentes en la parte superior con grupos de cuatro, donde los ápices de los tricomas se encuentran libres, no presentan raíces verdaderas, ya que han sido descritas como raíces 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 esta 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 y 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. 1.4). 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.

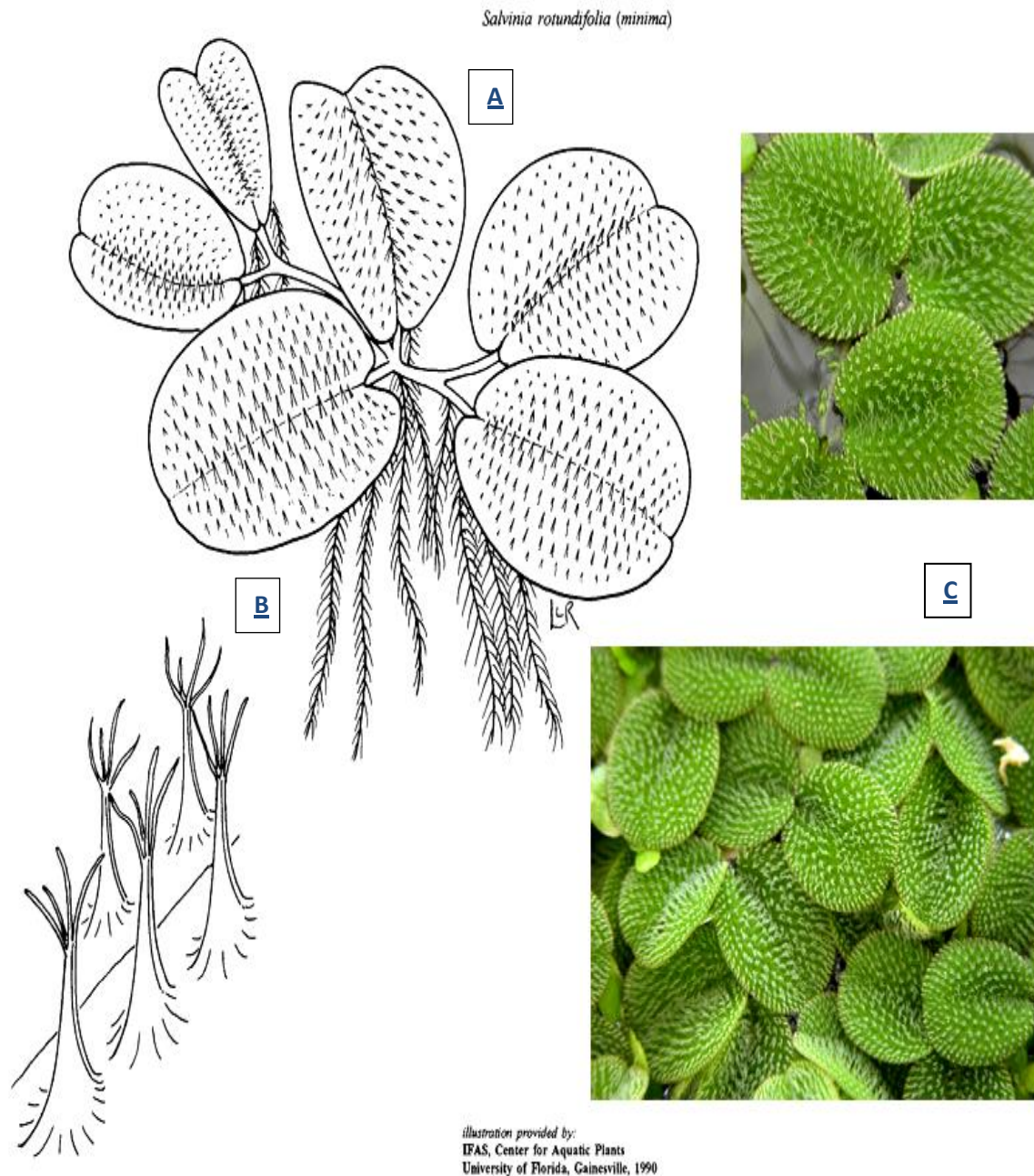


Figura. 1.4. Aspectos morfológicos de *Salvinia minima*. A). Se puede apreciar un esquema de la planta completa con raíces y hojas. B). Se aprecia un acercamiento de la disposición de tricomas que caracterizan a *S. minima* de otras especies del género de las *salvinias*. C). Se aprecian varias unidades 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.

1.2.8 *Salvinia minima* COMO PLANTA HIPER-ACUMULADORA

Los métodos físico-químicos para la eliminación de metales pesados de los cuerpos de agua, entre los cuales se encuentran: precipitación, intercambio iónico y ósmosis inversa. Sin embargo, la mayoría de éstos son pocos rentables o resultan muy costosos en términos energéticos y/o de consumo de productos químicos (Brierley *et al.*, 1986; Romero *et al.*, 2009).

Por tal motivo las macrofitas acuáticas, han sido seleccionadas para realizar estudios toxicológicos, ecológicos y de tratamiento de efluentes conteniendo metales pesados, dada su amplia distribución geográfica, su alta productividad y su tolerancia a ambientes extremos, además de que puede crecer en ambientes diversos en un amplio intervalo de temperatura (entre 3 °C y 43 °C (Whiteman y Room, 1991). El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y las lemnáceas han sido las más estudiadas en la eliminación de metales pesados (Olguín *et al.*, 1994).

Más recientemente, el género *Salvinia* ha sido investigado desde diversos aspectos. A continuación, se resumen los trabajos más relevantes. Outridge *et al.*, (1991), demostraron la capacidad de *S. minima* al tolerar cadmio (Cd^{2+}). Gardner y Al-Hamdani, (1997), fueron los primeros en realizar estudios con plantas del género *Salvinia*, donde estudiaron los efectos fisiológicos provocados por aluminio (Al^{3+}) en la planta, donde demostraron que aun en concentraciones elevadas de este metal pesado (20 mg L^{-1}) *S. minima* fue capaz de tolerar la alta 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. Como lo reportado por Brent *et al.*, (2000), mencionan que al evaluar la capacidad de *S. minima* para acumular cromo (Cr^{6+}). 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).

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 *S. minima*, mientras para ambas especies el índice de biomasa disminuyó relativamente hasta en un 25% debido a la sensibilidad del metal.

Olguín *et al.*, (2002), evaluaron la capacidad de *S. 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 del 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 *S. minima* para el Cd^{2+} y Pb^{2+} fue de 82.59 % y 97.44 % respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de remoción de Cr^{6+} no fue determinado.

También ha sido demostrado que *S. 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 y Blair, 2004). Hoffmann *et al.*, (2004), analizaron el comportamiento de *S. minima* ante la exposición a arsénico y plomo (As^{5+} y Pb^{2+}). En este estudio se reportó nuevamente que *S. 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+} en *S. minima*.

Prado *et al.*, (2010), evaluaron el efecto del cromo en el crecimiento de *S. 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 al plomo en *Salvinia minima*. Castro *et al.*, (2014), evaluaron la síntesis de nanopartículas de plomo en plantas de *S. minima*. Prado *et al.*, (2015), evaluaron el efecto

del cromo en la peroxidación de lípidos, fuga de electrolitos, fotosíntesis y carbohidratos.

A pesar del número de monografías y reseñas sobre la absorción de los metales pesados, en *S. 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 níquel.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Debido a su gran demanda (en constante aumento) en las industrias metalúrgicas, el níquel ha sido catalogado entre uno de los cinco metales pesados con mayor índice de contaminación, sobre todo en los países desarrollados; por consiguiente, la contaminación por su causa está en aumento (Khodadoust *et al.*, 2004). Ya que la producción mundial de Ni alcanzó 1,76 millones de toneladas y su demanda se duplicó en la última década. En la industria, el Ni se utiliza principalmente para la producción de acero inoxidable, aleaciones de hierro y galvanoplastia (Paweł y Tadeusz 2015).

El níquel, llega a los cuerpos de agua a través de un proceso de lixiviación, donde puede llegar a ser una amenaza para la salud humana, siendo que no es un metal biodegradable y por consiguiente tiende a acumularse, pudiendo llegar a ser una amenaza para la salud humana, ya que puede incorporarse de manera directa por el consumo de aguas contaminadas o de manera indirecta por medio de la cadena trófica.

Existen tecnologías convencionales para la remoción de estos contaminantes, pero son altamente costosas e ineficientes por el uso de quelantes (Bhagava *et al.*, 2012). Por tal motivo las plantas acuáticas han sido propuestas para complementar los tratamientos de depuración de aguas contaminadas, ya que se ha demostrado en diversos estudios que es una tecnología muy prometedora además de ser bastante accesible, ya que no se requieren de otros agentes para llevarse a cabo (Sal *et al.*, 1998; Yu y Gu, 2007).

Sin embargo, es necesario generar conocimientos acerca de los efectos fisiológicos en las plantas para entender los mecanismos básicos participantes en la bioacumulación de metales pesados, como son el daño morfológico y fisiológico. Nuestro trabajo de

investigación fue evaluar diversas respuestas fisiológicas, al igual que la capacidad de absorción de níquel en *S. minima*.

1.4 HIPOTESIS

A partir de ciertas cantidades de Ni en los tejidos, *S. minima* presenta afectaciones a nivel de crecimiento, fisiológico y bioquímico, de forma similar a lo que ocurre en otras plantas.

Las plantas de *S. minima* poseen mecanismos de tolerancia, como es el caso de la producción de glutatión, y proteínas totales que podría permitir ser un mecanismo en respuesta al níquel.

1.5 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la capacidad de absorción de níquel en hojas y raíces de *S. minima*, así como determinar su posible efecto morfológico, de crecimiento, fisiológico y bioquímico.

1.5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Cuantificar el contenido de Ni en plantas de *S. minima* a una concentración de 40 μM de Ni a diferentes tiempos de exposición.

Evaluar el efecto de la acumulación de Ni en la respuesta morfológica, de crecimiento, fisiológico y bioquímico de *S. minima*.

Evaluar el contenido de proteínas totales en respuesta a níquel como posible mecanismo de desintoxicación de *S. minima*.

Evaluar el contenido de glutatión (GSH), en respuesta a níquel como un posible mecanismo de desintoxicación o tolerancia en *S. minima*.

1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de tesis se divide en tres etapas. Se inició con el cultivo de las plantas de *S. minima* bajo las mismas condiciones para uniformizar nuestros resultados, seguida de los tratamientos experimentales que se emplearon para el análisis de cada uno de los parámetros empleados. Para los análisis fisiológicos y de cuantificación de glutatión y proteínas totales, se realizaron a diferentes tiempos de incubación con el metal a una concentración de 40 μM de níquel, considerando esta concentración de Ni^{2+} como una concentración de dosis letal media, en comparación con las otras concentraciones de Ni a las que las plantas fueron expuestas, el tipo de estudio que se empleó en este trabajo de investigación fue experimental (Figura 1.5).

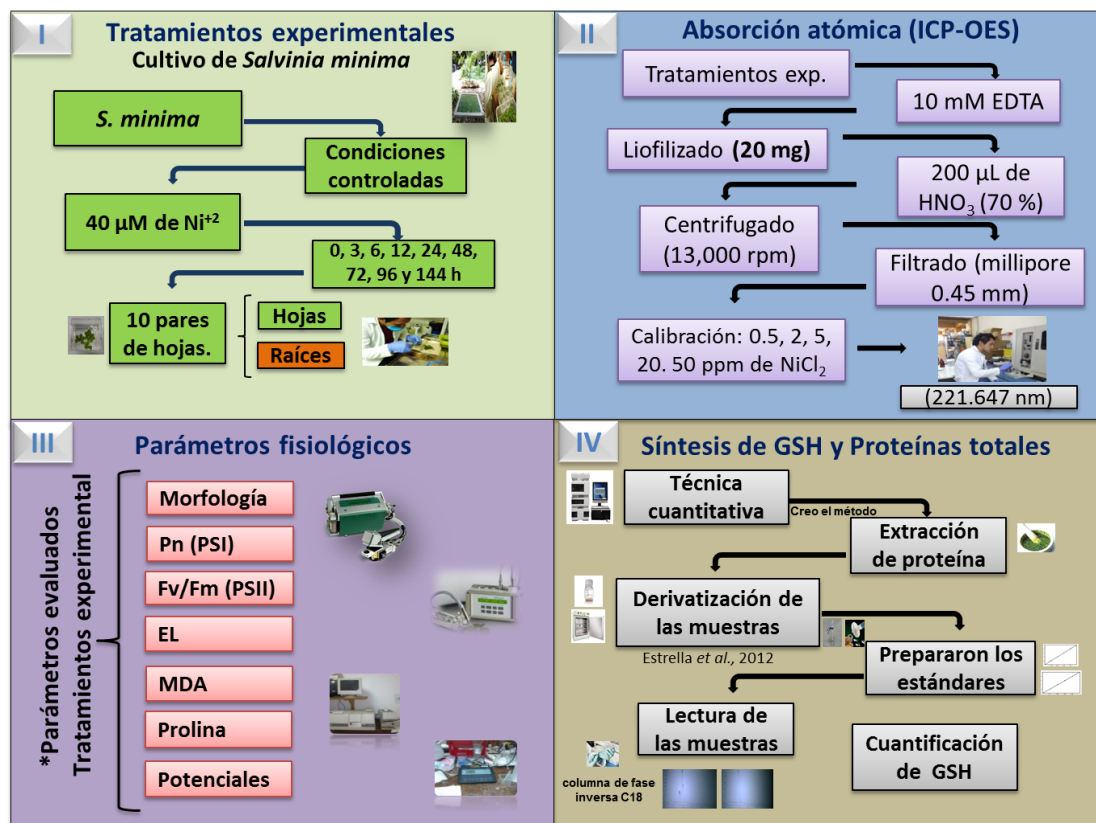


Figura. 1.5. Metodología general de la tesis. Tratamientos experimentales, respuestas fisiológicas y síntesis de glutatión en *S. minima*.

CAPITULO II

EFFECTO DEL NÍQUEL EN LA FISIOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA *DE Salvinia minima*.

2.1 INTRODUCCIÓN

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 para remediar cuerpos de agua y suelos contaminados con metales pesados es el uso de plantas. Las especies con potencial de fitorremediación son conocidas como hiperacumuladores de metales pesados. Un número limitado de especies vegetales, llamadas hiperacumuladoras, acumulan metales pesados en sus tejidos a concentraciones extremadamente altas, que serían gravemente tóxicas para otras especies. En comparación con las especies no acumuladores de metales pesados (Baker y Brooks, 1989). Las plantas hiperacumuladoras muestran altas tasas de absorción de metal pesados, tolerancia al metal y transporte de los metales desde las raíces hasta los brotes (Hall, 2002; Suñe *et al.*, 2007).

Se han realizado diferentes estudios en plantas hiperacumuladoras, centrando 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.

Salvinia minima es un helecho acuático hiperacumulador de metales pesados capaz de 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 (Estrella *et al.*, 2009). *S. minima* elimina el 90% de Pb a tan solo 24 horas de exposición (Olguin *et al* 2002) además de remover otros metales pesados como Cd, Zn y Cr (Sinhei y Bianchini, 2015; Prado *et al.*, 2015)

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de altas concentraciones de níquel (40 μM) en las tasas fotosintéticas (P_n), fluorescencia de clorofila (CF), potenciales (Ψ), el contenido de prolina, así como el contenido de GSH en hojas y raíces de *S. minima*. Para determinar si existe una relación entre la capacidad de *S. minima* para acumular Ni y la capacidad de Ni para debilitar la vitalidad fisiológica de la planta.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El presente trabajo de investigación y de experimentación, se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), (20° 967' N, 89° 617' W). Específicamente en el laboratorio de Fisiología Vegetal Molecular. Donde el objetivo a cumplir fue analizar la fisiología, la relación del glutatión en respuesta al níquel y la capacidad de absorción del metal en las plantas de *S. minima*. Baker, ecotipo Yucatán que fueron colectadas en el Jardín Botánico Regional del CICY. Las plantas de *S. minima* fueron crecidas en una solución nutritiva modificada de Hoagland y Arnon (1950), al 50% de su fuerza iónica, con un pH de 5.5. Las plantas fueron colocadas en un cuarto de cultivo con luz artificial a una intensidad de 100 $\mu\text{mol PPFd m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C, con humedad relativa $70 \pm 5\%$, con un fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad). Las plantas fueron lavadas con abundante agua destilada para quitar las algas, y suciedad que pudiera tener, para tenerlas lo más limpias posible y evitar que nuestros resultados se vieran alterados por material contaminante.

2.3 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Las cajas magentas para cultivo *in vitro*, contenían a la planta de *S. minima* y fueron expuestas a níquel a una concentración de 40 μM a diferentes tiempos de exposición que fueron: 0, 0.5, 3, 12, 24, 48, 72, 96 y 144 horas. Las plantas se colocaron en cajas magentas con una dimensión de 65 x 65 x 100 cm (magenta, SIGMA), cada magenta fue adicionada con 200 mL de agua destilada, con la concentración de Ni establecida. Se colocaron 10 pares de hojas de las plantas de *S. minima*, este inóculo presento peso fresco de aproximado de 20 g. Los experimentos se realizaron en forma

temporal. Cabe mencionar que para cada tratamiento se realizaron tres réplicas (tres magentas). Las plantas control de *S. minima* solo se mantuvieron en agua destilada.

Estas condiciones experimentales fueron las establecidas para las siguientes determinaciones en *S. minima*.

- Efecto de toxicidad, en la morfología de las plantas de *S. minima* ante una exposición de una solución de níquel de 40 μM durante diferentes tiempos de exposición.
- Efecto de níquel en el crecimiento de las plantas de *S. minima* expuesta a diferentes tiempos de exposición.
- Efecto del níquel en la fisiología y alteraciones bioquímicas de las plantas de *S. minima* expuesta a 40 μM de Ni a diferentes tiempos de exposición.
- Efecto del níquel en la capacidad fotosintética de las plantas de *S. minima* expuesta a 40 μM de Ni a diferentes tiempos de exposición.
- Determinar de la fuga de electrolitos en plantas de *S. minima* al ser expuesta al Ni durante diferentes tiempos de exposición.
- Determinar el contenido de malondialdehído (MDA) en plantas de *S. minima* al ser expuesta al Ni a diferentes tiempos de exposición.
- Determinar el contenido de prolina en plantas de *S. minima* al ser expuesta al Ni a diferentes tiempos de exposición.
- Determinación de potencial hídrico y osmótico en plantas de *S. minima* al ser expuesta al Ni durante diferentes tiempos de exposición.
- Determinar el contenido de GSH y proteínas totales en plantas de *S. minima* al ser expuesta al Ni a diferentes tiempos de exposición.

2.4 CUANTIFICACION DE NÍQUEL EN HOJAS Y RAÍCES DE *S. minima*

Para la determinación de níquel acumulado por las plantas de *S. minima* después de ser expuestas a diferentes tiempos de exposición, las plantas fueron lavadas con 10 mM EDTA, seguido de un enjuague con agua desionizada, para eliminar los elementos metálicos, en su caso, de la superficie de la planta. A continuación, hojas y raíces, fueron separadas para su posterior estudio. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas en un ultra congelador de -80°C para su posterior liofilización y determinaciones, según el tipo de estudio.

La metodología que se empleó para la digestión de las muestras fue la reportada por Hoffmann *et al.*, (2004). 20 mg de material liofilizado para ambos tejidos (hojas y raíces) de *S. minima*, fueron colocados en tubos eppendorf de 2 mL y digeridos con 200 μ L HNO₃ (Sigma) al 69.9%, durante 3 horas a 80°C en baño maría. La biomasa completamente digerida fue aforada a 2 mL con agua des-ionizada, y fueron agitadas con un vortex (Thermolyne) durante 5 minutos, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 15 minutos. Por último, el sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis.

La cuantificación de la concentración de níquel, se realizó en un espectrofotómetro de plasma ICP-OES modelo 400, Perkin-Elmer. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 221.647 nm. Usando HNO₃ al 1% como blanco y para la calibración del espectrofotómetro se emplearon estándares utilizando las siguientes concentraciones: 0.5, 2.0, 5.0, 20.0 y 50.0 ppm de níquel partiendo de una solución concentrada de 100 ppm. La determinación se realizó por triplicado para cada tiempo de exposición. La concentración del metal detectada se expresó en mg.g⁻¹ de peso seco.

2.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE *S. minima* ANTE LA EXPOSICIÓN A Ni

Para mostrar el efecto de toxicidad por níquel, y los cambios en la apariencia de las plantas de *S. minima*, se procedió a realizar la evaluación fotográfica de las plantas en función del tiempo de exposición. El efecto se evaluó tanto en hojas como en raíces a los diferentes tiempos de incubación, el daño toxicológico fue evidenciado a través de una imagen digital (Sony, Mod. No. MVC-FD75, Sony Corporation, Japón, 2000). Al cumplir el tiempo de exposición se procedió a la toma fotográfica, esto con el fin de

documentar cambios de apariencia, como pudiera ser clorosis o en su caso necrosis ante la exposición al níquel en plantas de *S. minima*.

2.6 DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO EN BIOMASA DE *S. minima*

Los cambios en el crecimiento de *S. minima* en respuesta a níquel se determinaron con longitud de las raíces, peso fresco y peso seco en hojas y raíces de las plantas de *Salvinia*. Estas variables se cuantificaron a las 144 horas después de la exposición al metal de las plantas de *S. minima*. Los resultados de los tratamientos con níquel, fueron comparados con las plantas control. La longitud de las raíces se realizó con la ayuda de una hoja milimétrica y una regla. Los resultados presentados para la longitud de la raíz corresponden al promedio de 4 réplicas en cada tratamiento probado.

Para la acumulación de biomasa en respuesta al níquel, se evaluó utilizando la siguiente metodología: el material vegetal se recolectó después de 6 días (144 horas), de exposición al níquel, las hojas y las raíces (3 unidades por cada magenta), fueron tomadas al azar, posterior a esto, se dejaron reposar en papel absorbente por un lapso de 15 minutos, con el fin de escurrir el exceso de agua de los tejidos, para proceder a registrar el peso fresco de los tejidos (hoja y raíz). Posteriormente las muestras fueron colocadas en un ultra congelador a -80°C , y fueron liofilizadas (LABCONCO U.S.), para la determinación del peso seco de las muestras. Los pesos de las muestras se registraron en una balanza analítica (SARTORIUS S.A). Los resultados presentados para cada tratamiento de peso corresponden al promedio de 3 repeticiones por tratamiento.

2.7 DETERMINACIÓN DE FOTOSÍNTESIS EN *S. minima*

La tasa de fotosíntesis se determinó con un sistema fotosintético portátil LI-COR, (LI-6400 Inc. Lincoln, NE. E.E.U.U), utilizando tres muestras (una unidad por magenta) para cada tratamiento (cada unidad con seis hojas). Las lecturas de fotosíntesis fueron determinadas a partir de 60 segundos de haberse encerrado la cámara de fotosíntesis con la hoja, la intensidad de la luz se mantuvo en $120 \mu\text{mol PPFd m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La medición se realizó en las plantas control y en las plantas expuestas al metal a todos los tiempos de exposición. Los resultados fueron graficados en Sigma Plot V. 10.0.1.

2.8 DETERMINACIÓN DE FLUORESCENCIA DE CLOROFILA

La fluorescencia de clorofila fue medida usando un fluorómetro portátil (FMS2, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Donde la especie fue expuesta a una concentración de 40 μM de níquel a diferentes tiempos de exposición. Usando tres muestras para cada tratamiento (cada una con 6 hojas). Antes de la medición, las hojas de *S. minima* fueron adaptadas a la oscuridad por 20 minutos, cada disco de hoja se expuso a un pulso de luz saturante de alta intensidad de luz ($2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), durante dos segundos y el cociente de la fluorescencia variable y fluorescencia máxima (F_v/F_m), se determinaron. Se realizaron tres repeticiones por determinación.

2.9 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DEL PS II EN PLANTAS DE *S. minima* ANTE LA EXPOSICIÓN AL NÍQUEL.

Las mediciones se realizaron utilizando un fluorómetro de clorofila (PEA portátil (eficiencia de la planta Analyzer, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). Se realizaron tres repeticiones por determinación. El área sobre la curva de fluorescencia entre F_0 y F_m también fue registrada y el tamaño relativo de las pozas de plastoquinona (PQ), se estimó a partir de la relación de esta área al valor de $F_m - F_0$.

2.10 DETERMINACIÓN DE LAS RELACIONES HIDRICAS EN PLANTAS DE *S. minima* ANTE LA EXPOSICIÓN AL Ni.

El estado hídrico de las plantas control y de las plantas tratadas con níquel se determinó mediante la medición del potencial hídrico foliar (Ψ_w), y el potencial osmótico (Ψ_π), en plantas de *S. minima*. Para cada planta, se tomó una muestra de la hoja. Cinco plantas por tratamiento se midieron con un termopar psicrómetro (-52; Wescor, Logan, Utah, EE.UU.). Después, la misma hoja, se puso a congelación en N_2 líquido por 2 minutos con el fin de dañar la membrana celular. Después de la descongelación, la hoja se utilizó para medir Ψ_π . Se utilizó un tiempo de equilibrado de 4 h para determinar Ψ_w y de 0.5 horas para determinar el Ψ_π .

