

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**“MECANISMOS DE TOLERANCIA DE ESPECIES DE
MEZQUITES (*Prosopis sp*) EXPUESTAS A ESTRÉS POR
METALES”**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M. C. Claudia Yared Michel López

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Daniel González Mendoza

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Omar Zapata Pérez

Ejido Nuevo León

29 de Mayo de 2015

La presente tesis titulada: **MECANISMOS DE TOLERANCIA DE ESPECIES DE MEZQUITES (*Prosopis sp*) EXPUESTAS A ESTRÉS POR METALES**, realizada por la alumna: Claudia Yared Michel López, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:

Dr. Daniel González Mendoza

CO-DIRECTOR:

Dr. José Omar Zapata Pérez

ASESOR:

Dr. Jorge M. Santamaría Fernández

ASESOR:

Dra. Silvia Mónica Avilés Marín

ASESOR:

Dr. Onécimo Grimaldo Juárez

Esta tesis de Doctorado titulada “**MECANISMOS DE TOLERANCIA DE ESPECIES DE MEZQUITES (*Prosopis sp*) EXPUESTAS A ESTRÉS POR METALES**”, fue financiada parcialmente por el proyecto: CONACYT 219750 denominado “Mecanismos de tolerancia a metales esenciales y no esenciales en plantas de climas semiáridos: uso del mezquite (*Prosopis sp*) como modelo de estudio.



AGRADECIMIENTOS

El escribir estas líneas, que si fueran escritas a mano ya me hubiese terminado un borrador de lo difícil que es llegar hasta este punto de la redacción, debido a los miles de sentimientos encontrados que me invaden al expresar mi pequeño pero muy sincero agradecimiento a cada una de las personas que contribuyeron para la culminación de mi Tesis Doctoral.

Agradezco primeramente a **Dios** por permitirme cumplir uno de los más importantes en mi vida y con el que algún día soñé, gracias señor por estar siempre a mi lado y nunca soltarme.

A la **UABC**, por ser mi tercer Alma mater y por abrirme sus puertas para transitar en esta etapa de formación académica. Aunque es la tercera en mi lista, es como si fuese la primera para mí y así lo siento, **Cimarrón Mi Corazón!!**

Al **CONACYT**, por el apoyo brindado a través de la expedición de la autorización de la beca de posgrado durante mis tres años de formación.

Al **ICA-UABC**, por permitirme formar parte de su programa de doctorado y por todo el apoyo brindado durante mi formación.

A mi Asesor y Guía el **DR. DANIEL GONZÁLEZ MENDOZA**, por su apoyo comprensión y motivación diaria durante esta etapa de formación como estudiante de

doctorado y por permitirme trabajar en su laboratorio, y por ser más que un asesor para mí, Mil gracias Doc,

A mi **Comité Evaluador: DRA. SILVIA MÓNICA AVILÉS MARÍN, DR. JOSÉ OMAR ZAPATA PÉREZ, DR. JORGE M. SANTAMARÍA FERNÁNDEZ, DR. ONÉCIMO GRIMALDO JUÁREZ y DR. DANIEL GONZÁLEZ MENDOZA**, a cada uno mi agradecimiento total en cada una de las etapas de mi formación, por su apoyo y motivación y por las facilidades brindadas para la culminación de mi tesis doctoral.

Al **CINVESTAV, (Unidad Mérida)**, particularmente externo mis agradecimientos al **DR. JOSÉ OMAR ZAPATA PÉREZ**, por formar parte de mi Comité de evaluación y por todo su apoyo durante mis estancias de trabajo en su **Laboratorio de Ecotoxicología Acuática**, del cual formé parte y donde encontré grandes compañeros que me externaron su apoyo y amistad durante mi estancia (Viky, Suri, Marce, Jorge, Blanca).

Al **CICY, (Unidad Mérida)**, por haber sido un espacio abierto para la realización de etapas