2.11 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

El contenido de MDA se determinó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA). La peroxidación lipídica se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Hodges *et al.*, (1999). Con previas modificaciones. 0.12 g de muestra para ambos

tejidos (hoja y raíz), fueron maceradas con 2 mL de TCA al 0.1%, el macerado fue centrifugado a 12,000 x g durante 30 minutos, posteriormente se tomaron 0.4 mL del sobrenadante, el sobrenadante se mezcló con 0.8 mL de solución de TBA al 0.5% en TCA al 20%. La mezcla fue calentada a 95 °C durante 30 minutos, y posteriormente fueron enfriadas rápidamente en un baño de hielo por un lapso de 5 minutos, las muestras fueron transferidas a nuevos tubos eppendorf de 2 mL para su posterior lectura. La absorbancia de las muestras se realizó en espectrofotómetro (DU-650, Beckman Coulter, USA), a una longitud de onda de 532 y 600 nm. La cantidad del reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBARS), formado se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar de 155 mM⁻¹cm⁻¹, y se expresó como nmol g⁻¹ de peso seco, los resultados de peroxidación lipídica de membrana fueron resultado de tres repeticiones por determinación.

2.12 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROLINA

El contenido de prolina se determinó según el método descrita por Bates *et al.*, (1973). El material vegetal fue homogenizado con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3% (v/v), y fue centrifugado a 12,000 x g durante 30 minutos, 1.0 mL del sobrenadante se puso a reaccionar con un 1 mL de la mezcla de ninhidrina, y 1mL de ácido acético glacial. Los tubos fueron cubiertos con papel aluminio, los cuales fueron agitados vigorosamente, y fueron incubados en un baño maría durante una hora a ebullición, cuidando de que el nivel del agua permanezca por encima del nivel de la muestra. Una vez concluida la incubación los tubos fueron enfriados bruscamente. Posterior a esto se agregó 2 mL de tolueno, las muestras fueron agitadas en un vortex hasta adquirir una apariencia lechosa, dejándolas reposar hasta que se observen dos fases. La prolina se encuentra en la fase orgánica (superior), la cual fue extraída, para determinar su absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro (DU-650, Beckman Coulter, USA). Para referir los resultados de absorbancia a unidades de peso o concentración se construyó una curva estándar, utilizando para ello un concentrado de prolina de 0.4 µM, a partir de esta solución concentrada se realizaron soluciones de diferente grado de concentración que fueron de 0.025 a 0.4 µM.

Para poder procesar los datos se utilizar la siguiente formula

$$\frac{(\mu\text{mol prolina})/\text{mL} \times \text{mL tolueno}/115 \mu\text{g}/\text{mL} = \mu\text{mol prolina}/\text{g PS}}{\text{gramos de muestra}/5}$$

2.13 CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN (GSH)

La cuantificación de glutatión (GSH), se llevó a cabo mediante una modificación del método de Grill *et al.*, (1991, modificado por Estrella, 2008). 50 mg de tejido liofilizado (raíces u hojas), fue molido en un mortero con nitrógeno líquido y se adiciono 1.5 mL de buffer de extracción Tris (Sigma) 100 mM pH 7.0, ácido ascórbico 100 mM (Sigma), EDTA 1 mM, PMSF (Sigma) 1 mM, PVPP al 2%. Homogeneizó durante 1 min. Ccentrifugar a 12 000 x g durante 10 min a 4 °C. 350 µL del sobrenadante se derivatizo con 100 µL de HEPES 0.5 M pH 8.0, EGTA 0.5, pH 8.0 y 1 µL de monobromobimano 100 mM (Fluka, St. Louis, MO, EE.UU.). Los tubos se incubaron a 30 °C durante 12 horas en la oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de ácido tricloroacético al 30% y agitando los tubos durante 5 minutos. Las muestras se filtraron a través de filtros Millex de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore, Jaffrey, New Hampshire, EE.UU.). Se inyectaron (20 µL), en un cromatógrafo líquidos de alta resolución (HPLC Agilent 1,200, EE.UU.), equipado con un detector de fluorescencia.

El glutatión como cada uno de los estándares fueron separados en una columna de fase inversa C18 (Phenomenex 6 nm, 5 mm, y 3.9 mm x 100 mm), las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 420 nm respectivamente, utilizando como solvente A: 1000 mL de metanol (sigma) al 10% y 2.5 mL de ácido acético (sigma); y como solvente B: 1000 mL de metanol al 90% y 2.5 mL de ácido acético (sigma), con un protocolo descrito en anexos I. Para la identificación se realizaron utilizando los siguientes estándares: L cisteína (Sigma, EE.UU.), la glicina (Sigma, EE.UU.), el glutatión (Sigma, EE.UU.), y el glutamato (Sigma, EE.UU.), donde para cada uno de estos estándares se realizaron curvas de calibración, previos a su detección.

2.14 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Con el fin de conocer el contenido de proteínas totales en los tejidos de *S. minima* ante la exposición al níquel se procedió a la cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford, (1976). Esta técnica se basa en las interacciones iónicas e hidrofóbicas del colorante azul brillante de Coomassie con los aminoácidos de las proteínas. Se construyó una curva de calibración usando diluciones de una solución

inicial de 1 mg mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Utilizando 50 mg de tejido liofilizado (raíces u hojas), para cada tratamiento previo. El material vegetal seco (50 mg) se molió en un mortero y se adiciono 1.5 mL de un buffer de extracción que consiste en Tris (Sigma) 100 mM pH 7.0, ácido ascórbico 100 mM (Sigma), EDTA 1 mM, PMSF (Sigma) 1 mM, PVPP al 2%. Esta mezcla se homogeneizó durante 1 min. Las muestras se centrifugaron a 12, 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, las proteínas del sobrenadante obtenido fueron cuantificadas. La absorbancia de las muestras que contenía el total de las proteínas se midió a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (DU-650, Beckman Coulter, USA). Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron expresados de acuerdo a los valores medios \pm desviación estándar y se expresaron como proteínas totales en mg. g⁻¹ PS.

2.15 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos en las plantas control y en las plantas expuestas a tratamientos de níquel se compararon usando un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido por el post hoc utilizando el test de Duncan ($p \leq 0.05$). Los resultados fueron graficados en donde cada media representa tres experimentos independientes y cada barra representa la media \pm desviación estándar (SD). El diseño de muestreo aleatorio empleado fue el simple. Todos los análisis estadísticos de los datos se realizarán con el programa Statgraphic plus 5.1 Software (Statistical gráficos corp., EE.UU.). Los datos obtenidos en cada parámetro evaluado, fueron graficados con el software Sigma Plot V.11.0. (Jandel Corporation, Inc 1992-1994).

2.16 RESULTADOS

2.16.1 EFECTO DEL Ni SOBRE LA MORFOLÓGIA EN *S. minima*.

Para determinar el grado de toxicidad de *S. minima*, las plantas fueron retadas a una concentración de 40 μM de níquel a diferentes tiempos de exposición, donde observamos el grado de toxicidad para cada tejido de la planta, tanto hojas como raíces. En las plantas de *S. minima* pudimos apreciar que para el caso de las hojas, empiezan a presentar una ligera clorosis ante la exposición al níquel a las 96 horas de exposición, siendo más consistente esta clorosis sobre el haz de la hoja a las 144 horas de exposición al níquel, presentando una clorosis más abundante sobre toda la hoja de las plantas de *S. minima*, donde de acuerdo a los datos visuales pudimos observar que las hojas existentes se vuelven ligeramente más pequeñas al máximo tiempo de exposición al níquel, esto en comparación al de una planta sana (planta control). Sin embargo, es importante recalcar que a periodos de incubación menores a las 96 horas las hojas no presentan síntomas de toxicidad alguna, ante la exposición a 40 μM de níquel (Figura 2.1 A).

En la apariencia de las raíces ante la exposición al níquel podemos apreciar que el efecto de toxicidad se observó a periodos más cortos (72 horas) de lo observado en las hojas, posiblemente esto se deba a que las raíces se encuentran en contacto directo en el medio con el metal. Los síntomas de clorosis en raíces se observan a partir de las 96 horas de incubación al níquel, sin embargo, esta se hace más evidente a partir de las 144 horas de incubación al níquel, donde se observó que las raíces a este tiempo de exposición al níquel se tornan en un color marrón más oscuro, al igual que se vuelven quebradizas (Figura 2.1 B). Es importante enfatizar en la respuesta que presentan las plantas de *S. minima*, ya que a periodos largos de exposición al metal (hasta 96 horas), *S. minima* no presenta daños visibles, como pudiera ser una necrosis y por lo consiguiente muerte celular.

La concentración de níquel con la que se está trabajando ($40 \mu\text{M}$ de Ni), es mil veces más alta, de acuerdo a la Norma Permisible de la Secretaria de Salud Pública y Asistencia Social, donde la concentración de níquel admisible para aguas de consumo humano, está a una concentración de 0.05 mg.L^{-1} (equivale a $0.00005 \mu\text{M}$) (Sespas, 2006).

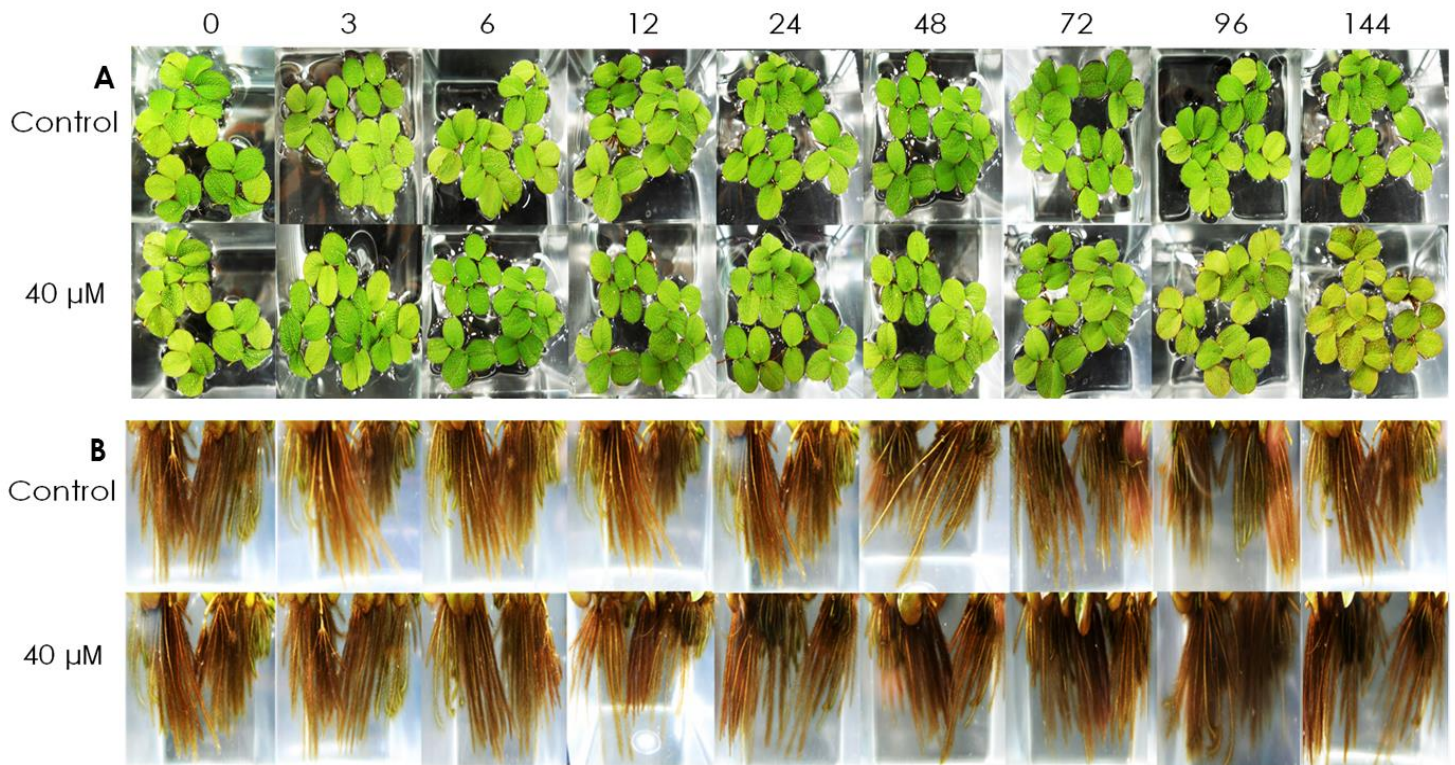


Figura 2.1. Apariencia de las plantas de *S. minima*; hojas (A) y raíces (B) a una concentración de $40 \mu\text{M}$ de níquel a diferentes tiempos de incubación, en comparación con plantas en condiciones control a los mismos días de colecta que las plantas en exposición al metal.

2.16.2. CAPACIDAD DE *Salvinia minima* PARA ACUMULAR Ni EN SUS TEJIDOS

Con el fin de caracterizar la toma de níquel del medio y la presencia de níquel en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, se llevó a cabo la cuantificación del metal en hojas y raíces en una cinética de incubación (Figura 2.2). Se observó que el contenido del metal en los tejidos de *S. minima* aumentaba significativamente ($p \leq 0.05$), conforme transcurría el tiempo de exposición, observándose el curso temporal

incrementando de la toma de níquel en los tejidos evaluados, mostrando comportamientos similares ya que ambos tejidos revelaron una tendencia de dos fases de toma del metal, una primera toma rápida a las 6 y a las 12 horas de exposición y una segunda toma lenta hasta concluir el experimento a las 144 horas. Así mismo se observó que entre ambos tejidos existen diferencias significativas en la capacidad de acumulación del metal ($p \leq 0.05$), siendo la acumulación de níquel significativamente mayor en raíces que en las hojas en todos los tiempos de exposición.

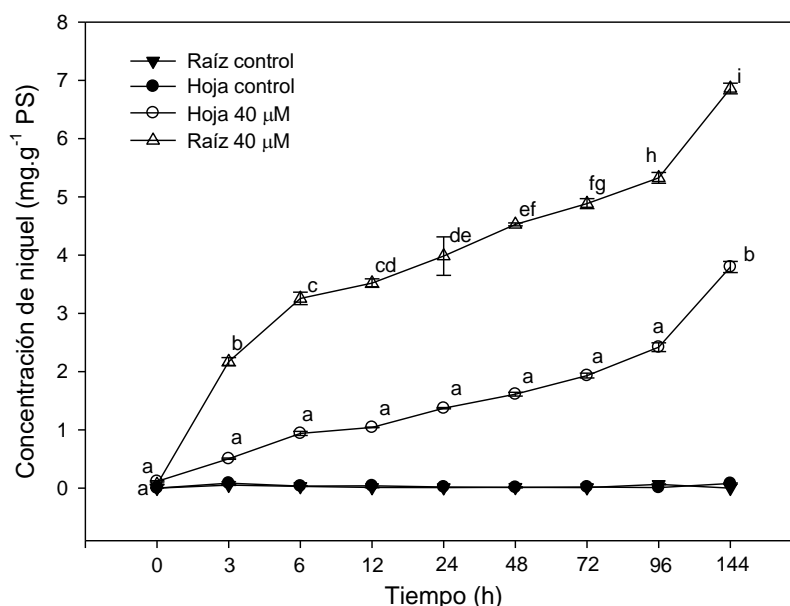


Figura 2.2. Capacidad de acumulación de níquel en plantas de *S. minima* expuestas a 40 μM de Ni tanto en hojas y raíces, en comparación con las plantas control en ambos tejidos hojas y raíces. Las barras corresponden a la media ± desviación estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

S. minima presentó una capacidad de toma de níquel en hojas de 3.8 mg·g⁻¹ PS y en las raíces de 6.9 mg·g⁻¹ PS, en el tiempo máximo de exposición al níquel (144 horas), con una diferencia significativa en ambos tejidos. Se observó, una capacidad de absorción de níquel en planta completa de alrededor de 10.7 mg·g⁻¹ PS a las 144 horas de exposición, con un factor de bioconcentración (BCF) de 4496. En plantas control (hoja y raíz), como era de esperarse, se encuentran con valores nulos en la toma de níquel.

2.16.3 EFECTO DEL Ni SOBRE LA BIOMASA DE *S. minima*

2.16.3.1 LONGITUD DE RAICES

Se evaluó el efecto que pudiera tener el níquel sobre el crecimiento de las plantas, como longitud de raíces. En la evaluación de longitud de raíces de *S. minima* expuesta a diferentes tiempos de exposición al níquel, se observó un ligero crecimiento desde las 0 horas hasta las 48 horas de exposición al níquel, donde de acuerdo a lo observado, el crecimiento de las raíces de las plantas de *S. minima* expuestas al níquel estuvo en función a los tiempos de exposición a los que las plantas fueron expuestas al níquel (Figura 2.3).

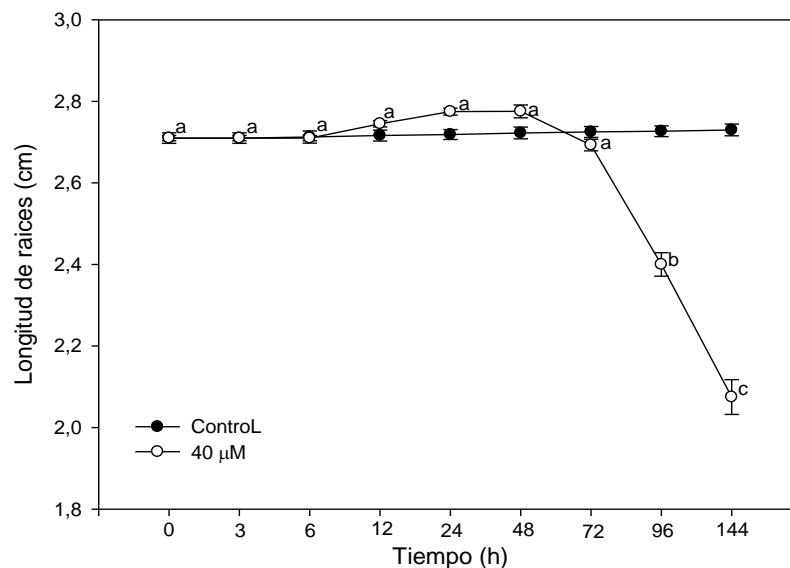


Figura 2.3. Efecto del níquel en longitud de las raíces en plantas de *S. minima* en diferentes tiempos de exposición a una concentración de 40 µM de Ni, en comparación con plantas control. Las barras corresponden al error estándar de 5 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Las plantas control permanecieron sin cambios significativos en el crecimiento de las raíces con un promedio de longitud de raíces de 2.72 centímetros. Por otro lado, podemos observar que las plantas expuestas al níquel presentan una disminución de crecimiento de las raíces a partir de las 96 horas de exposición al níquel con una longitud de raíces a las 96 horas de 2.40 centímetros, siendo más evidente esta disminución en las raíces a las 144 horas de exposición al níquel con una longitud en raíces de 2.07 centímetros. Observándose la mayor disminución a las 144 horas de exposición al níquel con una disminución del 76 % en relación con las raíces de las

plantas control a las 0 horas. Por otro lado, podemos observar que hay un ligero incremento en la longitud de las raíces desde las 12 horas hasta las 48 en las raíces de *S. minima* expuestas al níquel

2.16.3.2 PESO FRESCO Y SECO EN HOJAS

El efecto del níquel sobre el crecimiento de *S. minima* también fue evaluado en los parámetros de peso fresco y peso seco en hojas y raíces. Se presentó una inhibición en la producción de biomasa cuando se incrementaba el tiempo de exposición al níquel. Inicialmente, en peso fresco como en peso seco en hojas encontramos un aumento en la biomasa desde las 6 hasta 48 horas de exposición al níquel, sin embargo, a las 72 horas de exposición podemos observar que los valores en el peso fresco como en el peso seco, regresan a los valores de plantas control. Como era de esperarse a tiempos largos de exposición (96 y 144 horas) al níquel, podemos observar que los valores en los pesos (PF, PS), en hoja se presentan de manera descendente. Los valores en el peso fresco (PF), en las hojas a las 96 horas fueron de 1.43 gramos, siendo que, a las 144 horas de exposición al níquel, el valor en el peso fresco fue de 1.41 gramos, con una disminución en el peso fresco del 98 % en relación con el peso fresco de las plantas control a las 0 horas (Figura 2.4 B).

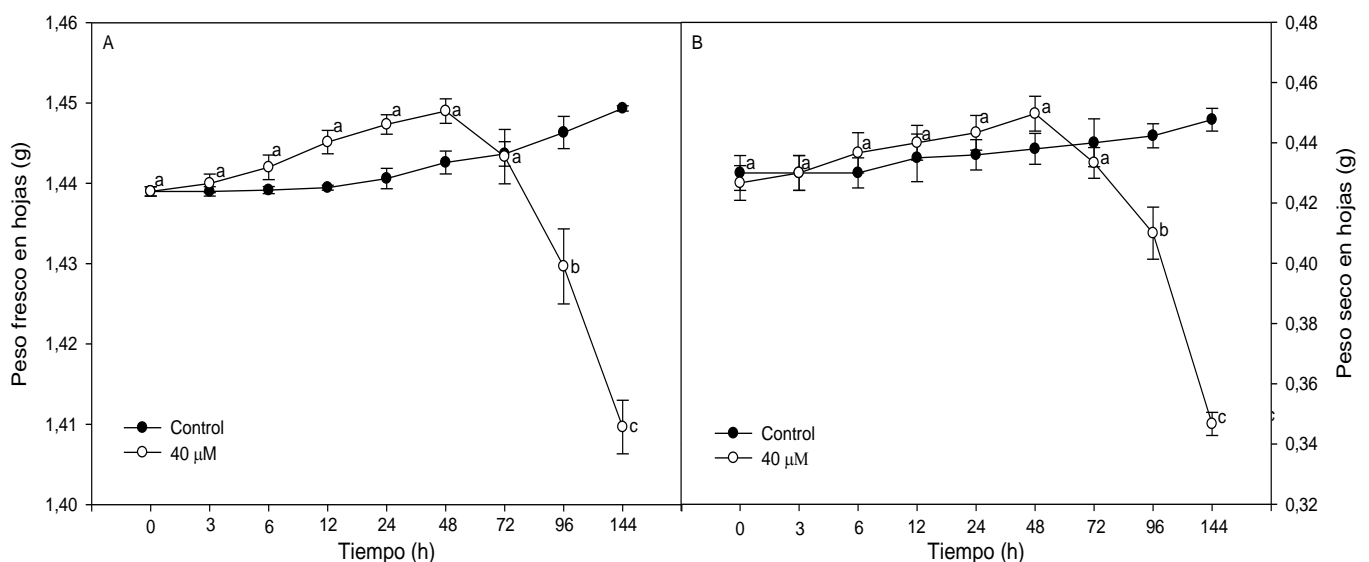


Figura 2.4. Efecto del níquel en peso fresco (A) y en peso seco (B) en hojas de plantas de *S. minima* en diferentes tiempos de exposición a una concentración de 40 µM de Ni. Las barras corresponden al error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

El peso fresco (PF), en las hojas de las plantas control se presentó de manera ascendente, con valores en el peso PF en hojas a las 0 horas de 1.43 gramos, siendo que a las 144 horas el valor en el PF fue de 1.45 gramos (Figura 2.4 A). Por otro lado, podemos observar que el valor en el peso seco (PS), en las hojas a las 96 horas de exposición al níquel fue de 0.41 gramos, siendo que a las 144 horas de exposición este valor en el PS en las hojas fue de 0.35 gramos, con una disminución del 79 % en relación a las plantas control a la 0 hora. El peso seco en hojas de las plantas control se presentó de manera ascendente con valores a las 0 horas de 0.43 gramos y con valores al concluir el experimento (144 horas) de 0.45 gramos.

2.16.3.3 PESO FRESCO Y SECO EN RAICES

En raíces podemos observar que al igual que en hojas, ambos pesos (PF, PS), se observa un aumento a partir de las 6 horas de exposición al níquel, presentándose de manera ascendente hasta las 72 horas de exposición al níquel, sin embargo, podemos observar que los valores en ambos pesos (PF, PS), a este tiempo (72 horas), disminuyen a valores cercanos al de control. Con el aumento de los tiempos (96 y 144 horas), de exposición al níquel los valores en los pesos (PF, PS), en las raíces se presentan de manera descendente hasta concluir el experimento. A las 96 horas de exposición al níquel, observamos valores en el peso fresco en las raíces de 0.34 gramos, siendo que a las 144 horas de exposición al níquel el valor en el peso fresco fue de 0.33 gramos, observándose una disminución en el peso fresco del 94 % en relación con las raíces de las plantas control a las 0 horas.

El peso fresco en raíces en las plantas control se presenta ligeramente ascendente con valores a las 0 horas de 0.34 gramos, siendo que a las 144 horas el valor en el PF en las raíces fue de 0.35 gramos (Figura 2.5 A). Por otro lado, podemos observar que, a las 96 horas en raíces, se registran valores en el peso seco (PS), de 0.016 gramos, siendo que a las 144 horas el valor en el peso seco en raíz fue de 0.015 gramos, observándose una disminución en el peso seco en raíz a las 144 horas del 90 % en relación con plantas control a las 0 horas (Figura 2.5 B). Las plantas control permaneces con nulo crecimiento, ya que en la cinética de crecimiento de las raíces no se observa crecimiento alguno.

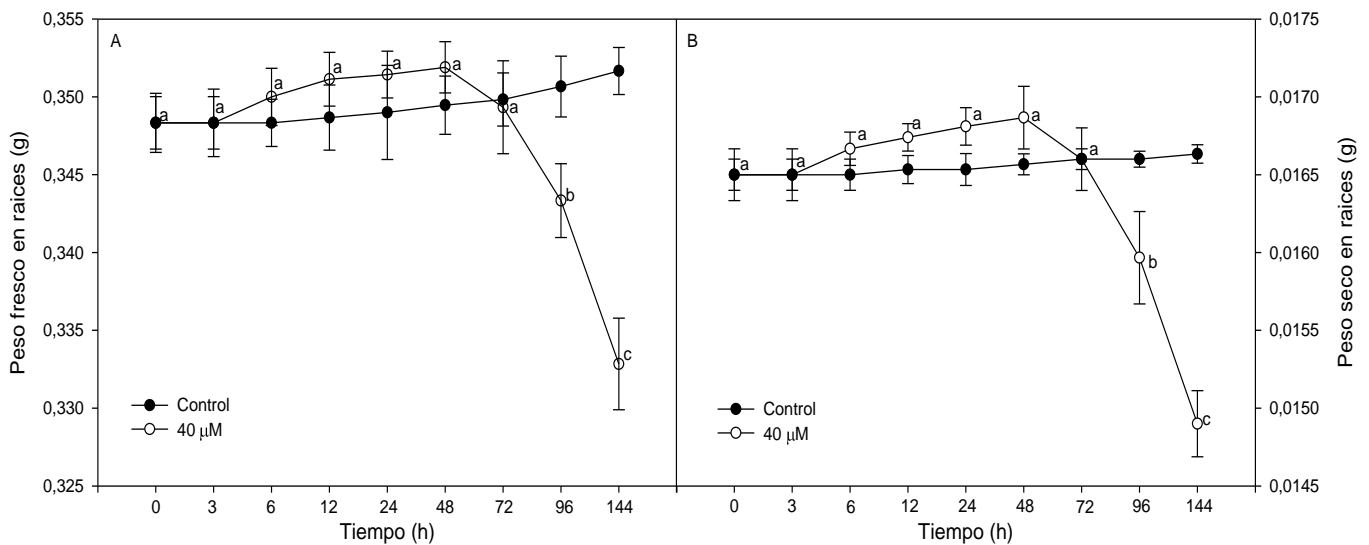


Figura 2.5. Efecto del níquel en peso fresco (A) y en fresco seco (B) en raíces de plantas de *S. minima* en diferentes tiempos de exposición a una concentración de 40 µM de Ni. Las barras corresponden al error estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

2.16.4 EFECTO DEL Ni SOBRE LA FOTOSÍNTESIS EN *S. minima*

Para caracterizar el efecto del níquel a nivel fisiológico se llevó a cabo la determinación de fotosíntesis. En fotosíntesis (P_n) pudimos observar que las plantas control de *S. minima* mostraron una tasa fotosintética de $1.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ manteniéndose sin cambios significativos durante todo el experimento hasta las 144 horas. Cuando las plantas fueron expuestas a níquel, la tasa fotosintética mostro una tendencia a disminuir en relación con el tiempo transcurrido. Sin embargo, la tasa fotosintética no mostro cambios significativos durante las primeras 24 horas de exposición, siendo que, a las 48 horas de exposición, ya se observa una diferencia significativa en fotosíntesis, con una tasa fotosintética de $1.07 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, observándose plantas fotosintéticas incluso hasta las 96 horas de exposición al níquel, con una fotosíntesis de $0.43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con una reducción en P_n a las 96 horas del 74 % en relación con las plantas control. Como era de esperarse, al máximo tiempo de exposición (144 horas), las plantas de *S. minima* ya se encuentran realizando respiración (P_n es de $-0.60 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 2.6).

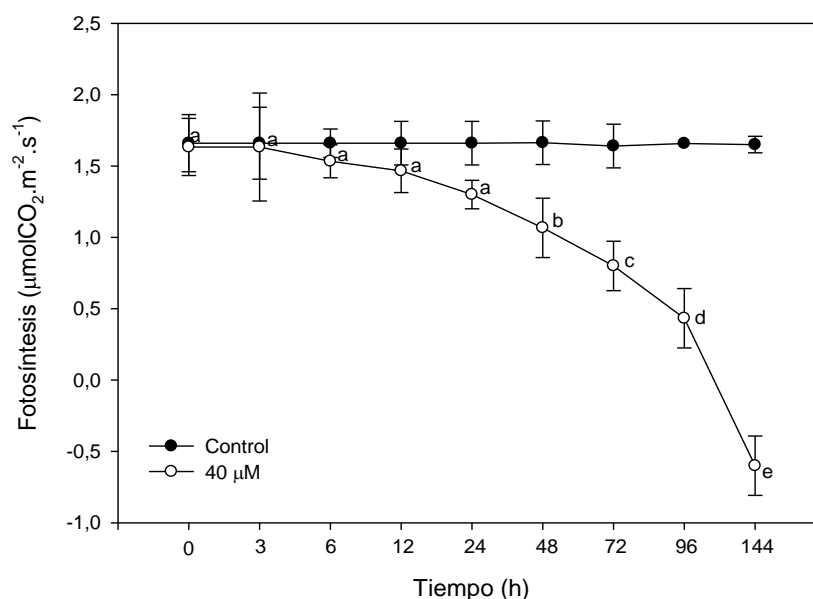


Figura 2.6. Efecto del níquel en la tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de *S. minima* ante la exposición de $40 \mu\text{M}$ de Ni en función del tiempo de exposición. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

2.16.5 EFECTO DE Ni EN LA FLUORESCENCIA DE CLOROFILA (Fv/Fm) EN PLANTAS DE *S. minima*.

La eficiencia fotosintética medida como relación Fv/Fm (PS II), fue determinada en plantas control y en plantas de *S. minima* expuesta a una concentración de $40 \mu\text{M}$ de níquel a diferentes tiempos de exposición. En nuestros resultados podemos observar que plantas control se mantienen sin cambios significativos hasta las 144 horas, con un valor de Fv/Fm de 0.81. Por lo contrario, en plantas expuestas a níquel, presentaron una reducción de Fv/Fm. Es importante mencionar que a las primeras 12 horas de exposición no se observaron diferencias significativas entre las plantas control y las plantas expuestas a $40 \mu\text{M}$ de níquel (Fv/Fm de 0.78) (Figura 2.7). Esto correlaciono con los resultados obtenidos en fotosíntesis.

El daño fue más evidente a partir de las 48 horas de exposición, ya que el valor de Fv/Fm de 0.67 en las plantas de *S. minima* se encuentran por debajo del umbral de Fv/Fm de una planta sana (0.80). Donde se le podría atribuir un estrés moderado, evaluado en la fluorescencia de clorofila reflejando un daño en el transporte de electrones del PSII, este valor disminuyo y fue más evidente a tiempos más

prolongados de exposición, donde a las 96 horas podemos encontrar que las plantas de *S. minima* ya presentan un daño en el fotosistema PSII con un valor de Fv/Fm de 0.54, con una disminución a las 96 horas en Fv/Fm de 64 % en relación a las plantas control.

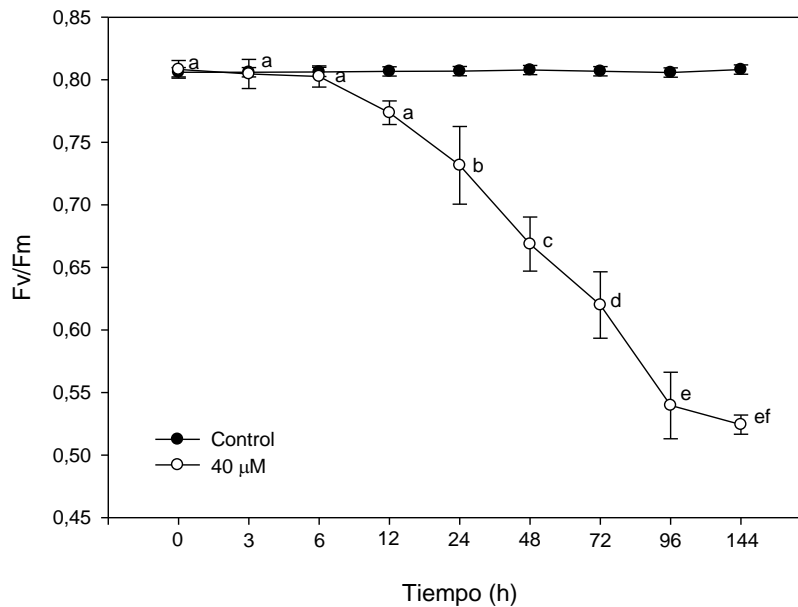


Figura 2.7. Efecto del Ni en la fluorescencia de la clorofila Fv/Fm (PS II), en plantas de *Salvinia minima* en función del tiempo de incubación. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

En nuestros tratamientos a las 144 horas de exposición al níquel, las plantas de *S. minima* no presentan diferencia significativa (Fv/Fm de 0.52) en el PSII con relación al dato obtenido a las 96 horas de exposición al metal, indicándonos que las plantas de *S. minima* a las 96 horas de exposición al níquel, fue el tiempo donde se presentó la mayor afectación al fotosistema (PS II).

2.16.6 RENDIMIENTO CUÁNTICO DE CAPTURA DE ENERGÍA DE EXCITACIÓN DEL PS II EN PLANTAS DE *S. minima* ANTE LA EXPOSICIÓN AL Ni.

Las curvas OJIP fueron determinadas en plantas de *S. minima* ante una exposición de 40 µM de níquel a diferentes tiempos de incubación. Los cambios en la cinética de la subida de fluorescencia OJIP fueron revelados por calcular la diferencia en las curvas de fluorescencia variables (Figura 2.8). En nuestros resultados podemos observar una

cinética de la subida de la fluorescencia bajo estrés oxidativo, con una subida polifásica en la cinética de fluorescencia, esto en todos los tiempos de exposición.

Podemos observar que el daño del PSII o en su caso la disminución de la eficiencia de fotones en las plantas de *S. minima* se hizo más evidente a los tiempos largos de incubación. Podemos observar que la cinética de la fluorescencia para las plantas control a partir de 0.01 ms, obtuvieron una fluorescencia cercana a los 12,000 mV, siendo que la curva de las 24 horas de exposición, las plantas de *S. minima* presentan una menor fluorescencia, de 10,200 mV a 0.1 ms. La curva de las 24 horas de exposición al níquel se observa el mejor rendimiento a 0.1 y 1 ms.

Siendo que la curva de las plantas de *S. minima* a las 48 horas de exposición esta subida polifásica del rendimiento cuántico del PSII presenta en general un menor rendimiento de fluorescencia (mV), que la curva de 24 horas, solo ligeramente mayor a el control, al 0.003 ms, sin embargo, la eficiencia se comporta sin curva bifásica al 0.01 ms con una eficiencia de 9,700 (mV), de fluorescencia al tiempo de 1 ms. Mientras la curva a las 96 horas de exposición a níquel podemos observar que el máximo rendimiento en la eficiencia del PSII se observa a los tiempos 0.001 ms, con un rendimiento aproximadamente de 5,800 (mV).

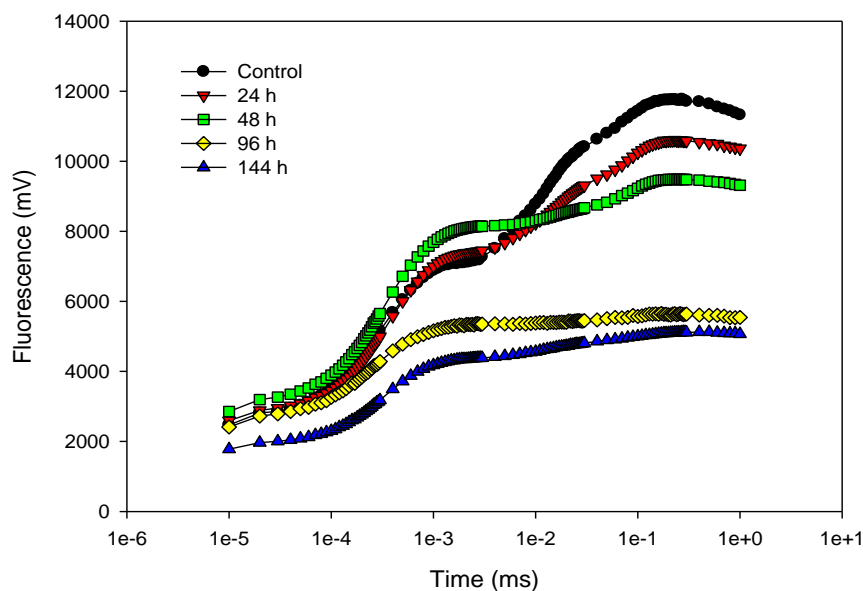


Figura 2.8 Rendimiento cuántico del PSII en plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μM de Ni a diferentes tiempos de incubación.

De igual forma, la curva de las 144 horas, podemos observar la menor eficiencia del PS II, con un rendimiento de PSII de 5,650 (mV), a 1 ms, es decir las plantas de *S. minima* a este tiempo de exposición a 40 μ M de níquel muestra el valor más bajo de rendimiento en todos los tiempos de la curva. Es decir, observamos que la transferencia de electrones es más alta en plantas hasta las 48 h de exposición y que esta es más lenta en las plantas expuestas a mayores tiempos de exposición a Ni, como a 96 y 144 h.

La tolerancia a metales y la condición de estrés en organismos fotosintéticos como *S. minima* se evaluó por un índice de comportamiento que puede ser específicamente sensible a estrés por Ni. Este índice (PI_{ABS}), se evaluó de la determinación de la fluorescencia de clorofila. El PI_{ABS} , es una evaluación multi-paramétrica de tres pasos funcionales independientes (densidad de centros de reacción activos, captura de energía de excitación y conversión de energía de excitación al transporte de electrones) y refleja la funcionalidad de los fotosistemas I y II.

Por lo que evaluamos el PI ABS, el cual ha sido descrito como un parámetro sensible de la Test OJIP, que mide el rendimiento de los receptores de electrones finales de PSII (Tsimilli y Strasser, 2008), incluye el potencial parcial de la conservación de energía y está estrechamente relacionado con el resultado final del comportamiento de la planta, tal como el crecimiento o la supervivencia en condiciones de estrés (Yusuf *et al.*, 2010). Un PI negativo o positivo expresa una pérdida o ganancia, respectivamente, de la capacidad de conservación de la energía (Yusuf *et al.*, 2010).

Evaluamos el rendimiento de los receptores del PSII, donde en plantas control se presentó sin cambios significativos en todos los tiempos de exposición, sin embargo, cuando las plantas fueron expuestas a níquel a los primeros tiempos de exposición (3 y 6 horas), podemos observar un aumento en PI ABS, lo que nos indica un aumento en la efectividad de los centros de reacción del PSII, es decir mayor densidad y captura y energía para el transporte de los electrones, sin embargo como podemos observar en nuestros resultados como transcurría el tiempo de exposición este índice se presentó de manera descendente con diferencias significativas a los tiempos de exposición 12, 24 y 48 horas de exposición, observando el mayor daño en el rendimiento del transporte de los electrones a las 48 horas ante la exposición al níquel (Figura 2.9).

Podemos apreciar que hay un fuerte daño en el transporte de los electrones y por lo consiguiente en la vitalidad de las plantas de *S. minima* desde las 12 horas de exposición al níquel, observándose un descenso muy marcado en las plantas de *S. minima*, donde para las 12 horas se observó una reducción de PI ABS del 64%, siendo que a las 48 horas esta reducción del PI ABS fue del 78% en comparación con las plantas control, las cuales permanecieron sin cambios significativos en el transporte de electrones. Por otro lado, podemos observar que el PI ABS, de las plantas para los tiempos 96 y 144 horas de exposición al níquel no se observan diferencias significativas en relación con los datos obtenidos a las 48 horas.

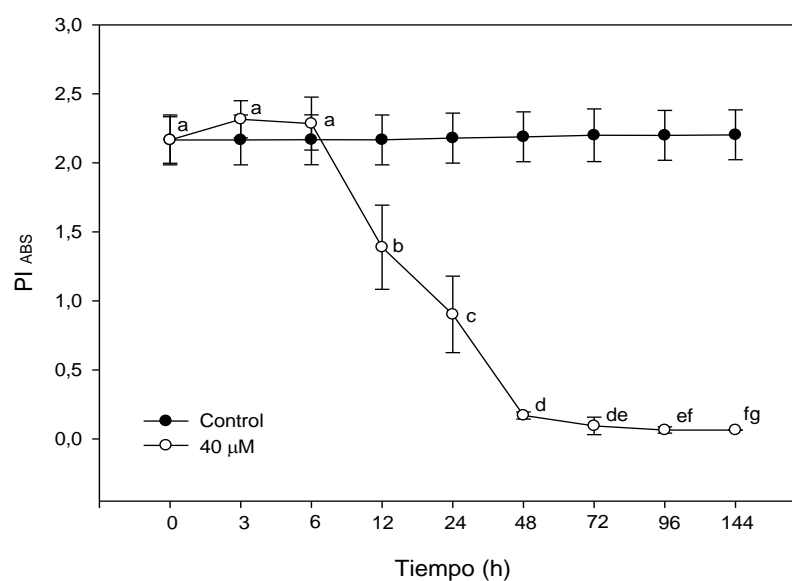


Figura 2.9. Rendimiento del PSII (PI ABS) en plantas de *S. minima* a diferentes tiempos de exposición de 40 µM de Ni. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 réplicas, por determinación. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

2.16.7 EFECTO DE Ni EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE MEMBRANA EN LAS PLANTAS DE *S. minima*

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica de membrana y un indicador de la producción de radicales libres y por lo consiguiente también es contemplado como un indicador de daño en membrana (Ohkawa *et al.*, 1979). Nuestros resultados mostraron que, con el aumento de los tiempos de exposición a una concentración de 40 µM de níquel, el contenido de MDA en la planta, se comporta de manera ascendente, sin embargo, podemos observar que en los primeros tiempos de exposición el contenido de MDA se observa bajo y sin cambios significativos entre

los diferentes tejidos de la planta hasta las 48 horas de exposición, donde se observa el incremento significativo en la producción de MDA con valores de 3.0 y 3.05 nmol g⁻¹ PS de MDA en hojas y raíces, respectivamente (Figura 2.10).

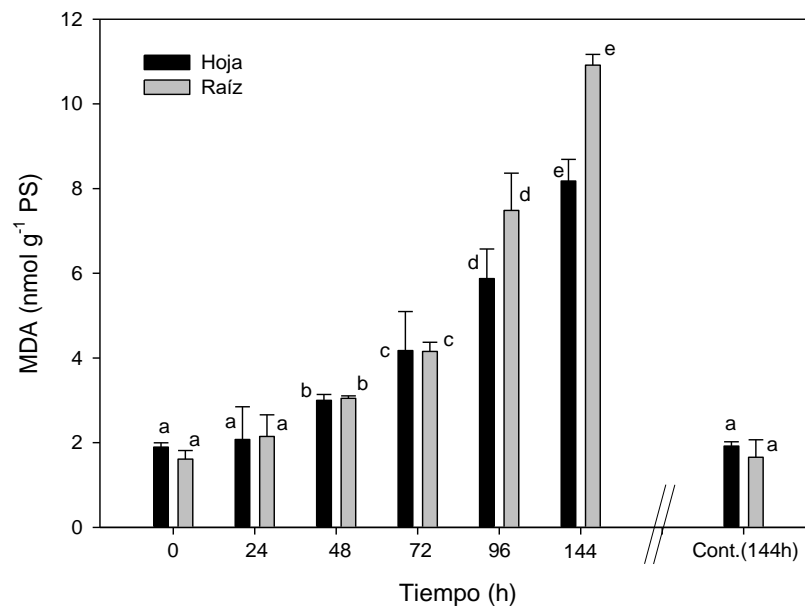


Figura 2.10. Efecto del Ni en contenido de MDA en las plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μ M de Ni a diferentes tiempos de incubación. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 tratamientos con 3 réplicas en cada tratamiento. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Sin embargo, el contenido de MDA como índice de contenido de peroxidación lipídica de membrana a las 72 horas de exposición al níquel, ya presentan un contenido estadísticamente significativo con respecto al tratamiento control. Sin embargo, podemos observar que, en los tiempos de 24 horas de exposición en los diferentes tejidos, no se observan diferencias significativas en relación al control, donde los valores de MDA encontrados en hojas a las 24 horas de exposición al níquel fueron de 2.07 nmol g⁻¹ PS, siendo que en raíz se observaron valores de 2.15 nmol g⁻¹ PS de MDA.

A las 96 horas de exposición podemos observar un contenido de MDA incrementando con valores en hojas de 5.87 nmol g⁻¹ PS y en raíces de 7.48 nmol g⁻¹ PS, con diferencia significativa entre ambos tejidos, sin embargo, podemos observar que la producción de MDA en las plantas de *S. minima* se presenta de manera ascendente

con una producción de MDA a las 144 horas en hojas de $8.17 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$, siendo que, en raíces, el valor de MDA se observó de $10.91 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PS}$, con un incremento del 25 %. Por otra parte, podemos observar que el contenido de MDA en los diferentes tejidos de las plantas control (0 y 144 horas), se presentaron sin diferencia significativas, lo cual nos indica que el contenido de MDA como índice de peroxidación de lípidos en las membranas, no está incrementando por los tiempos que empleamos en el estudio, sino más bien es debido a los tiempos de incubación al níquel.

2.16.8 EFECTO DE Ni EN EL CONTENIDO DE PROLINA EN PLANTAS DE *S. minima*.

El aminoácido prolina es uno de los metabolitos que se acumula con mayor frecuencia en las plantas cuando estas se encuentran en condiciones de estrés, por lo que se considera que está involucrado en un mecanismo de tolerancia al estrés osmótico (Lutts *et al.*, 1999). En el presente estudio se evaluó el contenido de prolina en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, a los diferentes tiempos de exposición al que las plantas fueron expuestas.

En nuestros resultados encontramos que el contenido de prolina aumenta a partir de las 24 horas de exposición al níquel, esto en los diferentes tejidos de las plantas, indicándonos posiblemente, un estrés que induce un ajuste osmótico en las plantas de *S. minima* ante la exposición al níquel. De igual manera, pudimos observar que a partir de que se incrementa el contenido de prolina (24 horas de exposición a Ni), encontramos en todos los tiempos de exposición al níquel posteriores, el contenido de prolina incrementa en cada tiempo con una diferencia significativa entre los diferentes tejidos evaluados. Sin embargo, es muy evidente que en todos los tiempos de exposición el contenido de prolina fue relativamente mayor en raíces que en hojas. Lo mismo se encontró al evaluar la peroxidación lipídica de la membrana (MDA; Figura 2.10), en las plantas de *S. minima*.

Sin embargo, algo muy importante que hay que resaltar en este estudio, es que en plantas control tanto a las 0 horas y a las 144 horas, no presentaron diferencias significativas en el contenido de prolina, ya que lo observado en el contenido de prolina para hojas a las 0 horas fue de $0.017 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ PS}$ y para raíces fue de $0.018 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ PS}$. Siendo que hojas control a las 144 horas, se observó un contenido de prolina de $0.019 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ PS}$ y en raíces control a las 144 horas se observó un

contenido de prolina de $0.021 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, indicándonos que el contenido de este osmolito en plantas control es muy bajo (Figura 2.11).

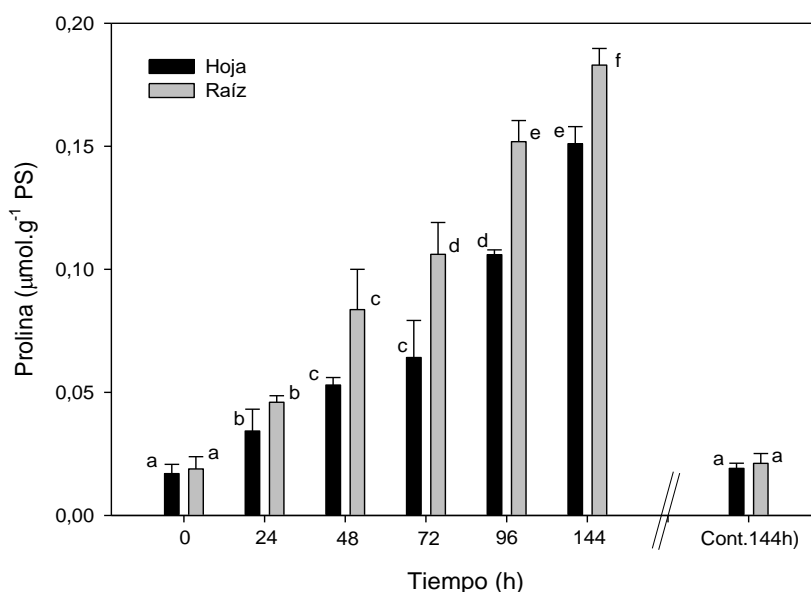


FIGURA 2.11 Efecto del Ni en el contenido de prolina en las plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de $40 \mu\text{M}$ de Ni a diferentes tiempos de incubación. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 tratamientos con 3 réplicas en cada tratamiento. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Podemos observar la cinética del incremento del contenido de prolina con la cinética del tiempo de exposición, la cual es más evidente en raíces, siendo que en hojas se encontró a las 144 horas, un contenido de prolina de $0.151 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, con un aumento de prolina del 89 % en relación con las hojas control a las 0 horas, siendo que para de las raíces control se encontró un contenido de prolina de $0.183 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, observándose un incremento en el contenido de prolina del 97% en relación con raíces control a las 0 horas.

2.16.9 EFECTO DE Ni EN POTENCIALES: Ψ_w , Ψ_π DE PLANTAS DE *S. minima*.

Como sabemos el potencial hídrico (Ψ_w) es utilizado como indicador del grado de contenido de agua en las plantas, por lo tanto, en este trabajo se midió el Ψ_w en hojas de las plantas de *S. minima* a los diferentes tiempos de incubación, ante la exposición al níquel. Observamos que el potencial hídrico en las plantas control de *S. minima*

permanecen sin cambios significativos en todos los tiempos de incubación, con un potencial hídrico de -0.59 MPa desde el tiempo 0 hasta concluir el experimento (144 horas).

Cuando expusimos a las plantas a una concentración de 40 μM de níquel, observamos una caída del potencial hídrico muy drástico, incluso desde las 3 horas de exposición al níquel, observamos un potencial hídrico (Ψ_w) de -0.62 MPa, presentándose de manera descendente hasta las 144 horas de exposición al níquel, con un potencial hídrico en plantas de *S. minima* de -0.77 MPa, donde encontramos una reducción del 77% en el potencial hídrico en relación con las plantas control. Es importante mencionar que en las primeras 12 horas de exposición al níquel las plantas de *S. minima* no presentan diferencias significativas en el potencial hídrico de las plantas expuestas al metal, siendo que las diferencias significativas se observan en tiempos posteriores a las 12 horas de incubación al níquel (Figura 2.12).

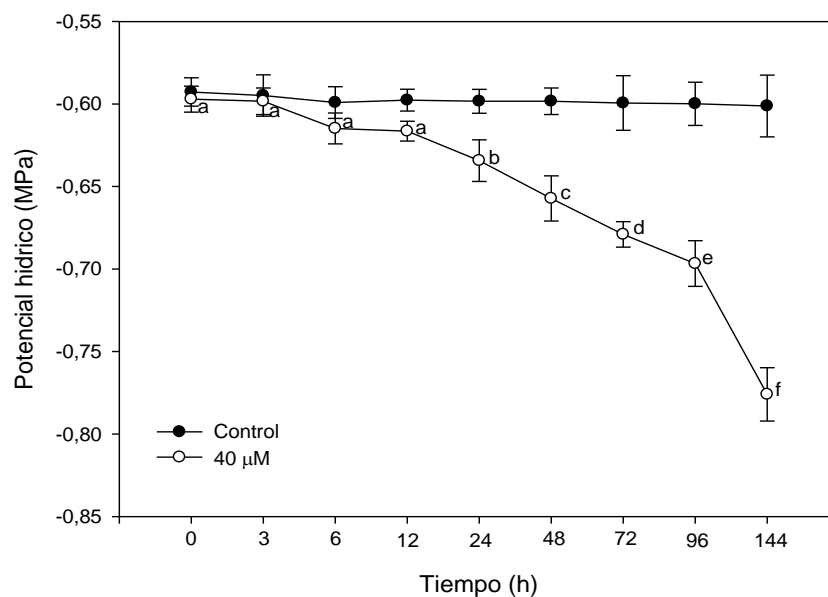


FIGURA 2.12 Efecto del Ni en el potencial hídrico de las plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μM de Ni a diferentes tiempos de incubación. Las barras corresponden al error estándar de 3 tratamientos con 3 réplicas en cada tratamiento. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Para conocer el ajuste osmótico que las plantas de *S. minima* presentan al ser expuestas a una cinética de tiempo ante la presencia de níquel, evaluamos el potencial osmótico (Ψ_π). Observamos que las plantas control de *S. minima* permanecen sin cambios significativos en todos los tiempos evaluados, con un

potencial osmótico de -1.09 MPa. Cuando expusimos a las plantas a una concentración de 40 μM de níquel, observamos que el potencial osmótico disminuyó drásticamente a partir de las primeras 3 horas de exposición al níquel, con un valor en potencial osmótico de -1.22 MPa (Figura. 2.13).

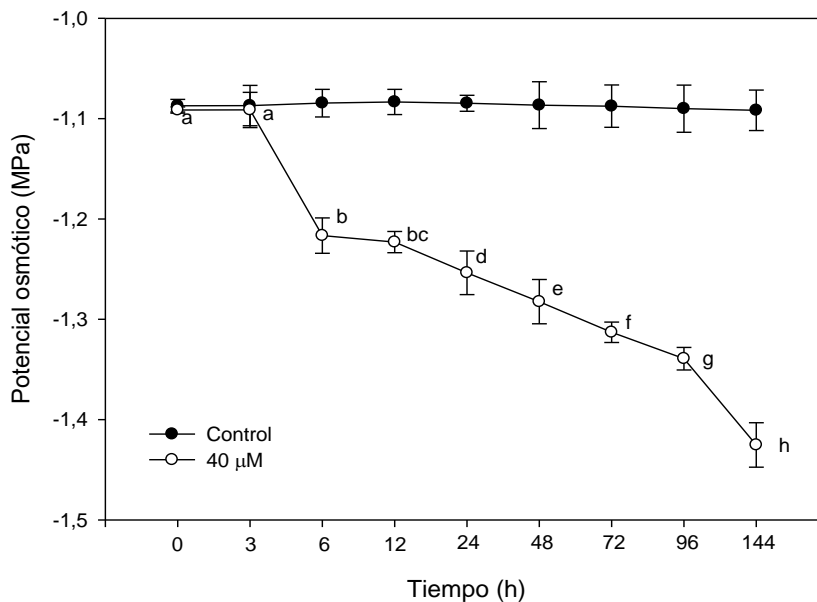


FIGURA 2.13 Efecto del Ni en el potencial osmótico de las plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μM de Ni a diferentes tiempos de incubación. Las barras corresponden al error estándar de 3 tratamientos con 3 réplicas en cada tratamiento. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Dónde a partir de entonces se presenta de manera descendente hasta las 144 horas de exposición al níquel, con un valor en el potencial osmótico de -1.43 MPa, observándose una reducción del potencial osmótico del 76% esto con relación a plantas control. De igual manera en nuestros resultados obtenidos podemos observar una diferencia significativa en el potencial osmótico de las plantas a partir de las 3 horas de exposición y de las 24 horas de exposición en adelante, en la cinética del tiempo de incubación al níquel.

2.16.10 CORRELACIONES

El análisis de correlación entre los diferentes parámetros obtenidos, se realizó mediante una regresión lineal múltiple. como posible indicador de interacción y posible(s) mecanismo(s) que tiene(n) esta planta ante la exposición a níquel. Nuestros resultados fisiológicos contra el contenido interno del metal en las plantas de *S.*

minima abren un amplio panorama acerca de la tolerancia y la eficiencia de *S. minima* en la respuesta o ante la exposición a níquel. Podemos observar que *S. minima*, es capaz de tomar Ni, presentando una alta tolerancia a níquel, evidenciándolo con estos resultados, de la toma del Ni ya que a una concentración interna de níquel menor a los 4 mg. g⁻¹ PS no produce alguna afectación a nivel fisiológico en las plantas de *S. minima*, sin embargo, cuando se sobrepasa este umbral (4 mg.g⁻¹ PS), los valores para la mayoría de las respuestas fisiológicas empiezan a disminuir.

Algo muy importante que se mencionó con anterioridad es que algunos procesos fisiológicos son más sensibles al entrar el níquel en los tejidos de las plantas, por ejemplo, la fluorescencia de clorofila disminuyo a medida que aumento el contenido del metal en la planta ($r^2 = 0.95$), la tasa fotosintética al igual que el PS II, disminuyo a medida que el metal ingresaba en la planta ($r^2 = 0.97$), para el caso del potencial hídrico se hace más negativo, con el aumento de la concentración interna de níquel en las plantas de *S. minima* ($r^2 = 0.97$), observando algo similar en el potencial osmótico ($r^2 = 0.95$) (Figura 2.14 A). Para el caso de fuga de electrolitos podemos observar que con el aumento interno del níquel en plantas de *S. minima*, este se dispara para el caso de las hojas se observa una correlación positiva de $r^2 = 0.98$ y en raíces de $r^2 = 0.86$, observando una mayor correlación en hojas que en raíces con el contenido interno del metal (Figura 2.14 B).

De igual manera, como se observa en las correlaciones para MDA y prolina con el contenido de metal en los tejidos aumentan con el aumento del contenido interno del metal en la planta. Siendo que para el caso de peroxidacion lipídica (MDA) se observó una fuerte correlación del índice de daño causado por el aumento del metal (Ni) en *S. minima* con una $r^2 = 0.99$ en hojas y raíces. Algo muy similar ocurrió con prolina en los diferentes tejidos ya que tanto en hojas como en raíces encontramos una fuerte correlación del contenido de prolina con el aumento del metal interno en las plantas de *S. minima* con una $r^2 = 0.99$, esto para ambos tejidos. Siendo sorprendente, ya que nos está indicando que el aumento del metal interno en las plantas de *S. minima* posiblemente esté produciendo un daño en membranas (Figura 2.14 B).

Es muy interesante que el ajuste osmótico en las plantas de *S. minima* esté relacionado con el contenido de prolina encontrado en los tejidos. De igual forma interesante es que encontramos una alta correlación ($r^2 = 0.90$ o mayores), para cada parámetro fisiológico analizado, contra el contenido interno de níquel en los tejidos de *S. minima* (Figura 2.14 A y B).

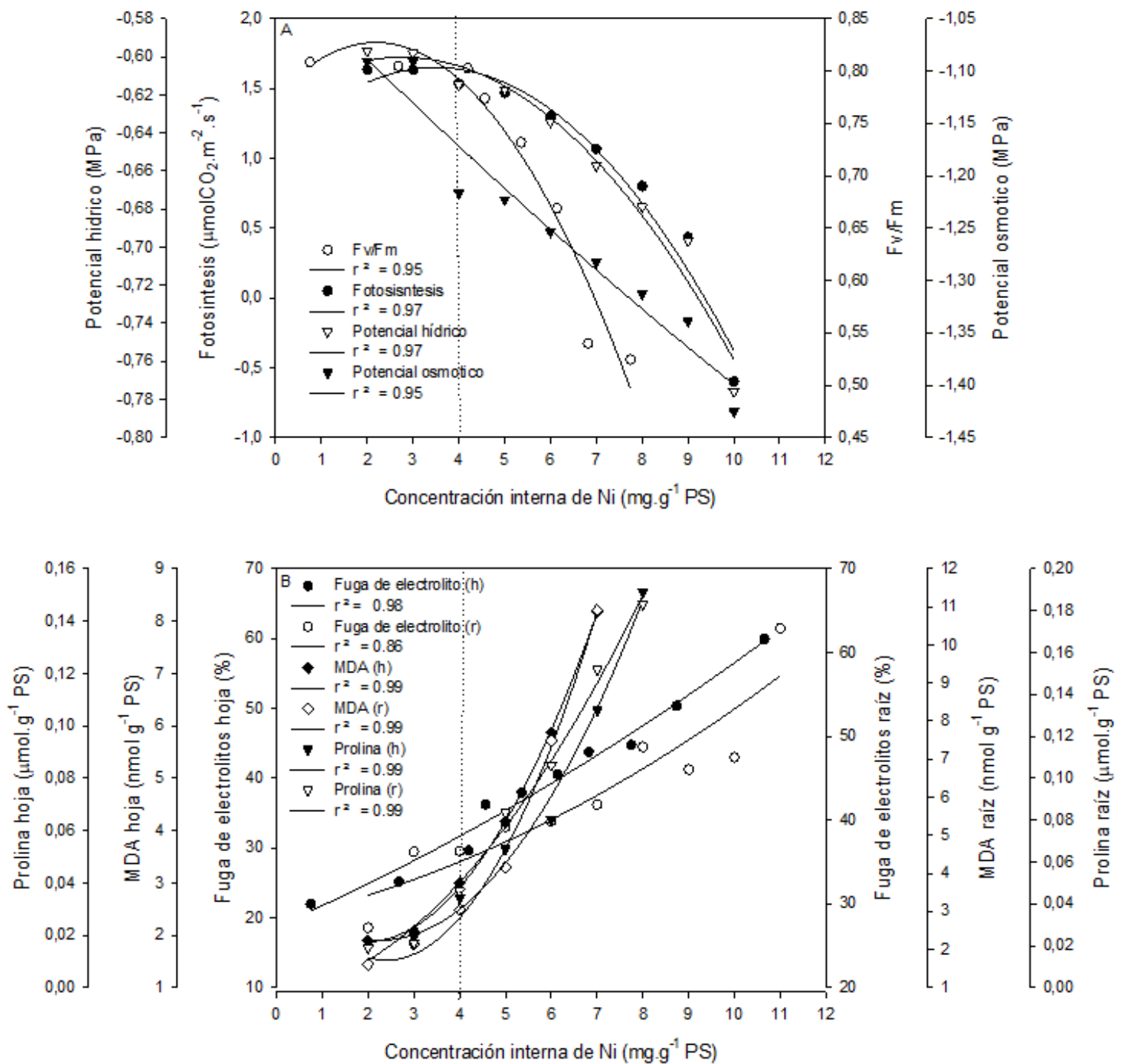


FIGURA 2.14 Correlaciones polinomiales cuadráticas entre la toma interna del metal planta completa de *S. minima* contra cada uno de los parámetros fisiológicos evaluados en hoja y raíz, en plantas de *S. minima* expuestas a una concentración de 40 μM de Ni a diferentes tiempos de incubación.

2.17 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN TEJIDOS DE *S. minima* EN RESPUESTA A Ni

La evaluación de proteínas totales en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, se realizó en presencia de 40 μM de níquel a periodos largos de exposición (144 horas). Los resultados en este experimento mostraron que, en presencia de níquel, la síntesis de proteínas se presentó de manera descendente, en cada tejido evaluado, sin embargo, podemos apreciar que a las 3 horas de exposición tanto en hojas como en raíces hay una alta síntesis de proteínas totales en los diferentes tejidos ante la exposición al níquel, observándose un total de proteínas en hojas a las 3 horas de 41.77 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, y en raíces un total de proteínas de 38 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, presentándose de manera descendente hasta las 144 horas de exposición al níquel con un total de proteínas en hojas de 28, y en raíces de 25 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS (Figura 2.15).

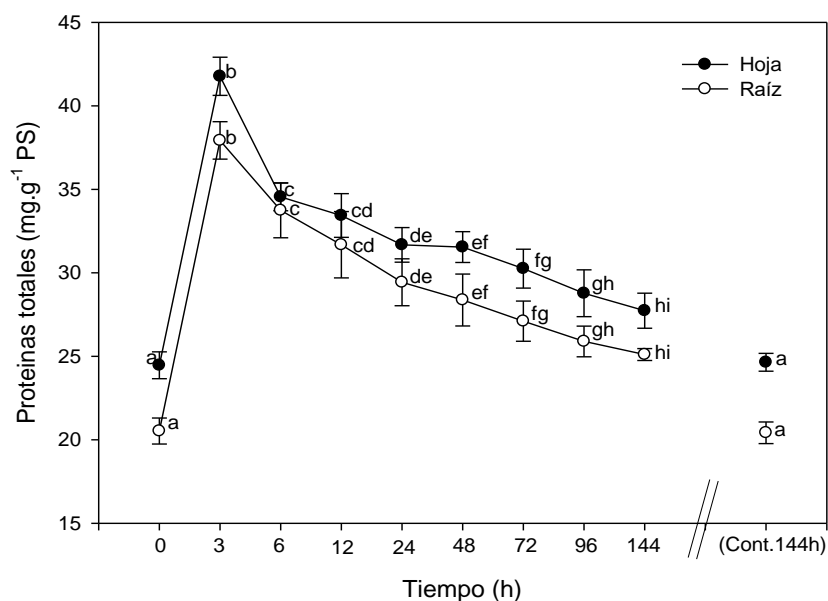


FIGURA. 2.15 Contenido de proteínas totales en tejidos de *S. minima* en respuesta a 40 μM de níquel a diferentes tiempos de exposición. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 tratamientos. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

Algo muy importante que hay que enfatizar es que el contenido de proteínas totales en hojas fue mayor en todos los tiempos de exposición al níquel, esto incluso igual se observó en plantas control con un total de proteínas en hojas de 24.46 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS y en raíces se observó un total de proteínas de 20.52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, de igual manera a la par

evaluamos el total de proteínas en plantas control a 144 horas, donde no se observó diferencia significativa en el total de proteínas en los diferentes tejidos en relación con el contenido de proteínas control a las 0 horas (Figura 2.15). Por otra parte, para cada tejido a los diferentes tiempos solo observamos diferencias significativas a las 3 y 6 horas además que para el caso de las raíces igual se observaron diferencias en el contenido de proteínas a las 24 horas de exposición al níquel.

2.18 CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN EN RESPUESTA A Ni EN TEJIDOS DE *S. minima*

La síntesis de glutatión (GSH) fue evaluada en los diferentes tejidos de *S. minima* en presencia de 40 μM de níquel a periodos largos de exposición 144 horas. Los resultados en este experimento mostraron que en la presencia de níquel incremento la síntesis de glutatión tanto en hojas como en raíces de *S. minima*. Observándose a las 3 horas de exposición al níquel un rápido incremento en la síntesis de glutatión en ambos tejidos. En hojas se observó una síntesis de 81.70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Sin embargo, como era de esperarse se observó una mayor síntesis de glutatión en raíces que en hojas, ya que en raíces la síntesis de GSH fue de 107.16 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Como podemos apreciar en ambos tejidos con el transcurso de los tiempos de exposición se observó una disminución significativa en ambos tejidos en la producción de glutatión hasta las 144 horas de exposición, con excepción para raíces a las 24 horas que hay un ligero incremento de GSH y en hojas este incremento se observó a las 72 horas en respuesta a níquel.

La producción de glutatión a las 144 horas para hojas fue de 26.32 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS, siendo que para raíz el contenido de glutatión fue de 45.64 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Por otro lado, es importante mencionar que en ambos tejidos en control se observó un ligero contenido de glutatión siendo para hoja de GSH fue de 7.56 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS y para raíz de 3.96 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. (Figura 2.16).

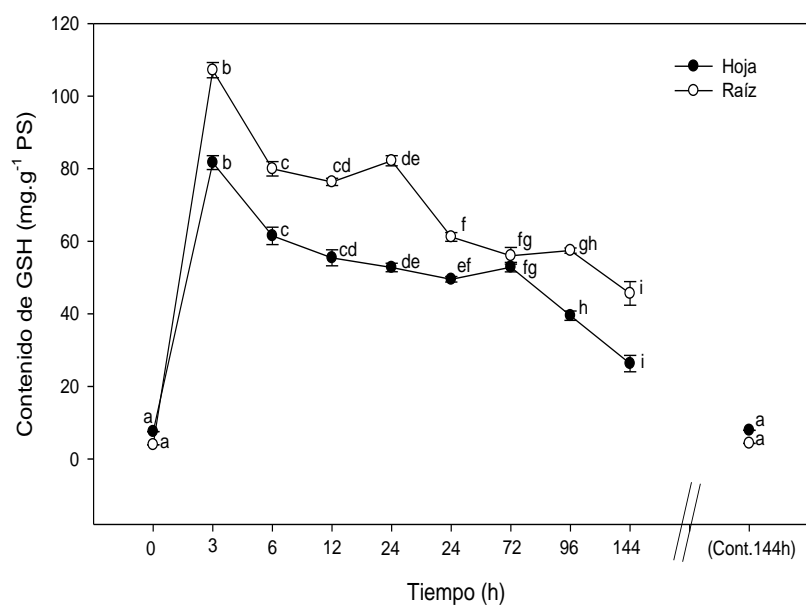


FIGURA. 2.16 Contenido de glutatión en tejidos de *S. minima* en respuesta a 40 μ M de níquel a diferentes tiempos de exposición. Las barras corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 tratamientos. Las letras en minúsculas indican la significancia estadística ($p \leq 0.05$).

2.19 DISCUSIÓN

2.19.1 EFECTO DE Ni EN LA MORFOLOGÍA Y CRECIMIENTO DE *S. minima*

En las respuestas morfológicas y de crecimiento las plantas de *S. minima* no presentaron síntomas visibles de daño, a tiempos cortos de exposición al níquel (0 hasta las 72 horas), sugiriéndonos por sus síntomas visuales y de crecimiento, que las plantas de *S. minima* presentan una tolerancia a 40 μM de níquel. Es bien sabido que el exceso del níquel, podría afectar negativamente el crecimiento y la morfología de las plantas (Zengin y Munzuroglu, 2005; Yan *et al.*, 2008), y que la reducción del crecimiento es uno de los efectos directos de toxicidad de Ni (Kovacevic *et al.*, 1999; Seregin *et al.*, 2004; Gajewska *et al.*, 2007; Nagajyoti *et al.*, 2010), y de otros metales pesados sobre el desarrollo de las plantas, ya que estos pueden alterar negativamente diversos procesos del crecimiento vegetal (Ewais, 1997; Sresty y Madhava, 1999; Milone *et al.*, 2003). Por lo tanto, estos parámetros (morfología y crecimiento), son utilizado para evaluar el grado de toxicidad del níquel (Shaw *et al.*, 2004; Yusuf *et al.*, 2011). En nuestros resultados observamos todo lo contrario, ya que las plantas de *S. minima* presentan un crecimiento en sus tejidos (hoja y raíz), hasta las 72 horas de exposición al níquel, donde podríamos concluir que el níquel no está produciendo daños en las plantas a las primeras horas ante la exposición, es decir, que en tiempos cortos el níquel parece inducir o promover el crecimiento de las plantas, esto puede ser debido a que el níquel, es esencial como un elemento traza para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, ya que es constituyente de algunas enzimas importantes, tales como la ureasa (Ciurli, 2001; Ling y Kao, 2007; Estrella *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los resultados de otros autores, ya que se reporta que el níquel produce síntomas de retraso o inhibición en el crecimiento, siendo que nosotros observamos un aumento de biomasa hasta las 72 horas de exposición al níquel, sin síntomas visibles de toxicidad. Por otro lado, Kramer *et al.*, (1997), evaluaron en plantas de *Thlaspi arvenses*, la respuesta morfológica y de crecimiento de las plantas a una concentración de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Ni, por siete días de exposición, donde ellos observan a partir del cuarto día de exposición al Ni una disminución de biomasa bien marcada, atribuyendo esta disminución a un daño morfológico, fisiológico y enzimático en las plantas expuestas a Ni. Otro de los estudios donde evaluaron el estrés por níquel fue el realizado por Shintinawy y Ansary (2000), donde evaluaron la respuesta del crecimiento en plantas de *Glicine max*, ante la exposición de 50 mM de Ni, observando una reducción en el crecimiento de la planta, desde el cuarto día de exposición, atribuyendo que 50 mM de Ni es tóxico para

las plantas de soja. Por otro lado, Bhardwaj *et al.*, (2007), evaluaron el crecimiento de la plántula *Zea mays*, ante la exposición a una concentración de 1.5 y 2.0 mM de Ni por seis días de exposición, donde ellos observaron en las plantas de maíz una disminución de biomasa, acompañada de una clorosis, siendo lo mismo que observamos en las plantas de *S. minima* a las 144 horas de exposición al níquel. Sin embargo, es importante enfatizar que la toxicidad por níquel está en función a la especie y la concentración al níquel, a las que las plantas sean expuestas (Gajewska y Sklodowska, 2007; Khellaf y Zerdaoui, 2010; Mishra y Dubey, 2011), ya que para *S. minima* pareciera ser que una concentración de 40 μM de Ni, hasta un tiempo de 72 horas de exposición no es tóxica para la planta. Sin embargo, en nuestro estudio observamos que la toxicidad del níquel, está en función al tiempo de exposición. Siendo que, a las 96 horas de exposición al níquel, las plantas de *S. minima* ya presentaban un estrés observado a través de una clorosis y disminución del crecimiento de las plantas, donde esta clorosis y disminución de biomasa fue más notoria a las 144 horas de exposición al níquel, lo cual también fue observado por Gajewska *et al.*, (2009), donde comentan que el grado de estrés está en función del elemento tóxico, del tiempo de exposición y a la cantidad del metal que ingresa en los tejidos de la planta. Por otro lado, en las plantas de *S. minima*, al máximo tiempo de exposición al Ni (144 horas), observamos una disminución en el tamaño de las hojas, al igual que raíces quebradizas. Esto también fue observado en plantas de *Brassica oleracea*, en presencia de 0.5 mM de Ni (Dan *et al.*, 2002). Por otra parte, Gopal *et al.*, (2002), observaron en plantas de *Vigna radiata* Linn una disminución en el tamaño de las hojas a una concentración de 1 mM de Ni, al sexto día de exposición, concordando con nuestros resultados obtenidos, ya que nosotros observamos una disminución en el tamaño de las hojas a las 144 horas de exposición al níquel. Con lo que respecta a las hojas, la coloración amarillenta que observamos, es característica de plantas con síntomas de clorosis (Chen *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2004; Tuma *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Jiang *et al.*, (2001), en plantas de *Zea mays* L., expuestas a una concentración de 10^{-5} M de cobre, observaron en las raíces una inhibición del crecimiento, concluyendo que esta disminución de las raíces pudiera ser resultado de una reducción en el proceso de división celular y del daño estructural o muerte de las células del meristemo apical. Nosotros no realizamos estudios más detallados, que nos pudiera decir más sobre la disminución observada en el crecimiento de los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, sin embargo, observamos una reducción en el tamaño de las raíces a las 144 horas de exposición al níquel, aunque no descartamos que pudiera deberse a algunos de los procesos antes mencionados por Jian *et al.*, (2001). Es importante enfatizar que a pesar de que observamos una

clorosis, y disminución en el crecimiento de las plantas de *S. minima* a las 144 horas de exposición al níquel, no observamos necrosis o en su caso muerte en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, sin embargo, no evaluamos tiempos posteriores a las 144 horas de exposición, donde posiblemente podríamos observar una necrosis en las plantas al ser expuesta a largos tiempos de exposición al níquel. Es importante mencionar que para poder tolerar tiempos largos de exposición al níquel, como en nuestro estudio donde se analizaron 144 horas de exposición, posiblemente pudiera deberse a que las plantas de *S. minima*, presentan una maquinaria desintoxicante eficiente para poder hacer frente al estrés en respuesta a metales pesados (Kupper *et al.*, 2001; Hall, 2002), donde sabemos que uno de los mecanismos que presentan estas especies hiperacumuladoras para disminuir el grado de toxicidad, en presencia de metales pesados es la quelación de estos iones metálicos, disminuyendo el grado de toxicidad, almacenándolo en el compartimento vacuolar y evitar que cause daño a nivel celular (Brooks, 1981; Kramer *et al.*, 2000; Persans *et al.*, 2001; Seregin y Ivanov, 2001; Estrella *et al.*, 2012).

2.19.2 *S. minima* COMO PLANTA HIPER-ACUMULADORA DE Ni

S. minima ha sido reportada como un helecho hiperacumulador de níquel (Fuentes *et al.*, 2014), además varios estudios previos indican que *S. minima* ha sido reportada como una planta hiperacumuladora de otros diferentes metales pesados como: Pb, Cd, As, Cr (Olguin y Ramos, 2002; Hoffmann *et al.*, 2004, Olguin *et al.*, 2007; Sinhei y Bianchini, 2015; Prado *et al.*, 2015). Nuestros datos confirman que *S. minima*, tiene la capacidad de acumular 10.7 mg g⁻¹ PS de níquel en una solución acuosa con una concentración inicial de 40 µM de Ni. Es importante mencionar que las plantas de *S. minima* registraron una toma del metal desde los primeros tiempos de exposición a las que las plantas fueron expuestas, incrementándose la toma del níquel con el aumento de los tiempos de exposición. Fue observado por Hoffman *et al.*, (2004), que plantas de *S. minima* acumulaban en sus tejidos Pb en presencia de concentraciones crecientes del metal (20 µM hasta 160 µM), donde observaron una toma rápida desde las primeras 6-12 horas de exposición. Por otra parte, en un estudio realizado por Paris *et al.*, (2005), en la especie *Pistia stratiotes*, en presencia de 1 ppm de Cd, los autores observaron una rápida toma del metal en los diferentes tejidos de la planta, desde las primeras 24 horas de exposición al Cd, con una toma del 50 % a las 24 horas de exposición al Cd y una toma lenta hasta concluir el experimento a las 144 horas de exposición. De acuerdo a nuestros resultados nosotros observamos en las plantas de *S. minima* una toma rápida de níquel en las primeras 24 horas de exposición, siendo que, a las 24

horas, *S. minima* registro una toma del 51%, esto con relación a la toma de níquel hasta las 144 horas de exposición. En otro estudio realizado para evaluar la eficiencia de *P. stratiotes* en la absorción de Cr, retaron a la planta a una concentración creciente de 0.5, 1 y 5 ppm de Cr, donde encontraron una remoción de aproximadamente 90% al concluir el experimento a los 5 días de exposición (Sen *et al.*, 1987). Schneider y Rubio, (1999), reportan una toma rápida en plantas acuáticas, debido a un mecanismo de absorción, tanto en hojas como en raíces. Por otro lado, como habíamos comentado anteriormente, las plantas de *S. minima* registraron una rápida toma del metal en las primeras 24 horas de exposición (5.4 mg g⁻¹ PS), con una posterior toma lenta de níquel hasta concluir el experimento a las 144 horas de exposición. Con respecto a la toma del níquel, observamos un patrón de toma bifásico, similar a lo reportado por otros autores trabajando con Pb, en la misma especie (Hoffmann *et al.*, 2004; Estrella, 2008; Alvarado *et al.*, 2016). Este proceso de toma del metal en dos fases también ha sido observado en términos de biomasa fresca y seca en cepas de *Paecilomyces lilacinus*, donde presentan con una rápida absorción de Pb en las primeras 6-12 horas de exposición y una segunda toma lenta de Pb en las siguientes horas de exposición, hasta las 144 horas (Zucconi *et al.*, 2003).

De igual manera, es importante mencionar que nosotros encontramos una mayor acumulación de níquel en las raíces que en las hojas de las plantas de *S. minima* en todos los tiempos de exposición al metal, similar a lo observado por otros autores Kaváčík *et al.*, (2009), en la especie vegetal *Matricaria chamomilla* ante la exposición de 120 μ M de Ni, observaron una mayor acumulación del níquel en raíces que en hojas, esto en todos los tiempos evaluados. Por otra parte, de acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que *S. minima* presenta un eficiente mecanismo de toma de níquel, ya que, tiene la capacidad de acumular desde las primeras tres horas de exposición, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento de las plantas, posiblemente en las primeras 48 horas de exposición las plantas podrían estar metabolizando el Ni, el cual le podría estar sirviendo en su crecimiento como lo observamos en el crecimiento de las plantas hasta las 72 horas de exposición al Ni. Por otra parte, es importante mencionar que la concentración de níquel en aguas superficiales según lo que reporta Alarcón *et al.*, (2001), se encuentra en concentraciones menores a los 10 μ g.L⁻¹ y en suelos el níquel se puede encontrar en concentraciones de 250 μ g.L⁻¹ (Carrillo *et al.*, 1995). Por lo tanto, podemos observar que la capacidad de toma de níquel en las plantas de *S. minima* sobrepasan las concentraciones de níquel encontradas tanto en aguas, como en suelos superficiales.

Donde las concentraciones pueden variar según las actividades antropogénicas realizadas en sus alrededores. Proponiendo a la especie de *S. minima* como una alternativa muy prometedora para poder utilizarla como parte del proceso de limpieza de aguas con níquel.

2.19.3 LA TOMA DE Ni EN PLANTAS DE *S. minima* PRODUCE DAÑOS EN LOS FOTOSISTEMAS (Pn, Fv/Fm) Y RENDIMIENTO CUANTICO (ΦPSII).

El nivel fotosintético de las plantas de *S. minima* ante la presencia de níquel no refleja daños en fotosíntesis (Pn), esto a tiempos cortos de exposición al níquel (3 hasta las 72 horas), donde podemos concluir que en fotosíntesis, de la planta de *S. minima* no está siendo afectado hasta las 72 horas de exposición, sin embargo, es evidente que a periodos largos de exposición al níquel (96 y 144 horas), la fotosíntesis en las plantas de *S. minima* está siendo afectada, con valores en Pn, de $0.43 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a las 96 horas de exposición al níquel. Aunque se sabe que los metales pesados, como es el caso del níquel, causan inhibición no específica de fotosíntesis, por varios medios, directos e indirectos, donde la disminución de la fotosíntesis está relacionada con alteración en la estructura del cloroplasto, inhibición de la síntesis de clorofila, desorden en el transporte de electrones, inhibición de la actividades de las enzimas del ciclo de Calvin, lo que conlleva a una deficiencia en el mecanismo de fijación del CO₂ un fuerte daño en el funcionamiento de Pn (Piccini y Malavolta, 1992; Banerjee *et al.*, 1997; Ewais, 1997; Seregin y Ivanov, 2001; Dan *et al.*, 2002; Bhupinder *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2011; Bhalerao *et al.*, 2015). El níquel, es capaz de afectar varios procesos metabólicos, como fotosíntesis, aún a bajas concentraciones en periodos largos de exposición, alterando la respiración y régimen de agua (Pandey y Sharma, 2002; Romanowska *et al.*, 2005). Es de interés comentar que nuestros resultados obtenidos indicaron que la fotosíntesis no fue afectada a periodos cortos con Ni sino que fue afectada en presencia de níquel a periodos largos de exposición, posiblemente como una forma de protección al mecanismo o maquinaria fotosintética, donde a las 144 horas de exposición las plantas de *S. minima* están realizando una respiración (liberando CO₂), el cual puede atribuirse a un posible daño en el transporte de electrones y posiblemente a la capacidad de fijación de carbono. Por otra parte, en un estudio realizado por Gopal *et al.*, (2002), en plantas de *Vigna radiata* Linn en presencia de 1 mM de Ni, observaron que el níquel produce daño en la membrana de los tilacoides y en la estructura del cloroplasto, llegando a la conclusión de que el níquel está afectando el transporte de los electrones al sexto día de exposición,

afectando la fotosíntesis. Por otra parte, Molas, (2002), observo en plantas de *Brassica oleracea* en respuesta de 40 mM de Ni a los 21 días de exposición al Ni, un daño en la fotosíntesis de las plantas, donde de acuerdo a sus resultados, el autor concluye que la fuerte dosis de Ni redujo la densidad de los electrones del estroma del cloroplasto y el número de grana afectando a la fotosíntesis. Por otra parte, una disminución del transporte de los electrones en los cloroplastos frente al estrés es característico en el PS I (Sheoran *et al.*, 1993; Xion *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Farooq *et al.*, 2013). Por otro lado, Xylander y Braune, (1994), evaluaron la respuesta del trigo en presencia de 1 mM de Ni, donde concluyeron que la disminución en la fotosíntesis, se debió a una afectación en el contenido de clorofila y por lo consiguiente al transporte de los electrones, observándose una disminución en la eficiencia fotosintética. Por otro lado, Ouzounidou *et al.*, (2006), evaluaron plantas de *Triticum aestivum* a 1 mM de Ni, encontrando daño en el PSII a las 96 horas de exposición al Ni, concluyendo que la eficiencia fotoquímica de las plantas es inhibida directamente en presencia de níquel. Sin embargo, en el presente estudio no evaluamos el contenido de clorofila en las plantas de *S. minima*, aunque, para saber cómo el níquel afecta de manera directa a los centros de reacción nosotros determinamos el índice de comportamiento (PI_{ABS}) y pruebas OJIP como estudios más detallados que nos puedan dar más información en este aspecto. Por otro lado, en un estudio realizado por Alam *et al.*, (2007), en las plantas de *Brassica juncea*, en respuesta a 100 mM de Ni, observaron que las plantas presentaron una disminución en el contenido de fotosíntesis, concluyen que esta disminución se correlaciona con el ingreso de Ni en la planta, donde la disminución de la eficiencia fotosintética se debió a un daño en los tilacoides y a una disminución en la captación de CO_2 . En plantas de *S. minima*, encontramos la misma respuesta, ya que, con el aumento de los tiempos de exposición al níquel, las plantas de *S. minima* registraron una mayor toma de metal en sus tejidos y con ello un mayor daño en la fisiología de la planta, como es el caso de fotosíntesis, observándose una reducción fotosintética del 64% al máximo tiempo de exposición al níquel (144 horas), en relación con las plantas control. La disminución progresiva en la tasa fotosintética en las hojas de *S. minima* correlacionó con la acumulación progresiva de níquel en sus hojas ($r^2 = 0.97$). En las últimas dos décadas, varios estudios informaron que la toxicidad de níquel se correlaciona con la reducción o inhibición de la fotosíntesis en las plantas (Tripathy *et al.*, 1981; Singh *et al.*, 1989; Boisvert *et al.*, 2007).

Por otra parte, comparamos en términos de las plantas expuestas al metal y la acumulación de metal en los tejidos, con la reducción de la fluorescencia de clorofila (F_v/F_m) y se observó, una caída de la fluorescencia muy marcada, esto en

comparación con las plantas control que crecieron en un rango óptimo de fluorescencia de clorofila de 0.81, siendo que los valores óptimos de Fv/Fm para una planta sana se encuentran entre 0.79 y 0.85 de Fv/Fm, (Maxwell y Johnson 2000; Kalaji *et al.*, 2014). Por otro lado, podemos ver que el daño en Fv/Fm está más afectado que en Pn, incluso en menor tiempo de exposición al níquel, siendo que a los tiempos de 24 y 48 horas las plantas ya se encuentran registrando un estrés en presencia del Ni, siendo más evidente este estrés a partir de las 96 y 144 horas de exposición al níquel, con valores de Fv/Fm de 0.52. Donde es posible que los niveles bajos de fluorescencia de clorofila en las plantas de *S. minima* se deban a un bajo contenido de clorofila, carotenoides, disminuyendo la captación de fotones, sugiriéndonos una disminución en el transporte de electrones en los tilacoides, de este modo afectando la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, afectado en el transporte de electrones, posiblemente debido a un bajo contenido de ATP y NADPH por la ineficacia de las reacciones que tienen lugar en la fase de luz y así afectando estos productos la fase de oscuridad, en el ciclo de Calvin (Krupa *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2016). Esta disminución en la relación Fv/Fm puede estar asociada con una reoxidación limitada de plastoquinona (QA), que también puede estar relacionada con posibles modificaciones en la actividad fotoquímica (Schansker *et al.*, 2005).

Nuestros resultados concuerdan con los siguientes autores, donde ellos igual observan una caída de la fluorescencia de clorofila, documentando que esta caída se debe a un daño oxidativo de las membranas del cloroplasto, realizando una inhibición de la biosíntesis de clorofila, esto ha sido bien documentados en respuesta a níquel (Nagajyothi *et al.*, 2009; Pandey y Singh, 2011; Talukdar, 2011). Por otra parte, Fabrizio *et al.*, (2015), al evaluar la fluorescencia de clorofila y a la par fotosíntesis en plantas de *Amarantus paniculatus* en concentraciones crecientes de níquel (0, 25, 50, 100 y 150 μM de NiCl_2), los autores reportaron un daño bien marcado en la fluorescencia de clorofila ante la exposición al níquel a partir de la concentración de 50 μM de Ni. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que la fluorescencia de clorofila es más susceptible a daños en sus centros de reacción. Por otra parte, la disminución progresiva de la fluorescencia de clorofila, al valor más bajo en las plantas de *S. minima* al máximo tiempo de exposición (144 horas), represento el 64%, esto en relación con las plantas control. Correlacionamos la fluorescencia de clorofila con la acumulación progresiva del níquel en sus hojas, observándose una muy buena correlación entre ambos parámetros de $r^2 = 0.97$. Es importante resaltar que, en nuestro estudio, la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) fue más susceptible en presencia al Ni, que fotosíntesis (Pn), donde el transporte de electrones en los tilacoides,

posiblemente sea el más afectado en respuesta a níquel, donde el flujo electrónico entre el fotosistema II (PSII) y I (PSI) pudiera verse alterado, al igual que el estado reductivo de los aceptores del PSI. Implicando que el estado redox de los aceptores del PSI pudiera limitar o en su caso alterar el transporte electrónico. Por otro lado, Schroder *et al.*, (1994), evaluaron plantas de *Spinacia oleracea* en presencia de 100 μM de CuSO_4 , encontrando que el cobre bloquea el transporte de electrones en diferentes sitios del fotosistema II, a nivel del centro de reacción, de la quinona (QB) y de la tirosina de la proteína D1.

En cuanto al rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦPSII), que mide la proporción de energía absorbida, dándonos una aproximación del transporte lineal de electrones en su función fotosintética (Stirbet *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Nosotros investigamos el efecto del níquel en plantas de *S. minima*. Observamos que a los primeros tiempos de exposición al níquel (24 a 48 horas), el daño en el transporte de los electrones no está siendo afectado en comparación con los tiempos más prolongados al metal (96 y 144 horas), observándose un gran contraste en la cinética del transporte de los electrones en la fluorescencia, lo que nos indica que a tiempos prolongados las plantas de *S. minima* podría estar sufriendo un daño muy marcado en sus propiedades estructurales y funcionales relacionados con la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm). Varios autores informan que lo que puede estar sucediendo es una inactivación de los centros de reacción del PSII, relacionado con el descenso del transporte de electrones, produciendo un fuerte daño en su mecanismo de regulación (Sersen *et al.*, 1998; Arora *et al.*, 2002), de tal manera que a tiempos muy pronunciados al níquel (144 horas) las plantas de *S. minima* pareciera no estar disipando el exceso de energía de las moléculas de clorofila, pero también que el transporte de electrones. Por otra parte, en un estudio realizado por Qufei *et al.*, (2009), en plantas de *Spirodela polyrrhiza* en presencia de Pb, observaron, una disminución en la eficiencia del transporte de los electrones, donde el complejo pigmento-proteína fue alterada, observándose este daño en el transporte de los electrones causando daño en la estructura y función de PS II. Esto nos podría llevar a pensar que a tiempos largos de exposición (96 y 144 horas), las plantas de *S. minima* están sufriendo este daño en el transporte de los electrones, donde posiblemente este daño en la disipación de la energía está siendo afectada, esto a la par con un daño directo en las proteínas fotosintéticas. Por otra parte, en un estudio realizado por Mazur *et al.*, (2016), en plantas de *Sinapis alba* L., evaluaron el grado de toxicidad de talio, a una concentración de 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de TI, observando una disminución sustancial de las proteínas del núcleo del fotosistema II

(PS II), esto además de una oxidación masiva de los pigmentos fotosintéticos, conllevando a las plantas a presentar un rendimiento cuántico bajo, en presencia del metal. Por otra parte, hay una gran cantidad de evidencias que indica un efecto directo de los metales pesados sobre las reacciones fotoquímicas. 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, el flujo de electrones fotosintéticos (Kalaji y Loboda, 2007; Maksymiec, 2007). Esto además de que ciertos iones metálicos (Cu, Cd, Pb Ni y Zn) afectan indirectamente a la fotosíntesis mediante la inhibición de las enzimas para la síntesis de la clorofila, RuBisCo y otras enzimas del ciclo de Calvin (Mishra y Dubey 2005; Parmar *et al.*, 2013). Por otra parte, en la curva bifásica de fluorescencia de clorofila observada nos sugiere un aumento de electrones en centro de reacción del PSII, siendo que este transporte de electrones se ve reducido en plastoquinona (QA) a plastocianina (QC), donde la plastoquinona no es capaz de transferir estos electrones (Strasser *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Cenkci *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2010; Perreault *et al.*, 2014). Este aumento de la acumulación de los electrones lo observamos aproximadamente en el tiempo $1e^{-3}$ (ms) en todos los tiempos en que las plantas fueron expuestas al níquel, lo que posiblemente se pudiera deber a una saturación de los electrones, donde podrían sufrir los centros de reacción un cambio estructural evitando que estos alcancen su máximo estado de oxidación y reducción en el número de centro de reacción. Sin embargo, es importante enfatizar que para tener una idea más clara de lo que está sucediendo en los centros de reacción ante la exposición al níquel en las plantas de *S. minima* faltarían aplicar más algoritmos a los datos obtenidos. El aumento de los electrones se ve reflejada a partir del tiempo de $1e^{-3}$ (ms) lo que nos reflejan una reducción en resto de la cadena de transporte de electrones después de que Q_A es reducido (Schansker *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Oukarroum *et al.*, (2015), en plantas de *Lemna gibba* L en respuesta a níquel ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) observaron este aumento de los electrones en los centros de reacción. Por otra parte, Wodala *et al.*, (2012), evaluaron en plantas de guisantes la energía fotoquímica ante la exposición a $50 \mu\text{M}$ de cobre y $5 \mu\text{M}$ de cadmio, donde ellos de igual manera observaron una disminución en el transporte de los electrones muy marcada en las plantas tratadas con ambos metales a las que las plantas fueron expuestas, esto en comparación con las plantas control.

Por otra parte, al evaluar el índice de rendimiento (PI_{ABS}), que mide la conservación de la energía de los fotones absorbidos por el PSII y la reducción de aceptores de

electrones inter-sistema, es un parámetro muy sensible para determinar el transporte de electrones. Pudimos observar que el transporte de los electrones no se ve afectado en las plantas de *S. minima* a tiempos cortos de exposición al níquel, donde podemos observar que el rendimiento cuántico obtenidos en el transporte de los electrones fue alterado desde las 12 horas de exposición al Ni a partir de esta hora, se puede suponer que los electrones de la cadena de transporte habían potencializado la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente O_2 , en presencia de iones metálicos, tales como Ni^{2+} , se pudo iniciar una serie de reacciones que resultaran en la formación de OH en la reacción de Haber-Weiss y otras especies destructivas, tales como lipoperóxidos (Bowler *et al.*, 1992). Las ROS, pueden ser altamente destructivas, ya que pueden inducir lesiones graves en varios componentes celulares, incluyendo los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que pueden conducir a varios tipos de alteraciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que afectan crecimiento de las plantas y el desarrollo de la misma. Por otra parte, Cuchiara *et al.*, (2015), estudiaron en el índice de rendimiento fotosintético en plantas de patata en presencia de 0.123 y 0.164 mM de $CuSO_4$, donde observaron que el Pi_{ABS} fue alterado por altas concentraciones de cobre, concluyendo que los metales pesados en este caso el cobre tiene efectos negativos sobre el transporte de electrones, incluso en tiempos cortos de exposición. Ya que al igual que nosotros, ellos observaron una caída de Pi_{ABS} , desde las 12 horas de exposición al metal. Por otro parte, Nagy y Proctor, (2001), evaluaron en plantas de *Cochlearia ssp*, el rendimiento cuántico en presencia de 10 y 25 $\mu mol L^{-1}$ de Fe y Ni, donde observaron que el rendimiento cuántico es muy susceptible en presencia de metales pesados. En un estudio realizado por Mathur *et al.*, (2016), en plantas de *Triticum aestivum* a concentraciones crecientes de Cr, observaron que el PI_{ABS} disminuyo alrededor de 35, 50 y 54% con 100, 200 y 300 μM de Cr, respectivamente, al séptimo día de exposición. Esto demuestra que las reacciones fotoquímicas fueron afectadas con el aumento de las concentraciones Cr, en su caso nosotros observamos una disminución con el aumento de los tiempos de exposición al Ni. Sin embargo, ellos evaluaron los centros de reacción para tener una idea más clara de la disminución fotoquímica. En un estudio realizado Mallick y Mohn, (2003), evaluaron la toxicidad fotoquímica del fotosistema II (PSII), en la micro-alga *Scenedesmus obliquus*, en presencia de diferentes metales pesados (Cu, Cr, Ni, Cd y Zn), donde no solo encontraron afectaciones en la fluorescencia de clorofila, sino también en el rendimiento cuántico y por lo consiguiente en el transporte de los electrones en presencia de los metales pesados, concluyendo que Fv/Fm es una poderosa herramienta para la investigación del estrés por metales pesados.

2.19.4 EFECTO DEL Ni SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANAS (MDA) Y EL CONTENIDO DE PROLINA EN PLANTAS DE *S. minima*

El nivel del contenido de malondialdehído (MDA), ha sido considerado como indicador del estrés oxidativo, en respuesta a metales pesados, como sabemos MDA es un producto de peroxidación de lípidos (Pandey y Sharma, 2002; Gajewska y Skłodowska, 2006; Yilmaz *et al.*, 2011). Los cambios observados en la peroxidación lipídica nos indican cambios en el contenido de MDA. Cuando las plantas de *S. minima* fueron sometidas a un estrés oxidativo ante la exposición a níquel, se observó que el contenido de MDA incremento desde tiempos muy cortos, presentándose de manera ascendente hasta concluir las 144 horas de exposición, indicándonos que esta acumulación de MDA en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima* se presentó significativamente con el aumento de los tiempos de exposición, ciertamente este aumento del contenido de MDA en los tejidos de la planta podría conllevar a alteraciones en la funcionalidad de las membranas y el equilibrio de la misma (Gajewska y Skłodowska, 2006; Gajewska *et al.*, 2007; Llamas *et al.*, 2008).

El níquel, como otros metales pesados, podría activar una vía de señalización de estrés mediada por ROS (Pandolfi *et al.*, 1996; Dat *et al.*, 2000), provocando la alteración del estado oxidativo de las células vegetales, conllevando a una desnaturalización de membrana y proteínas (Maheshwary *et al.*, 2009). La inducción de una ruta de señalización de estrés oxidativo podría explicar el aumento en el contenido de ROS, según lo observado por Fabrizio *et al.*, (2015), donde observaron en plantas de *Amaranthus* en presencia de 150 μM de NiCl_2 , un daño considerable a través de la peroxidación de los componentes lipídicos de las membranas. Por su parte Wang *et al.*, (2011), evaluaron en plantas de *Medicago sativa* en presencia de 100 μM de Cu, una pérdida de la integridad de la membrana celular, relacionada con una acumulación de ROS y peroxidación de lípidos. Aunque en las plantas de *S. minima*, en respuesta a Ni no evaluamos los contenidos de ROS, estamos casi seguros que existe una fuerte relación del contenido de ROS con la peroxidación lipídica y por lo consiguiente una alta correlación en la toma de níquel tanto en MDA, como en el contenido de ROS.

Por otra parte, Baccouch *et al.*, (2001), reportaron en un estudio en plantas de *Zea mays* expuesta a 250 μM de NiCl_2 , que Ni produce un estrés oxidativo, esto

observándose en la respuesta significativa en la peroxidación lipídica de la planta, donde el contenido de MDA se disparó, con el aumento de los tiempos de exposición al níquel, muy similar a lo observado en nuestros resultados. Sin embargo, es importante mencionar que en nuestros resultados observamos significativamente un mayor contenido de MDA a los máximos tiempos de exposición (96 y 144 horas) en raíces que, en hojas, similar a lo reportado por Cardoso *et al.*, (2016), donde ellos observaron en *Crotalaria juncea* ante la exposición al níquel el aumento de la peroxidación lipídica en membranas, significativamente mayor en raíces que en hojas. Este aumento significativo en la peroxidación lipídica de membrana en las raíces, también fue observado en plantas de *Lemna gibba* en presencia de 20 mg L⁻¹ de Ni (Yilmaz y Parlak, 2011). En nuestros resultados observamos un incremento ascendente en el contenido de MDA, hasta el máximo tiempo de exposición al níquel en raíces, que fue del 86 % en relación con las raíces control, siendo que para el caso de las hojas al máximo tiempo de exposición observamos un incremento del 77 % en el contenido de MDA en relación con las hojas control.

Por otra parte, sabemos que prolina es uno de los solutos compatibles que se acumula en mayor cantidad en condiciones de estrés, comparado con otros aminoácidos, lo que indica que en estas condiciones es posible que la prolina sea sintetizada en células fuente y se transporta a tejido de demanda, conocido como zona de estrés, usando energía proporcionada por compuestos orgánicos (Hare *et al.*, 1997). De acuerdo a los resultados obtenidos en el contenido de prolina en las plantas de *S. minima* en respuesta al níquel, nos sugieren que este osmolito podría tener un papel importante en la osmoregulación en las plantas de *S. minima* en presencia de 40 µM de níquel, donde la síntesis de prolina pudiera, estar implicada en la tolerancia al estrés por déficit de agua (Hare y Cress, 1998), salinidad (Rhodes *et al.*, 2002; Munns, 2005), bajas temperaturas (Naidu *et al.*, 1991). Además de actuar como osmolito para el ajuste osmótico, prolina contribuye a la estabilización de sub-estructuras celulares, como por ejemplo membrana y proteínas. Por otro lado, el papel osmoregulador de prolina en respuesta al estrés por níquel ha sido bien documentado (Pandey y Sherman, 2002; Gajewska y Sklodowska, 2006). Al igual que la respuesta de prolina en otros metales pesados como es el caso de Alia y Saradhi, (1991), donde ha estudiado el contenido de prolina en plantas de *Cajanus cajan* y *Vigna mungo* en respuestas a Cd, Co, Zn y Pb, encontrando un aumento del contenido de prolina con el aumento de los tiempos de exposición. Por otro lado, Kastori *et al.*, (1992), han evaluado el contenido de prolina en plantas de *Helianthus annuus* en respuesta a Pb, Cd, Cu y Zn. Siendo que Bassi y Sharma, (1993), han evaluado el contenido de prolina en plantas

de *Triticum aestivum* en respuesta Zn y Cu. Por otra parte, el contenido de prolina observado en los diferentes tejidos de las plantas de *S. minima*, en presencia de 40 μM de níquel, se presentó de manera ascendentes con una acumulación significativa desde el primer tiempo de exposición al cual las plantas de *S. minima* fueron expuestas para este experimento (24 horas). En nuestros resultados pudimos observar que el contenido de prolina fue significativamente mayor en raíces que en hojas en todos los tiempos de exposición al que las plantas fueron expuestas al níquel. En un estudio realizado por Bassi y Sharma, (1993), en plántulas de *Triticum aestivum*, al ser expuestas a una concentración de 10 ppm de Zn, observaron que el contenido de prolina fue significativamente mayor en raíces que en hojas, donde su aumento fue progresivamente mayor de acuerdo al tiempo de exposición. El patrón en el contenido de prolina fue muy similar al que nosotros observado en las plantas de *S. minima*, siendo que observamos un mayor contenido de prolina en las raíces en todos los tiempos evaluados y un aumento significativo en el contenido de prolina en los diferentes tejidos de *S. minima*, con el aumento de la concentración interna de níquel en la planta. Este aumento significativo en el contenido de prolina también fue observado por Karimi *et al.*, (2015), en plantas de *Cynara scolymus* en presencia de diferentes concentraciones de Pb (100 y 150 μM). En nuestro estudio posiblemente este aumento significativo del contenido de prolina en los tejidos de las plantas de *S. minima* en respuesta a níquel, esté involucrado en mantener la turgencia celular o equilibrio osmótico, al igual que podría estar involucrado en contribuir a la estabilización de las estructuras subcelulares de membranas y proteínas, al igual que esté involucrado a eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS), durante el estrés osmótico al que las plantas sean sometidas, donde los niveles excesivos de ROS, dan como resultado daño oxidativo a las plantas, por ejemplo, daño en los ácidos nucleicos, la oxidación de proteínas, lípidos y la degradación de los pigmentos fotosintéticos (Schützendübel *et al.*, 2002; Mourato *et al.*, 2012; Zarei *et al.*, 2012; Sreekanth *et al.*, 2013). Por otro lado, los informes indican que prolina es responsable de barridos de ROS y otros radicales libres (Bohnert, 1995; Okuma *et al.*, 2004; Chen y Dickman, 2005). En un estudio realizado por Cuin y Shabala, (2007), en plantas de *Arabidopsis thaliana*, en presencia de 5 mM de cobre, donde las plantas estuvieron expuestas al Cu durante una hora de exposición, para posteriormente aplicar prolina de manera exógena, donde los autores observaron una reducción muy importante en los niveles de ROS en las plantas. La capacidad de limpieza antioxidante de prolina podría ayudar a mantener el equilibrio original entre la producción y la disminución de las especies reactivas de oxígeno, restableciendo así la homeostasis redox. Sin embargo, cuando las plantas son sometidas a concentraciones altas de metales

pesados y a largos tiempos de exposición, es posible que esta homeostasis se salga de control, produciendo muerte celular (Polle y Rennenberg, 1993; Vangronsveld y Clijsters, 1994; Weckx y Clijsters, 1997).

2.19.5 EFECTO DEL Ni EN POTENCIALES: Ψ_w , Ψ_π EN PLANTAS DE *S. minima*

El estado hídrico (Ψ_w), 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). Por lo tanto, es virtualmente imposible pormenorizar la totalidad de los procesos que son afectados por el estrés en presencia de níquel. Sin embargo, decidimos evaluar el potencial hídrico en las plantas de *S. minima* en presencia de 40 μM de níquel, donde los datos obtenidos al evaluar el potencial hídrico (Ψ_w), nos sugieren que el Ψ_w se ve afectado a tiempos cortos de exposición, donde hasta cierto punto, el níquel, podría estar afectando la membrana de las raíces, esto conduciendo a una limitación en la toma del agua en el medio. Muchos autores han informado en diferentes estudios que el Ni induce disminución en el contenido de agua (Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993; Molas, 1997; Kevresan *et al.*, 1998; Schickler y Caspi, 1999; Pandey y Sherman, 2002; Gajewska y Skłodowska, 2006). Por otra parte, Bishnoi *et al.*, (1993), informaron en un estudio realizado en plantas de *Triticum aestivum*, después de cuatro días de exposición a una concentración de 10 mM de Ni, que las plantas de trigo, presentaron una disminución en el contenido del 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 las plantas. Posiblemente los valores tan negativos que observamos en el potencial hídrico en las plantas de *S. minima* en presencia de níquel se deba, hasta cierto punto a una limitación de la toma del agua en el medio, como consecuencia a la exposición a largos tiempos al metal, tal como lo reporta Bishnoi *et al.*, (1993). En un estudio realizado por Llamas *et al.*, (2008), en plantas de arroz ante la presencia de 0.5 mM níquel, los autores observaron alteraciones y desbalance en el contenido del agua en las raíces, de las plantas, concluyendo que las relaciones hídricas en la planta están siendo afectadas ante la presencia de Ni. Por tal motivo Jones *et al.*, (1988), han utilizado la disminución del agua como un indicador de la toxicidad por níquel, ante un posible ajuste osmótico,

previo estudio fue realizado en plantas de *Betula papyrifera* Marsb en presencia de 85 μM de Ni a 21 semanas de exposición. En otro estudio realizado por Singh y Tewari, (2003), evaluaron las plantas de *Brassica juncea* en presencia de 500 ppm de Cd, donde observaron una importante acumulación de prolina desde el primer tiempo de exposición al Cd, donde ellos concluyen que la rápida respuesta de este osmolito es un indicador de estrés hídrico. De acuerdo a los resultados obtenidos en el potencial hídrico en las plantas de *S. minima* podemos concluir que las plantas, en efecto están sufriendo un estrés hídrico en presencia de 40 μM de Ni. Por otro lado, con la finalidad de conocer que está pasando en el potencial hídrico de las plantas decidimos evaluar a la par el potencial osmótico ($\Psi\pi$) en las plantas de *S. minima*. Donde observamos, una caída muy rápida en el potencial osmótico a partir de las 3 horas de exposición al níquel. Las plantas de *S. minima* podrían estar realizando un ajuste osmótico, siendo que este ajuste osmótico se da cuando, hay un aumento en el número total de moléculas osmóticamente activas, o con el aumento de otros compuestos que podrían participar en la osmoregulación (prolina, glicina betaína, manitol, poliamidas, trehalosa, potasio, etc.), por tal motivo decidimos evaluar a la par el contenido de prolina en las plantas de *S. minima*, como un posible mecanismo de osmoregulación bajo el estrés por níquel. Donde observamos un aumento significativo en el contenido de prolina desde el primer tiempo de exposición al que las plantas fueron expuestas al níquel, lo que nos indica que el contenido de prolina efectivamente está realizando un ajuste osmótico en las plantas de *S. minima*, ya que desde el primer tiempo de exposición observamos un potencial osmótico muy negativo con una caída bastante rápida desde las tres horas de exposición al níquel, lo que nos ayuda a justificar el papel que desempeña prolina, ante un ajuste osmótico en las plantas de *S. minima* en presencia de níquel. La función principal de los solutos compatibles, como es el caso de prolina, es evitar la pérdida del agua y de cierto modo mantener la turgencia celular, pero también tiene otras funciones como son, protección de enzimas, protección en la integridad de la membrana, además de ayudar a la eliminación de radicales libres bajo condiciones de estrés, ya que prolina puede funcionar como osmoprotector y osmorregulador (Sharmila y Pardha, 2002; Pavlíková *et al.*, 2007). Por otra parte, otros autores han informado que varias especies de plantas cuando son sometidas a níquel presentan estrategias adaptativas involucradas en un ajuste osmótico (Severne, 1974; Bhatia *et al.*, 2005). Donde posiblemente la rápida respuesta de aumento en el contenido de prolina que observamos en las plantas de *S. minima*, se deba a un ajuste osmótico en presencia de níquel. En un estudio realizado por Mohammad *et al.*, (2009), evaluaron el papel de prolina, ante un posible ajuste osmótico en plantas de *Nicotiana tabacum* en presencia de 100 M de Cd, donde los autores confirman la

importancia de este osmolito como osmoregulador en las plantas de tabaco en altas concentraciones de cadmio. Por otro lado, los resultados obtenidos en el potencial osmótico nos podrían indicar que las plantas de *S. minima* están realizando un ajuste osmótico para mantener el potencial de turgencia y evitar plasmólisis y muerte celular. Morgan, (1984), indica que el mantenimiento de la turgencia en el ajuste osmótico es una importante adaptación fisiológica de las plantas para minimizar los efectos perjudiciales del déficit hídrico. En las correlaciones entre la toma del níquel, contra los potenciales (Ψ_w , Ψ_π), en las plantas de *S. minima* encontramos altas correlaciones, por ejemplo, la toma del metal, contra el potencial osmótico, encontramos una correlación de $r^2 = 0.98$ y para la toma de Ni, contra el potencial hídrico encontramos una correlación de $r^2 = 0.95$.

2.19.6 EFECTO DEL Ni EN EL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES Y EN EL CONTENIDO DE GSH EN PLANTAS DE *S. minima*

Está bien documentado que el glutatión (GSH) es un metabolito considerado como uno de los mecanismos de defensa más importante contra ROS, inducidas por la presencia de metales pesados, además de que GSH está involucrado en funciones vitales como el transporte y almacenamiento de azufre reducido, la protección contra metales tóxicos y desintoxicación de xenobióticos (Mittler, 2002; Blokhina *et al.*, 2003). Además de que GSH está implicado en mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo (Verbruggen *et al.*, 2009). Por tal motivo evaluamos el contenido de glutatión como un posible mecanismo de desintoxicación en las plantas de *S. minima* en respuesta a níquel. Donde observamos en nuestros resultados un incremento en el contenido de GSH, al igual que proteínas totales en ambos tejidos de la planta (hoja y raíz), al primer tiempo de exposición (3 horas), como una posible respuesta a algún mecanismo de desintoxicación, ya que el aumento de GSH, como el de las proteínas totales, se observó desde el primer tiempo de exposición al níquel, lo que nos lleva a pensar que GSH podría jugar un papel importante en el mecanismo de desintoxicación celular en las plantas de *S. minima*. Por otra parte, Wang *et al.*, (2004), evaluaron el contenido de GSH en plantas de *Brassica juncea*, a una concentración de 16 μM de cobre, aun tiempo de exposición de 96 horas, observando un aumento de GSH, desde el primer tiempo de exposición (3 horas), con un contenido de GSH en hojas de 42-68 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ y en raíces un contenido de GSH de 86-110 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Por otro lado, el comportamiento de GSH fue muy similar al que observamos en las plantas de *S. minima*, con un incremento en el contenido de GSH en los diferentes tejidos de la planta (hoja y raíz), desde el primer tiempo de exposición al Ni. Draskiewicz *et al.*,

(2003), evaluaron la respuesta antioxidante de *Arabidopsis thaliana*, en respuesta a concentraciones crecientes de Cu (50 y 100 μM), a diferentes tiempos de exposición (1, 3 y 7 días), donde observaron un alto contenido de GSH, al tercer día de exposición, presentándose de manera descendente hasta al séptimo día de exposición al Cu. Los valores de GSH en hojas al tercer día de exposición entre 100 y 200 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, similar a lo que observamos en nuestros resultados. Por otro lado, Shanker *et al.*, (2003), evaluaron el contenido de GSH en plantas de *Vigna radiata* L., a una concentración de 50 M de Cr, a diferentes tiempos de exposición (4, 12, 24 y 96 horas), donde observaron un incremento en el contenido de GSH desde el primer tiempo de exposición (4 horas), con una disminución a partir de las 24 horas de exposición, confirmando el papel antioxidante de GSH, en la eliminación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Por otro lado, sabemos que la biosíntesis de GSH juega un papel fundamental en la tolerancia al estrés oxidativo en las plantas expuestas a Ni (Freeman *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2012) y a otros metales pesados (Singh *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2007; Verbruggen *et al.*, 2009; Gill y Tuteja, 2010; Estrella *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013). Por otro lado, pudimos observar que el contenido de GSH, como el de proteínas totales disminuyeron con el aumento de los tiempos de exposición, siendo que para el caso de GSH, posiblemente se deba a que GSH es el antecesor de la síntesis de fitoquelatinas (PC) llevándonos a pensar que esta disminución en el contenido de GSH a tiempos largos de exposición, se pudiera deber a que se pudiera estar sintetizando fitoquelatinas en las plantas de *S. minima* como posible mecanismo de desintoxicación citosólica ante la presencia de níquel, lo cual nos podríamos apoyar de otros estudios donde confirman que la disminución del contenido de GSH se debe a que es el precursor de las PCs (Grill *et al.*, 1989; Zenk, 1996; Di *et al.*, 2005; Sarry *et al.*, 2006; Kieffer *et al.*, 2008; Hradilová *et al.*, 2010; Semane *et al.*, 2010; Ahsan *et al.*, 2012; Estrella *et al.*, 2012). Por otro parte Shgerri *et al.*, (2004), evaluaron el contenido de GSH, en plantas de *Raphanus sativus*, expuestas a 15 μM de Cu por 10 días de exposición, observando que los niveles de GSH se presentaron de manera descendente como el aumento de los días de exposición al Cu, concluyendo que esta disminución en el contenido de glutatión, se debe al incremento de la biosíntesis de fitoquelatinas en la planta.

Por otro lado, sabemos que las proteínas participan en diferentes procesos biológicos como pudiera ser metabolismo, transporte, regulación de procesos biológicos, homeostasis redox y respuesta al estrés (Wang *et al.*, 2004; Ahsan *et al.*, 2008; Kieffer *et al.*, 2009; Hradilova *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010; Sharmin *et al.*, 2012). Por tal motivo evaluamos el contenido de proteínas totales, con el fin de saber el contenido de

proteínas que se pudieran estar expresando en las plantas de *S. minima* en respuesta a Ni. Sin embargo, para conocer que proteínas pudieran estarse expresando en los diferentes tejidos de la planta faltaría hacer estudios más rigurosos como pudiera ser el de proteómica, donde sabemos que la regulación de las proteínas ha sido bien documentada en estudios proteómicos en respuesta a metales pesados (Ahsan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Por otra parte, Kieffer *et al.*, (2008), evaluaron la expresión de las proteínas en plantas de *Populus alba* en presencia de 20 M de Cd, donde observaron, que el contenido de proteínas se presentó de manera descendente con el tiempo de exposición a la que las plantas fueron expuestas, concluyendo que esta disminución de las proteínas se debió a que las proteínas fueron requeridas para hacer frente al estrés oxidativo en las plantas de álamo en presencia del Cd. Por otra parte, Hernández, (2001) en un estudio realizado en plantas de avena sativa expuestas a 10 ppm de cadmio, observaron un aumento por encima del 50% del contenido de proteínas totales en las plantas tratadas con el metal, en comparación con las plantas control. De acuerdo a los resultados obtenidos los autores hacen énfasis a que el aumento de las proteínas totales se encuentra fuertemente relacionado con algún tipo de respuesta que las plantas están presentando para hacer frente al estrés al que han sido sometidas.

En cuanto a la participación de las proteínas en la tolerancia a metales pesados Heckathorn *et al.*, (2004) observaron que el efecto del Pb y del Ni en dos variedades de *Agrostis stolonifera* produjeron un mayor contenido de proteína, donde de acuerdo al autor, estos resultados muestran una función específica de protección de las proteínas frente al estrés causado por metales pesados en planta. Por otra parte, Hussain *et al.*, (2013) observaron algo similar a nuestros resultados, ya que ellos identificaron una reducción de proteínas totales en plantas de *Zea mays* al ser sometidas a una concentración de 200 mM de nitrato de plomo luego de estar expuesta a 14 días de evaluación, en comparación con las plantas control. Los autores concluyen que la presencia de plomo en la planta de maíz, no solo afecta el contenido de proteínas totales, sino también afecta a la fisiología de la planta, al igual que al crecimiento de la misma, atribuyéndole que esto posiblemente esté relacionado con un daño directo en la síntesis del ADN. Por su parte, Maitra y Mukherji, (1977) en cultivos de arroz demostraron que este efecto podría ser explicado por la considerable reducción de la síntesis de ADN y ARN, de las plantas sometidas a concentraciones crecientes de plomo.

2.20. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo indican que la captación de níquel provoca daño inmediato en la fisiología de la planta, después de hiperacumular $6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS de Ni, que es a partir de las 72 h de exposición.

Altas concentraciones de Ni provocan daño en la permeabilidad de la membrana, particularmente en las raíces, fue seguido por una disminución adicional en la fotosíntesis, que posiblemente esté relacionado con un cierre estomático inducido por Ni, reduciendo la disponibilidad de CO_2 , además de un posible daño en el transporte de los electrones.

La disminución de crecimiento en la planta, posiblemente se deba a un incremento en la tasa respiratoria que posteriormente conllevo a una pérdida de biomasa y una consistencia frágil de las plantas. En cuanto a los síntomas de toxicidad observados (a partir de las 72 h), podría ser resultado de muerte celular a periodos largos de exposición al Ni.

El Ni produjo efecto negativo en el contenido del agua en las plantas. Presentando algún tipo de daño en las membranas (posiblemente en raíces), limitando la toma del agua en el medio como un posible mecanismo de las plantas para contrarrestar el daño por níquel.

El aumento del potencial osmótico de las plantas podría deberse a que prolina pudiera estar jugando un papel importante (ajuste osmótico), evitando una plasmólisis, permaneciendo turgente las células de la planta ante periodos largos de exposición al Ni.

El aumento del contenido de proteínas y glutatión juegan un papel importante, como mecanismos de tolerancia de las plantas de *S. minima* en respuesta al Ni. En cualquiera de los casos, se requieren más estudios para comprender mejor la complejidad de los efectos de los metales sobre procesos fisiológicos.

CAPITULO III. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de la presente tesis, corroboran que *S. minima* es capaz de tomar una gran cantidad de níquel en sus tejidos, principalmente en sus raíces. Presentándose una toma bifásica, con una primera toma rápida (a partir de las 3 h de exposición, Figura 2.2) seguida de una toma lenta y más tardía (después de las 12 h) hasta concluir el experimento 144 h.

Nuestros datos fisiológicos indican que las plantas de *S. minima* no manifiesta una afectación a tiempos cortos de exposición a Ni (3-24 h). Sin embargo, a partir de las 72 horas de exposición al Ni, se observó una disminución en la eficiencia de flujo de fotones en fotosistema II, alteración en las relaciones hídricas (Ψ_w , Ψ_π), peroxidación lipídica (posiblemente daño en membrana), a tiempos largos de exposición, observándose una alta correlación entre el grado de daño fisiológico, con el contenido interno del metal, sobre todo cuando se incrementa el contenido interno de níquel en las plantas de *S. minima* (de 4 mg.g⁻¹ PS de Ni). A concentraciones menores a los 4 mg.g⁻¹ PS de níquel las plantas de *S. minima* no presentan alteraciones en su fisiología y es importante mencionar que esta toma de los 4 mg.g⁻¹ PS de Ni lo registra a las 24 h de exposición.

De acuerdo a los datos obtenidos nos atrevemos a concluir, que después de las 24 h de exposición al Ni, las plantas de *S. minima* empiezan a percibir el estrés en respuesta al metal. Siendo más evidente este estrés a las 72 horas de exposición, registrando una toma del metal por encima de los 6 mg.g⁻¹ PS de Ni. Sin embargo, el estrés es más evidente a las 96 y 144 h de exposición.

Los metales pesados 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), alteraciones en las relaciones hídricas, acompañado de una degradación de

proteínas, donde las plantas están equipadas con un repertorio de mecanismos para contrarrestar la toxicidad de metales pesados.

Los elementos claves de estos son los metales quelantes, como es el caso del Ni, que forma el complejo metálico del glutatión (GSH) o las fitoquelatinas (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. Los compuestos no sintetizados enzimáticamente tales como la prolina (Pro) son capaces de fortalecer la capacidad de desintoxicación del metal de las enzimas antioxidantes intracelulares (Figura 2.17). Por lo que las plantas de *S. 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 Ni.

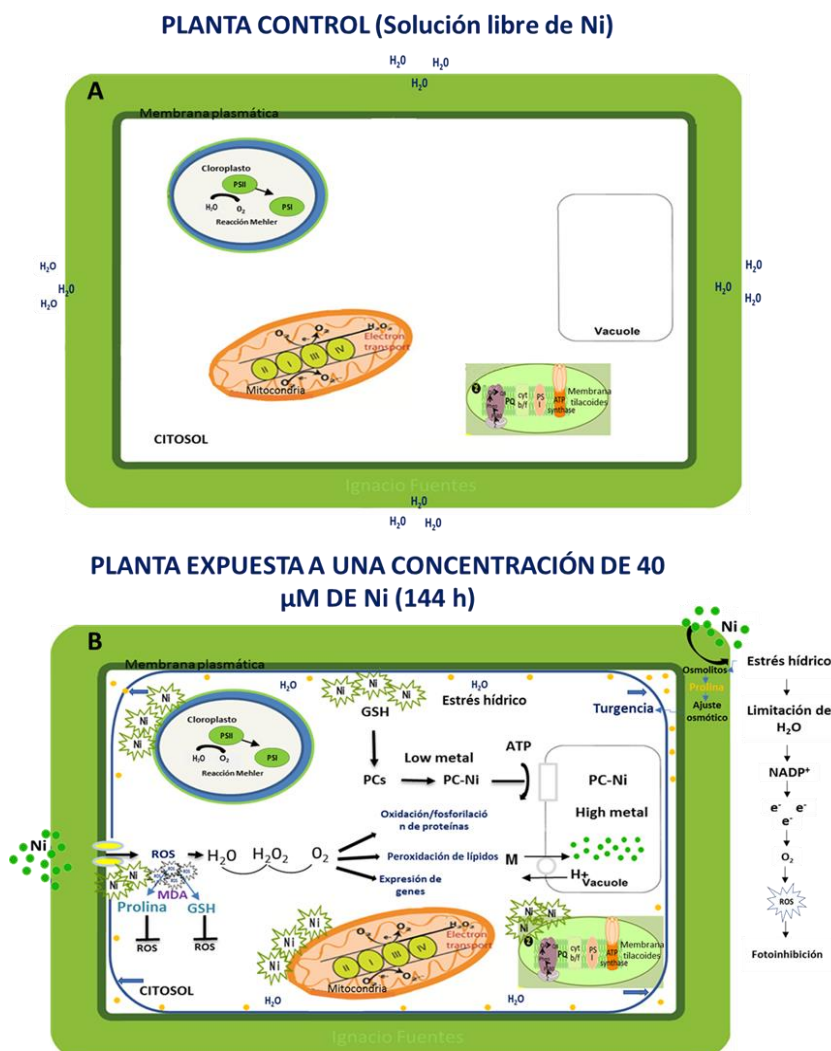


Figura 2.17 Modelo propuesto de la respuesta fisiológica y bioquímica de *S. minima* en respuesta a níquel. En (A) se presentan plantas control sin estrés alguno. En (B) se presentan los cambios fisiológicos y bioquímico de las plantas de *S. minima* en respuesta a 40 μM de Ni por un tiempo de exposición de 144 horas.

3.2. CONCLUSIONES

- En conclusión *S. minima* Baker es un helecho hiperacumulador de níquel, ya que nuestros resultados indican que es capaz de bioacumular altas cantidades de níquel en sus tejidos, logrando registrar una toma de metal de 10.7 mg.g^{-1} PS. Estas plantas tienen un factor de bioconcentración de 4,496.
- En la respuesta morfológica pudimos observar que las plantas de *S. minima* ante la exposición a una concentración de $40 \mu\text{M}$ de Ni, a tiempos de 3 hasta 48 horas, no presentaron algún síntoma de daño aparente ni en hojas ni en raíces (imagen digital). Se presentó una ligera clorosis hasta las 96 horas de exposición. Sin embargo, se pudo observar que, a las 144 horas, las plantas de *S. minima* presentaron una necrosis parcial, lo que nos ayuda a concluir que las plantas presentan una alta tolerancia al níquel.
- En relación a la toma del metal pudimos apreciar que *S. minima*, registro una alta toma de níquel, presentando una alta tolerancia, ya que por debajo de una concentración interna de 4 mg.g^{-1} PS de Ni, las plantas no presentan daños de toxicidad aparentemente, ni afectaciones a nivel fisiológico a tiempos menores de 48 horas de exposición. Observándose una alta correlación entre algunos parámetros fisiológicos, con el contenido interno del metal.
- Fisiológicamente, las plantas de *S. minima* no presentan una disminución en la eficiencia de flujo de fotones en fotosistema II, ni alteración en las relaciones hídricas (ψ_w , ψ_π), ni peroxidación lipídica, y por lo consiguiente daño en membrana, a tiempos cortos de exposición a Ni. Sin embargo, a tiempos largos de exposición (144 horas), si presentan afectaciones negativas en los parámetros anteriores, observándose una alta correlación entre el grado de daño fisiológico, con el contenido interno del metal.
- Los datos obtenidos en MDA no nos refleja el daño presente en membrana de las plantas de *S. minima* ante la exposición al níquel, en tiempos cortos de exposición, pero si a tiempos más largos (48 y 72 horas), sugiriéndonos que, a tiempos prolongados al metal, las plantas pueden estar sufriendo un estrés

- oxidativo, conllevando posiblemente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mismas que se podrían estar contrarrestando con el aumento significativo de prolina y GSH (a tiempos de 96 y 144 horas de exposición).
- El contenido de GSH y proteínas parecen, tener una respuesta importante en los mecanismos de desintoxicación de las plantas de *S. minima* ya que la síntesis de ambas, presentan una alta correlación con la concentración interna del níquel en la planta. Pero hace falta más análisis al respecto.
- A tiempos cortos (hasta 48 horas) de exposición a Ni, las plantas parecen no tener síntomas de estrés por este metal, es decir, las plantas no muestran daño ni en apariencia en diversos parámetros de crecimiento y fisiológico, por lo que se muestra tolerancia a este metal.

3.3. PERSPECTIVAS

A partir del estudio y discusiones presentes, las perspectivas de trabajos futuros podrían estar orientados en varias direcciones.

- Evaluar otros osmolitos que podrían estarse sintetizando en las plantas de *S. minima* como posibles mecanismos de tolerancia como pudieran ser; sacarosa, manitol, glicina-betaina en respuesta al estrés por níquel. A la par se podría profundizar en evaluar enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD) en las plantas en respuesta a níquel.
- Sería de importancia evaluar la actividad enzimática de GSH, al igual que el contenido de PC y su actividad enzimática en los diferentes tejidos de la planta
- Otras de las perspectivas de este trabajo sería el evaluar las expresiones de los genes *GS* y *PCs* en plantas de *S. minima* en presencia de níquel, para conocer si la expresión de estos genes en *S. minima* están relacionados con algún mecanismo de tolerancia en esta planta relacionados son GSH y PC y de tal manera precisar su papel en los mecanismos de tolerancia a Ni.
- Sería importante evaluar la expresión de genes relacionados con los posibles transportadores de níquel en las plantas de *S. minima*, esto con el fin de conocer el camino de expresión de genes en respuesta a níquel, quienes podrían estar involucrados en algún mecanismo de desintoxicación y tolerancia en la planta de *S. minima* en respuesta a este metal y estudiar si estos transportadores le podrían estar generando algún tipo de tolerancia a la planta.
- Sería de gran importancia realizar estudios proteomicos en las plantas de *S. minima* en respuesta a níquel.
- También se sugiere realizar estudios de los cambios químicos y estructurales que sufre el Ni una vez que es absorbido por la planta, al igual que proponer estudios relevantes donde podamos evaluar si una vez que el Ni es absorbido pudiera ser recuperado para fines industriales.

- Otra de las perspectivas de este trabajo sería el realizar estudios de la anatomía de *S. minima*, mediante microscopía electrónica, con la finalidad de comprender como el Ni pudiera estar afectando a las diferentes estructuras de la planta.

3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abollino O., Aceto M., Malandrino M., Mentaste E., Sarzanini C., Barberis R. (2002). Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*. 119: 177-182.
- Abou S.R.A., Angle J.S., Chaney R.L. (2006). Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology Biochemistry*. 38: 2882-2889.
- Ahmad M.S., Ashraf M. (2011). Essential roles and hazardous effects of nickel in plants. *Reviews Environment Contaminatio Toxicology*. 67: 125-214.
- Ahmed H, Häder D.P. (2010). Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*. 69: 68-75.
- Ahmed S., Rasul M.G., Brown R., Hashib M. (2011). Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: A short review. *Journal of Environmental Management*. 92: 311-330.
- Ahsan N., Lee D.G., Alam I., Kim P.J., Lee J.J., Ahn Y.O. (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*. 8: 3561-3576.
- Alam MM., Hayat S., Ali B., Ahmad A. (2007). Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*. 45: 139-142.
- Al-Hamdani SH., Blair S.L. (2004). Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *American Fern Journal*. 94: 47-56.
- Alia y Saradhi. (1991). Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress. *Journal Plant Physiology*. 138: 554-8.

- Alvarado D.L., Espadas G.F., Carbonell L.S., May C.T., Santamaria J.F. (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic toxicology*. 171: 37-47.
- Aur C., Ghosh A., Pareek A., Sopory S.K., Singla P.S.L. (2014). Glyoxalases and stress tolerance in plants. *Biochemical Society Transactions*. 42: 485-490.
- Baccouch S., Chaoui E.I., Ferjani E. (2001). Nickel-induced oxidative damage in *Zea mays* Shoots. *Journal Plant. Nutrition*. 7: 1085-1097.
- Bai C., Liu L., Madera B.W. (2013). Nickel affects xylem Sap RNase a and converts RNase A to a urease. *BMC Plant Biology*. 13: 1-9.
- Bai C., Reilly C.C., Wood B.W. (2007). Nickel deficiency affects nitrogenous forms and urease activity in spring xylem sap of pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132: 302-309.
- Baker A.J.M., Brooks. R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1: 81-126.
- Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R., Smith J.A.C. (2000). Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Eds. Terry, N. y Bañuelos, G. Lewis publishers, Boca Raton. FL. USA. Pp. 85-107.
- Baker A.J.M., Proctor J., Balgooy M.M.J., Reeves R.D. (1992). Hyperaccumulation of nickel by the flora of the ultramafics of Palawan, Republic of the Philippines. in Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (eds) *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*. GB-Andover: Intercept. Republic Philippines. Pp. 291-304.
- Banerjee G., Sarker S. (1997). The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb (II) pollution: A case study. *Bioprocess Engineering*. 17: 295-300.

- Bassi R., Sharma S.S. (1993). Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. *Annals Botany*. 72: 151-154.
- Bassi R., Sharma S.S. (1993). Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochem*. 33: 1339-1342.
- Bates V. M., Brown E.T. (1981). *Azolla filiculoides* new to the southeastern United States. *American Fern Journal*. 71. 33-34.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-207.
- Bhagava A., Carmona F.F., Bhagava M., Srivastava S. (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals; *Journal Environmental Manager*. 105: 103-120.
- Bhalerao S.A., Sharma A.S., Poojari A.C. (2015). Toxicity of nickel in plants. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 3: 345-355.
- Bhardwaj R., Arora N., Sharma P., Arora H.K. (2007). Effects of 28- homobrassinolide on seedling growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities under nickel stress in seedlings of *Zea mays* L. *Asian Journal Plant Sciences*. 6: 765-772.
- Bhatia NP., Walsh K.B., Baker A.J.M. (2005). Detection and quantification of ligands involved in nickel detoxification in a herbaceous Ni hyperaccumulator *Stackhousia tryonii*. Bailey. *Journal Experimental Botany*. 56:1343-1349.
- Bhupinder D., Sharmila P., Sharadhi P. (2008). Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20: 61-70.
- 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, *Photosynthetica*. 28: 473-479.

- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress; a review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen RG. (1995). Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell Reports*. 7: 1099-1111.
- Boisvert S., Joly D., Leclerc S., Govindachary S., Harnois J., Carpentier R. (2007). Inhibition of the oxygen-evolving complex of photo-system II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. *Biometals*. 20: 879- 889.
- Bosiacki M., Wojciechowska E. (2012). Phytoextraction of nickel by selected ornamental plants. *Ecological Chemistry and Engineering S*. 19: 331-345.
- Bowler C., Van M.M., Inze D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*. 43: 83-116.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Brent P., Couch J., Al-Hamdani S. (2000). Selected Physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany*. 68: 313-319.
- Brierley J.A., Brierley C.L., Goyak G.M. (1986). AMT-BIOCLAIM: A new wastewater treatment and metal recovery technology. In: Lawrence, R. W. Branion. R.M.R. Ebner. H.G. (Eds) *Fundamental and applied biohydrometallurgy*. Elsevier. Amsterdam. Pp. 291- 303.
- Brooks R.R., Morrison R.S., Reeves R.D., Dudley TR., Akman Y. (1979). Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linnaeus* (Cruciferae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 203: 387- 403.
- Brooks R.R., Shaw S., Marfil A.A. (1981). The Chemical Form and Physiological Function of Nickel in Some Iberian Alyssum Species, *Physiology Plant*. 51: 167-170.

- Brown P.H., RM Welch., Cary E.E. (1987). Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85: 801-803.
- Cai Y., Ma L.Q. (2002). Metal tolerance, accumulation and detoxification in plants with emphasis on Arsenic in terrestrial plants. Chapter; 8. American Chemical Society. Miami Florida. Pp. 95-109.
- Cardoso P.F., Gratao P.L., Gomez R.A., Medici L.O., Azevedo R.A. (2016). Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* 17: 267-272.
- Carrillo G.R., Cajuste L.J., (1995). Behavior of trace metals in soils of Hidalgo, México. *Journal Environmental Science Health.* 30: 142-155.
- Castillo E. (1996). Reunión regional sobre la calidad del agua potable. Centro panamericano de ingeniería sanitaria y ciencias del ambiente. Organización panamericana de la salud. Lima- Perú. Pp. 7.
- Castro L.E., Trejo G.K., Vilchis N.A.R., Avalos B.M., Andrade C.S.B., Leal A.D., Santamaría J.M. (2014). Biosynthesis of lead nanoparticles by the aquatic Water fern, *Salvinia minima* Baker, when exposed to high lead concentration. *Colloid Surface Biointerfaces.* 114: 277-283
- Cempel M., Nikel G. (2006). Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal Environmental Studies.* 15: 375-382.
- Cenkci S., Cigerci I.H., Yildiz M., Özay C., Bozdog A., Terzi H. (2010). Leadcontamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental Experimental Botany.* 67: 467-473.
- 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 C., Chen T. H., Lo K. F., Chiu C.Y. (2004). Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant Science.* 166: 103-111.

- Chen C., Dickman M.B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102: 3459-3464.
- Chou I.N. (1989). Distinct Cytoskeletal injuries induced by As, Cd, Co, Cr and Ni compounds. Biomedical and Environmental Sciences. 2: 358-365.
- Ciurli S., (2001). Electronic structure of the nickel ions in the active site of urease. Chemistry (Easton). 2001: 99-100.
- Clayton F.E., (1994). Patty's Industrial Hygiene Toxicology, 4th ed.; A Wiley-Interscience Publication: New York. Pp. 2157-2173.
- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. Annual Review Plant Biology 53: 159-82.
- Colangelo E.P., Guerinot M.L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. Current Opinion in Plant Biology. 9: 322-330.
- Coogan T.P., Latta D.M., Snow E.T., Costa M. (1989). Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. Critical Reviews Toxicology. 19: 341-384.
- Crow G. (2002). Plantas Acuáticas del Parque Nacional Palo Verde y el Valle del Rio Tempisque. INBIO. Santo Domingo de Heredia. Costa Rica. Pp. 296-299.
- Cuchiara C.C., Silva I.M.C., Dalberto D.S., Bacarin M.A., Peters J.A. (2015). Chlorophyll a fluorescence in sweet potatoes under different copper concentrations. Journal of soil science and plant nutrition. 15: 179-189.
- Cuin T.A., Shabala S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. Plant Cell Environment. 30. 875-885.
- Dan T.V., Krishnaraj S., Saxena P.K. (2002). Cadmium and nickel uptake and accumulation in *scented geranium* (*Pelargonium* sp. Frensham) Water Air Soil Pollutant.137: 355-364.

- Dat J., Vandenaabeele S., Vranova E., Van M., Inze M.D., Van B.F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 779-795.
- Delgadillo L.A.E., González-R.C.A., Prieto G.F., Villagómez I.J.R., Acevedo S.O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 14: 597-612.
- Dhir B., Sharmila P., Saradhi P.P. (2009). Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. *Critical Reviews Environmental Science Technology*. 39: 75-781.
- Drazkiewicz M., Skorzunski-Polit E., Krupa Z. (2003). Response of ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). *Plant Science*. 164: 195-202.
- Estrella G.N.E. (2008). Estudio del efecto de la acumulación de Pb^{2+} sobre la biosíntesis de fitoquelatinas y de glutatión en el helecho acuático *Salvinia minima* Baker. Tesis de Doctorado. Posgrado en ciencias y biotecnológicas de plantas. CICY. Mérida. Yucatán México. Pp. 34-57.
- Estrella G.N., Mendoza C.D., Moreno S.R., Gonzalez M.D., Zapata P.O., Hernández A.M., Santamaría J.M. (2009). The pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb^{2+} by increasing phytochelatin via changes in SmPCs expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*. 91: 320-328.
- Estrella Gómez N., Sauri Duch E., Zapata Pérez O., Santamaría JM. (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb^{2+} damage associated with changes in the expression of SmGS genes an increased activity of GS. *Environmental and Experimental Botany*. 75: 188-194.
- Ewais E.A. (1997). Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biology Plant*. 39: 403-410.
- Fabrizio P., Valentina I., Alexandra C., Nina I.S., Nataliya R., Vladimir V.K., Massimo Z. (2015). Evaluation of nickel tolerance in *Amaranthus paniculatus* L. plants by

- measuring photosynthesis, oxidative status, antioxidative response and metal-binding molecule content. *Environmental Science Pollution Research*. 22: 482-494.
- Farooq M.A., Ali S., Hameed A., Ishaque W., Mahmood K., Iqbal Z. (2013). Alleviation of cadmium toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes; suppressed cadmium uptake and oxidative stress in cotton. *Ecotoxicology and Environmental*. 96: 242-249.
- Fergusson J.E. (1990). *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Oxford, UK: Pergamon Press. 10: 609-613.
- Fernando E., Quimado M., Doronila A. (2014). *Rinorea niccolifera* (Violaceae), a new, nickel-hyperaccumulating species from Luzon Island, Philippines. *PhytoKeys*. 37: 1-13.
- Folgar S., Torres E., Pérez-Rama M., Cid A., Herrero C., Abalde J. (2009). *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *Journal Hazard Mater*. 165: 486-493.
- Fuentes I.I., Espadas G.F., Talavera M.C., Fuentes G., Santamaria J.M. (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. *Aquatic Toxicology*. 155: 142-150.
- Gajewska E., Skłodowska M. (2006). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation*. 54: 179-188.
- Gajewska E., Skłodowska M. (2007). Relations between tocopherol, chlorophyll and lipid peroxides contents in shoots of Ni-treated wheat. *Journal Plant Physiology*. 164: 364-366.
- Gajewska E., Wielanek M., Bergier K., Skłodowska M. (2009). Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Plant. Physiology* 31: 1291-1300.

- Gardner J., Al-Hamdani S. (1997). Interactive effects of Aluminum and Subsces on *Salvinia*. *Journal of Aquatic Plant Management*. 35: 30-34.
- Ghaderian SM., Mohtadi A., Rahiminejad MR., Baker AJM. (2007). Nickel and other metal uptake and accumulation by species of Alyssum (Brassicaceae) from the ultramafic soils of Iran. *Environ Pollut*. 145: 293-298.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology. Biochemical*. 48: 909-930.
- Gonnelli C., Galardi F., Gabbrielli R. (2001). Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Plant Physiology*. 113: 507-514.
- Gómez L.D., Vanacker H., Buchner P., Noctor G., Foyer C.H. (2004). Intercellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term Chilling. *Plant Physiology*. 134: 166-167.
- González M.S., Perales V.H., Salcedo A.M.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* 27: 119-129.
- Gopal R., Mishra K.B., Zeeshan M., Prasad S.M., Joshi M.M. (2002). Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. *Current Science*. 83: 880- 884.
- Grill E., Löffler S., Winnacke E.L., Zenk M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase). *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 86: 6838-6842.
- Guerinot M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et iophysica Acta (BBA). Biomembranes*. 1465: 190-198.
- Hall A. (1981). Copper accumulation in copper-tolerant and non-tolerant populations of the marine fouling alga, *Ectocarpussiliculosus* (Dillw.) Lyngbye. *Botanica Marina*. 29: 223-228.

- Hall J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1-11.
- Halstead R.L., Finn B.J., Maclean A.J. (1969). Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. *Canadian Journal of Soil Science*. 49: 327-335.
- Hare P.D., Cress W.A., Staden J.V. (1997). The involvement of induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 114: 591-596.
- Hare P.D., Cress W.A., Van S.J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environment*. 21: 535-553.
- Hare P.D., Cress W.A., Staden J. (1997). The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulation*. 23: 79-103.
- Heath R.I., Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Heckathorn S.A., Mueller J.K., La G.S., Zhu B., Barrett T., Blair B., Dong Y. (2004). Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany*. 91: 1312-1318.
- Hernández P.J.L. (2001). Respuestas biológicas de plantas superiores a la exposición de altas concentraciones de metales pesados. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas. Pp. 68-74.
- Hesegawa I.E., Terada M., Sunairi H., Wakita F., Shinmachi A., Noguchi M., Nakajima J. (1997). Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil*. 196: 277-281.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station*. 347: 1-32.
- Hodges D.M., Delong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in

plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 207: 604-611.

Hoffmann T., Kutter C., Santamaría J.M. (2004). Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Engineering in Life Sciences*. 4: 61-65.

Hradilova J., Rehulka P., Rehulkova H., Vrbova M., Griga M., Brzobohaty B. (2010). Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. *Electrophoresis*. 31: 421-431.

Hussain A., Abbas N., Arshad F., Akram M., Iqbal Z., Ahmad K., Mansha M., Mirzae F. (2013). Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea Mays* L. *Agricultural Sciences*. 4: 262-265.

Jiang Y., Huang B. (2002). Protein alterations in tall fescue in response to water stress and abscisic acid. *Crop Science*. 42: 202-208.

Jiang W., Liu D., Liu X. (2001). Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biology Plant*. 44: 105-109.

Jozefczak M., Remans T., Vangronsfeld J., Cuypers A. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 3145–3175.

Kalaji M.H., Loboda T. (2007). Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress. *Plant, Soil and Environment*. 53: 511-516.

Kalaji M.H., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D.B., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serôdi J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth*. 122: 121-58.

Karimi L.N., Khanahmadi M., Moradi B. (2015). Accumulation and phytotoxicity of lead in *Cynara scolymus*. *Indian Journal of Science and Technology*. 5: 3634-3641.

- Kasprzak K.S., Sunderman F.W., Salnikow K. (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutation Research*. 2: 533-567.
- Kastori R., Petrovic M., Petrović N. (1992). Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water ratios in sunflower. *Journal Nutrition Planta*. 15: 2427-2439.
- Kevresan S., Petrovi N., Popovi M., Kandrac J. (1998). Effect of Heavy Metals on Nitrate and Protein Metabolism in Sugar Beet. *Plant Biology*. 41: 235-240.
- Khan. M.I., Khan N.A., Massod A., Per T.S., Asqher M. (2016). Hydrogen Peroxide Alleviates Nickel-Inhibited Photosynthetic Responses through Increase in Use-Efficiency of Nitrogen and Sulfur and Glutathione Production in Mustard. *Frontiers Plant Science*. 7: 44-47.
- Khellaf N., Zerdaoui M. (2010). Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology*. 19: 1363-1368.
- Khellaf N., Zerdaoui M. (2009). Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Iranian Journal Environmental Health Science*. 6: 161-166.
- Khodadoust A.P., Reddy K.R., Maturi K. (2004). Removal of nickel and phenanthrene from kaolin soil using different extractants. *Environmental Engineering Science*. 21: 691-704.
- Kidd P.S., Becerra C.C., García L.M., Monterroso C. (2007). Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas*. 16: 26-43.
- Kieffer P., Dommès J., Hoffmann L., Hausman J.F., Renaut J. (2008). Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*. 8: 2514-2530.
- Kieffer P., Planchon S., Oufir M., Ziebel J., Dommès J., Hoffmann L. (2009). Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal Proteome*. 8: 400-417.

- Kim. Y.Y., Yang, Y.Y., Lee Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum*. 116: 368-372.
- Kovacevic G., Kastori R., Merkulov L.J. (1999). Dry matter and leaf structure in young wheat plants as affected by Cd, lead, and nickel. *Biology Plantarum*. 42: 119-123.
- Kováčik J., Klejdus B., Kadukova J., Bačkor M. (2009). Physiology of *Matricaria chamomilla* Exposed to Nickel Excess. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 603-609.
- Kováčik J., Klejdus B., Hedbavny J., Bačkor M. (2009). Nickel uptake and its effect on some nutrient levels, amino acid contents and oxidative status in *Matricaria chamomilla* plants. *Water Air Soil Pollution*. 202: 199-209.
- Kramer K.U., Smith R. D., Wenzel W.W., Raskin I., Salt D.E. (1997). The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hdacsy. *Plant Physiology*. 11: 1641-1650
- Kramer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I., Salt, D.E. (2000). Subcellular Localization and Speciation of Nickel in Hyperaccumulator and Non-Accumulator *Thlaspi* Species, *Plant Physiol*. 122: 1343-1353.
- Krupa. Z., Oquist. G., Huner N.P.A. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*. A fluorescence analysis. *Physiology Plant*. 88: 626-630.
- Kupper H., Lombi E., Zhao F.J., Wieshammer G., McGrath S.P. (2001). Cellular Compartmentation of Nickel in the Hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*, *Journal Experimental Botany*. 52: 2291-3000.
- Kutman B.Y., Kutman U.B., Cakman I. (2013). Foliar nickel application alleviates detrimental effects of glyphosate drift on yield and seed quality of wheat. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 61: 8364-8372.
- Lane B., Kajioka R., Kennedy T. (1987). The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology*. 65: 1001-1005.

- Lin Y.C., Kao C.H. (2005). Nickel toxicity of rice seedlings: cell Wall peroxidase, lignin, and NiSO₄-inhibited root growth. *Crop Environ Bioinform.* 2: 131-136.
- Li Y.M., Chaney R.L., Brewer E.P., Angle J.S., Nelkin J. (2003). Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. *Environmental Science Technology.* 37: 1463-1468.
- Li M.S., Luo Y.P., Su Z.Y. (2007). Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental Pollution.* 147: 168-175.
- Lin Y.C., Kao C.H. (2007). Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. *Biology Plant.* 51: 351-354.
- Llamas A., Ullrich C.L., Sanz A. (2008). Ni²⁺ toxicity in rice: effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiol Biochemistry.* 46: 905-910.
- Llugany M., Tolrà R., Poschnrieder C., Barceló J. (2007). Hiperacumulación de metales: una ventaja para la planta y para el hombre *Ecosistemas.* 16: 4-9.
- López M. (2010). Distribución y Fitodisponibilidad de Metales Pesados (Sb, Hg, As) en los Jales de la Mina de antimonio de Wadley, Estado de San Luis Potosí., Universidad Autónoma de México; Tesis de obtención de grado de Maestro. Pp 67-72.
- Lutts S., Majerus V., Kinet J.M. (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Physiology Plant.* 105: 450-458.
- Iyaka Y.A. (2011). Nickel in soils: a review of its distribution and impacts. *Scientific Research and Essays.* 6: 6774-6777.
- Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. (2009). Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant plant growth promoting bacteria. *J. Hazard. Mater.* 166: 1154-1161.

- Maestri E., Marmiroli M., Visioli G., Marmiroli N. (2010). Metal Tolerance and Hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental experimental botany*. 68: 1-13.
- Maheshwary R., Dubey RS. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 59: 37-49.
- Maitra P., Mukherji S. (1977). Effect of lead on nucleic acid and protein contents of rice seedlings and its interaction with IAA and GA3 in different plant systems. *Indian Journal of Experimental Biology*. 17: 29-31.
- Maksymiec W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29: 177-187.
- Mallick N., Mohn F.H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 64-69.
- Mandal C., Ghosh N., Maiti S., Das K., Gupta S., Dey N., Adak M.K. (2013). Antioxidative responses of *Salvinia* (*Salvinia natans* Linn.) to aluminium stress and its modulation by polyamine. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 19: 91-103.
- Mathur S., Kalaji H.M., Jajoo A. (2016). Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. *Photosynthetica*. 54: 185- 192.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51: 659 - 668.
- Mazur R., Sadowska M., Kowalewska L., Abratowska A., Kalaji H.M., Mostowska A., Garstka M., Ostręga K.B. (2016). Overlapping toxic effect of long term thallium exposure on white mustard (*Sinapis alba* L.) photosynthetic activity. *Plant Biology* 16: 191-197.
- McGrath S.P., Zhao F.J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 277-282.

- Meister A. (1995). Biosynthesis of glutathione and its inhibition. *Methods Enzymology*. 252: 26-39.
- Milone M.T., Sgherri C., Clijsters H., Navarilzo F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 50: 256-276.
- Mishra S., Dubey R.S. (2005). Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. In: Pessarakli M. *Handbook of Photosynthesis*. Second ed. Boca Raton: CRC Press. Pp. 845-63.
- Mishra P., Dubey R.S. (2011). Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 64: 251-261.
- Mishra V.K., Tripathi B.D. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*. 99: 7091-7097.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Mohammad M.I., Hoque A.M., Okuma E., Banu M.N.A., Shimoishi Y., Nakamura Y., Murata Y. (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of plant Physiology*. 166: 1587-1597.
- Molas J. (1997). Changes in Morphological and Anatomical Structure of Cabbage (*Brassica oleracea* L.) Outer Leaves and in Ultrastructure of Their Chloroplasts Caused by an In Vitro Excess of Nickel. *Photosynthetica*. 34: 513-522.
- Molas J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*. 47: 115-126.
- Monferrán M.V., Wunderlin D.A. (2013). Biochemistry of Metals/Metalloids Toward Remediation Process. In *Heavy Metal Stress in Plants*. Gupta, Dk., Corpas, F.J.; Palma, J.M. (Eds). Springer Berlin Heidelberg. Pp. 43-71.

- Morgan J.M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. Annual Review Plant Physiology. 39: 299-319.
- Mourato M., Reis R., Martins L.L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. In: Montanaro G., Dichio B., editors. Advances in Selected Plant Physiology Aspects. Vienna. Austria: InTech. Pp. 23-44.
- Mulrooney S.B., Hausinger R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 27: 239-261.
- Munns R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytologist. 167: 645-663.
- Mustafiz A., Singh A.K., Pareek A., Sopory S. K., Singla P.S.L. (2011). Genome-wide analysis of rice and Arabidopsis identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. Function and Integrative Genomics. 11: 293-305.
- Mulrooney S.B., Hausinger R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 27: 239-261.
- Nagajyothi P.C., Dinakar N., Suresh S., Udaykiran Y., Suresh, C., Damodharam T. (2009). Effect of industrial effluent on the morphological parameters and chlorophyll content of green gram (*Phaseolus aureus* Roxb.). Journal of Environmental Biology. 30: 385-388.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth S.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters. 8: 199-216.
- Nagy L., Proctor J. (2001). South African Journal of Science. The effects of available Fe and Ni on ultramafic and non-ultramafic *Cochlearia* spp. (Brassicaceae). South African Journal of Science. 97: 586-590.
- Naidu B.P., Paleg L.G., Aspinall D., Jennings A.C. (1991). Jones GP. Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. Phytochem. 30: 407-409.

- Navarro A.J.P., Aguilar A.I., López M.J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 16: 10-25.
- Nishida S., Tsuzuki C., Kato A., Aisu A., Yoshida J., Mizuno T. (2011). AtIRT1, the Primary Iron Uptake Transporter in the Root, Mediates Excess Nickel Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 52: 1433-1442.
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez G.B. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environment*. 35: 454-484.
- Nuñez L.R., Meas V.Y., Ortega B.R., Olgúin E.J. (2004). Fitorremediación de aguas contaminadas: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*. 55: 69-82.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*. 95: 351-358.
- O'Keefe D.H., Hardy J.K., Rao R.A. (1984). Cadmium uptake by water hyacinth: effects of solution factors. *Environmental Pollution*. 34: 133-147.
- Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y., Tada M., Murata Y. (2004). Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science Plant Nutrition*. 50: 1301-1305.
- Olgúin E.J., Hernández E., Coutiño P., González R. (1994). Aprovechamiento de las plantas acuáticas para el tratamiento de aguas residuales. In Olgúin E. J. C. Peña, E. Hernández & R. Camacho (eds), *Tecnologías Ambientales para el Desarrollo Sustentable*. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa: Pp.11-20.
- Olgúin E.J., Sánchez G.G., Pérez P.T., Pérez O.A. (2005). Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 32: 577-586.

- Olguín E.J., Sanchez G.G., Perez P.T. (2007). Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water Air Soil Pollution*. 181: 135-147.
- Olguin J., Hernandez., Ramos E.I. (2002). The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnology*. 22: 121-131.
- Oliveira J.A., Cambraia J., Oliva M.A., Pereira C. (2001). Absorcao e acúmulo de cádmio eus afeitos sobre o crecimiento relativo de plantas de aguapé e de *Salvinia*. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*. 13: 329-341.
- Oporto C., Arce O., De P.N., Van B.E. (2001). Evaluación del potencial de *Lemna minor* para la remoción de Cr (VI) de aguas residuales. *Revista Boliviana de Ecología*. 10: 17-27.
- Outridge P.M., Rauser W.E., Hutchinson T.C. (1991). Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between raments of *Salvinia minima*. *Ecología*. 88: 109-115.
- Ouzounidou G., Moustakas M., Symeonidis L., Karataglis S. (2006). Response of Wheat Seedlings to Ni Stress: Effects of Supplemental Calcium. *Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 346-352.
- Oukarroum A., Barhoumi L., Samadani M., Dewez D. (2015). Toxic Effects of Nickel Oxide Bulk and Nanoparticles on the Aquatic Plant *Lemna gibba* L. *Biomed Research International*. 50: 13-26.
- Pan A., Yang. M., Tie F., Li L., Chen Z., Ru B. (1994). Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*. 24: 341-351.
- Pan X., Zhang D., Chen X., Li L., Mu G., Li L., Song W. (2010). Sb uptake and photosynthesis of *Zea mays* growing in soil watered with Sb mine drainage: an

- OJIP chlorophyll fluorescence study. Polish Journal of Environmental Studies. 19: 981-987.
- Pandey N., Sharma C.P. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Plant Science. 163: 753-758.
- Pandey S.N., Singh K. (2011). Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. Journal Environmental Biology. 32: 391-394.
- Pandolfi T., Gabrielli R., Ciscato N. (1996). The toxicity of nickel in two durum wheat cultivars that differ in the sensitivity to drought. Journal Plant Nutrition. 19: 1611-1627.
- Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L., Buchala A., Glazebrook J., Mauch F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. Plant Journal. 49: 159-170.
- Parmar P., Kumari N., Sharma V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. Botanical Studies. 54: 45-49.
- Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environmental and Experimental Botany. 52: 199-223.
- Pavlíková D., Pavlík M., Staszková L., Tlustoš P., Száková J., Balík J. (2007). The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase. Plant Soil and Environment. 53: 201-206.
- Paweł H., Tadeusz F. (2015). Nickel in the environment. Journal of Elementology. 20: 525-534.

- Perez P.P. (2015). biotecnología ambiental: desarrollo de estrategias biotecnológicas para la remediación de metales pesados. universidad de Sevilla. Pp. 12-14.
- Persans M.W., Nieman K., Salt D.E. (2001). Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9995-10000.
- Piccini. D.F., Malavolta E. (1992). Effect of nickel on two common bean cultivars. Journal Plant Nutrition. 15: 2343-2350.
- Polacco J.C., Mazzafera P., Tezzoto T. (2013). Opinion: nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. Plant Science. 79: 199-200.
- Polle A., Rennenberg H. (1993). Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress, in: L. Fowden, F.T. Mansfield, J. Stoddard (Eds.). Plant Adaptation to Environmental Stress. Chapman and Hall, London. Pp. 263-273.
- Poonkothai M., Vijayavathi B.S. (2012). Nickel as an essential element and a toxicant. International Journal of Environmental Sciences. 1: 285-288.
- Prado C., Prado F.E., Pagano E., Rosa M. (2015). Differential Effects of Cr(VI) on the Ultrastructure of Chloroplast and Plasma Membrane of *Salvinia minima* Growing in Summer and Winter. Relationships With Lipid Peroxidation, Electrolyte Leakage, Photosynthetic Pigments, and Carbohydrates. Water Air & Soil Pollution. 226: 8-12.
- Prado C., Rodrigues M.L, Gonzales J.A., Pagano E.A., Hilal M., Prado F.E., (2010). Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism; Journal of Hazardous Materials. 177: 546-553.
- Qufei L., Fashui H. (2009). Effects of Pb²⁺ on the structure and function of photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*. Biological Trace Element Research. 129: 251-260.
- Reeves RD., Baker A.J.M. (2000). Metal-accumulating plants. In: Raskin I; Ensley BD (eds.) Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment. New York: John Wiley y Sons. Pp. 193-229.

- Rhodes D., Nadolska O.A., Rich P.J. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes In: Lauchli A, Luttge U, eds. Salinity, Environment Plant Molecules. Netherlands: AI-Kluwer Academic Publishers. Pp. 181-204.
- Reimann C., Caritat P. (1998). Chemical elements in the environment: factsheets for the geochemist and environmental scientist. Berlin. Heidelberg. New York London Paris Tokyo. Hong Kong: Springer-Verlag. Pp. 397.
- Rodríguez C.J., Rellan A.R., Abadia A., Abadia J., Lopez M.A.F. (2010). Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *Journal Proteomics*. 73: 1694-1706.
- Romanowska E., Pokorska B., Siedlecka M. (2005). The effects of oligomycin on content of adenylates in mesophyll protoplasts, chloroplasts and mitochondria from Pb²⁺ treated pea and barley leaves. *Acta Physiology Plant*. 27: 29-36.
- Romero A.M., Colin C.A., Sámchez S.E., Ortiz H.M. (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: evaluación de la remoción de la carga orgánica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25: 157-167.
- Ros R., Morales A., Segura J., Picazo I. (1992). In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. *Plant Science*. 83: 1-6.
- Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.P. (2008). The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutarredoxins and Glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 143-160.
- Sabir M., Hakeem K.R., Aziz T., Zia-ur-Rehman., Rashid M.I., Ozturk M. (2014). High Ni levels in soil can modify growth performance and mineral status of wheat cultivars. *Clean-Soil Air Water*. 42: 1263-1271.
- Sarry J.E., Kuhn L., Ducruix C., Lafaye A., Junot C., Hugouvieux V. (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*. 6: 2180-2198.

- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. (2005). Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica Biophysica Acta*. 1706: 250-261.
- Schat H., Sharma S.S., Vooijs R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiology Plant*. 101: 477-482.
- Schickler H., Caspi H. (1999). Response of Antioxidative Enzymes to Nickel and Cadmium Stress in Hyperaccumulator Plants of Genus, *Alyssum*, *Physiology Plant*. 105: 39-44.
- Schröder WP., Arellano JB., Bittner T., Barón M., Eckert HJ., Renger G. (1994). Flash-induced absorption spectroscopy studies of copper interaction with photosystem II in higher plants *Journal Biology Chemistry*. 269: 32865-32870.
- Schneider I., Rubio J. (1999). Sorption of Heavy Metal Ions by the Nonliving Biomass of Freshwater Macrophytes. *Environmental Science Technology*. 33: 2213-2217.
- Schützendübel A., Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal Experimental Botany*. 53: 51-65.
- Secretaría de estado de salud pública y asistencia social. (2006). Decretos, resoluciones y disposiciones para la reorganización y modernización institucional de la secretaría de estado de salud pública y asistencia social (SESPAS). Santo domingo. Disponible en: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fsalud.gob.do%2Fdownload%2Fdocs%2FDisposiciones%2FDisposiciones.pdf&ei=pdaLUtPkOYiN2gX0nICACg&usg=AFQjCNH7F5qcLN_zT0lcgtePO1fBEGKw&bvm=bv.56643336,d.b2l.
- Semane B., Dupae J., Cuypers A., Noben J. P., Tuomainen M., Tervahauta A. (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal Plant Physiology*. 167: 247-254.

- Sen A.K., Mondal N.G., Mandal S. (1987). Studies of uptake and toxic effects of Cr(VI) on *Pistia stratiotes*. Water Science Technology. 19: 119-127.
- Seregin I.V., Ivanov V.B. (2001). Physiological Aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal Plant Physiology. 48: 523-544.
- Seregin I.V., Shpigun L.K., Ivanov V.B. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. Russ. Journal of Plant Physiology. 51: 525-533.
- Sersen F., Kralova K., Bumbalova A. (1998). Action of mercury on the photosynthetic apparatus of spinach chloplasts. Photosynthetica. 35: 551-559.
- Severne B.C. (1974). Nickel accumulation by *Hybanthus floribundus*. Nature. 248: 807-808.
- Sgherri C., Cosi E., Navari I.F. (2004). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grow in copper excess. Physiologia Plantarum. 118: 21-28.
- Shanker A.K., Djanaguiraman M., Sudhagar R. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiate* (L) R. Wilczek. Cv CO4) roots. Plant science. 166: 1035-1043.
- Sharmila P., Pardha S.P. (2002). Proline Accumulation in Heavy Metal Stressed Plants: An Adaptive Strategy. Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. 7: 179-199
- Sharmin S.A., Alam I., Kim K.H., Kim Y.G., Kim P.J., Bahk J.D. (2012). Chromium-induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. Plant Science. 187: 113-126.
- Sharma S.S., Dietz K.J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. Journal Experimental Botany. 57: 711-726.
- Shaw B.P., Sahu S.K., Mishra R.K. (2004). Heavy Metal Induced Oxidative Damage in Terrestrial Plants. In: Prasad MNV (ed) Heavy Metal Stress in Plants: From

- Biomolecules to Ecosystems. Narosa Publishing House, New Delhi India. Pp. 84-126.
- Shen H.M., Zhang Q.F. (1994). Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 102: 275-282.
- Sheoran I.S., Singal H.R., Singh R. (1990). Effect of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and the Enzymes of the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research.* 23.:345-351.
- Sheoran. I.S., Singh R. (1993). Effect of heavy metals on photosynthesis in higher plants. In: Y.P. Abrol, P. Mohanty y Govindjee (eds.). *Photosynthesis: Photoreactions to plant productivity.* Kluwer. India. Pp. 451-468.
- Sigel A., Sigel H., Sigel R.O.K. (2009). *Metallothioneins and Related Chelators: Metal Ions in Life Sciences.* Astrid Sigel, Helmut Sigel; Roland K. O. Sigel. Royal Society of Chemistry Cambridge. 5: 55-56.
- Singh D.P., Khare P., Singh P.S. (1989). Effect of Ni²⁺, Hg²⁺, and Cu²⁺ on growth, oxygen evolution and photosynthetic electron transport in *Cylindrospermum* IU 942. *Journal Plant Physiology.* 134: 406-412.
- Singh P.K., Tewari R.K. (2003). Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal Environmental Biology.* 24: 107-112.
- Singh S., Eapen S., D'souza S.F. (2006). Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere.* 62. 233-246.
- Singh N., Lena Q.M., Mrittunjai S., Bala R. (2006). Metabolic adaptation to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris Vittata* L. and *Pteris ensiformis*. *Plant Science.* 170. 274-282.
- Shintinawy F., Ansary A. (2000). Differential effect of Cd²⁺ and Ni²⁺ on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biology plant.* 4. 79-84.

- Sinhei D.I., Bianchini Jr. (2015). Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. International Journal Phytoremediation. 17. 929-935.
- Sreekanth T.V.M., Nagajyothi P.C., Lee K.D., Prasad T.N.V.K. (2013). Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. International Journal of Environmental Science and Technology. 10. 1129-1140.
- Sresty T.V.S., Madhava R.K.V. (1999). Ultrastructural Alterations in Response to Zinc and Nickel Stress in the Root Cells of Pigeonpea. Environmental and Experimental Botanny. 41. 3-13.
- Stirbet A., Govindjee., Strasser BJ, Strasser R.J. (1998). Chlorophyll a Fluorescence Induction in Higher Plants: Modelling and Numerical Simulation. Journal of Theoretical Biology 193: 131-151.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C., Govinjee (Eds.), Chlorophyll a Fluorescence: A signature of photosynthesis. Springer Dordrecht. 12. 321-362.
- Suave S., Henderson W., Allen H.E. (2000). Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: Dependence on pH, Total metal burden, and organic matter. environment sci technology. 34. 1125-1131.
- Suñe N., Maine M.A., Sánchez G., Caffaratti S. (2007). Cadmium and chromiumremoval kinetics from solution by two aquatic macrophytes. Environmental. Pollution. 145: 467-473.
- Talukdar D. (2011). Effect of arsenic-induced toxicity on morphological traits of *Trigonella foenum-graecum* L. and *Lathyrus sativus* L. during germination and early seedling growth. Curr. Res. Journal Biologi Sciences. 3: 116-123.
- Taweri R.K., Kumara P., Tewari N., Srivastava S., Sharma P.N. (2004). Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. Plant Science. 166: 687-694.

- Trejo G.K. (2012). Caracterización de la expresión diferencial de 6 genes en respuesta al plomo en *Salvinia minima* Baker. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. CICY. Mérida Yucatán México. Pp.87-92.
- Tripathy B.C., Bhatia B., Mohanty P. (1981). Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by Ni²⁺. *Biochemical and Biophysical Acta*. 638: 217-224.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. (2008). In vivo assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants. In: A. Varma, (eds). *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (3rd edition). Springer Dordrecht. The Netherlands. Pp. 679-703.
- Tuma J., Skalicky M., Tumova L., Safrankova M. (2010). Translocation of nickel in *Avena sativa*: The effect of accompanying mobile anions. *Fresenius Environmental Bulletin*. 19: 2974-2980.
- Tundermann J.H., Tien J.K., Howson T.E. (2005). Nickel and nickel alloys. *In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 17: 1-9.
- Uh Ramos. J.D. (2004). Crecimiento y absorción de plomo y arsénico en tres poblaciones de *Salvinia minima* Baker. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis de Licenciatura.
- Uh Ramos. J.D. (2008). Aislamiento e identificación de genes expresados diferencialmente en respuesta al plomo en *Salvinia minima* Baker, Tesis de maestría. Posgrado en ciencias biológicas. CICY. Mérida. Yucatán México.
- Vangronsveld J., Clijsters H. (1994). Toxic effects of metals. In: M.E. Farago (Ed.), *Plants and the Chemical Elements-Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. Pp. 149-177.
- Vardanyan L.G., Ingole B.S. (2006). Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environment International*. 32: 208-218.

- Verbruggen N., Hermans C, Schat H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion Plant Biology*.12: 364-372.
- Vivancos P.D., Dong Y., Ziegler K., Markovic J., Pallardo F.V., Pellny V.P.J., Foyer C.H. (2010). Recruitment of glutathione in the nucleus during cell proliferation of whole cells adjusts redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana* and lowers the oxidative defense shield. *Plant Journal*. 64: 825-838
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science*. 9: 244-252.
- Wang S.H, Yang Z.M, Yang H., Lu B., Li S.Q., Lu Y.P. (2004). Copper induced stress and antioxidativa response in roots of *Brassica juncea* L. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 45: 203-212.
- Wang H., Zhao S.C., Liu R.C., Zhou W., Jin J.Y. (2009). Changes in photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress. 47: 277-283.
- Wang S.H., Zhang H., Zhang Q., Jin G.M., Jiang S.J., Jiang D., He Q.Y., Li Z.P. (2011). Copper-induced oxidative stress and responses of the antioxidant system in roots of *Medicago sativa*. *Journal Agronomy Crop Science*. 197: 418-429.
- Weckx J.J.E., Clijsters M.M.H. (1997). Zinc phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus Vulgaris*. *Plant Physiology Biochemistry*. 35: 405-410.
- Weis J.S., Weis P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International*. 30: 685-700.
- Whiteman J.B., Room P.M. (1991). Temperatures lethal to *Salvinia molesta* Mitchel. *Aquatic Botany*. 40: 27-35
- Wilde E.W., Benemann J.R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*. 11: 781-812

- Wodala B., Eitel G., Gyula T.N. (2012). Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P700 absorbance in pea leaves. *Photosynthetica*. 50: 380-386.
- Wood B.W., Reilly C.C., Nyczepir A.P. (2004). Mouse-ear of pecan: I. Symptomology and occurrence. *Hort Science*. 38: 87-94.
- Xing W., Huang W., Liu G. (2009). Effect of Excess Iron and copper on Physiology of Aquatic Plant *Spirodela polyrrhiza* (L) Schleid. *Environmental Toxicology*. 25:103-112.
- Xiong J., Lu H., Lu K., Dugan Y., An L., Zhu C. (2009). Cadmium decreases Crown root number by root primordia initiation in rice seedlings. *Planta*. 230: 599-610.
- Yadav S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 79: 167-179.
- Yang Q., Wang Y., Zhang J., Shi W., Qian C., Peng X. (2007). Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*. 7: 737-749.
- Yan R., Gao S., Yang W., Cao M., Wang S., Chen F. (2008). Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. *Plant Soil Environmental*. 54: 294-300.
- Yilmaz D.D., Parlak K.U. (2011). Nickel-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and metal accumulation in *Lemna gibba*. *International Journal Phytoremediation*. 13: 805-17.
- Young R.A. (1995). Toxicity Profiles. Toxicity summary for nickel and nickel compounds. Web site: <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/nickel>
- Yusuf MA., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Govindjee., Sarin NB. (2010). Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and

chlorophyll fluorescence measurements. *Biochemica et Biophysica. Acta.* 1797: 1428-1438.

Yusuf M., Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. (2011). Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bull Environ Contam Toxicology.* 86: 1-17.

Zacchini M., Rea E., Tullio M., Agazio M. (2003). Increased antioxidant capacity in corn calli during and after oxidative stress induced by long-term treatment. *Plant Physiology Biochem.* 41: 49-54.

Zarei S., Ehsanpour A.A., Abbaspour J. (2012). The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress. *Journal of Cell and Molecular Research.* 4: 43-49.

Zengin F.K., Munzuroglu O. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.* 47: 157-64.

Zenk M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene.* 1: 21-30.

Zhang H., Lian C., Shen Z. (2009). Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Annals Botany.* 103: 923-930.

Zhen Y., Qi J.L., Wang S.S., Su J., Xu G.H., Zhang M.S. (2007). Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol Plant.* 131: 542-554.

Zucconi L., Ripa C., Alianiello F., Benedetti A., Onofri S. (2003). Lead resistance, sorption and accumulation in a *Paecilomyces lilacinus* strain. *Biology and Fertility of Soils.* 37: 17-22.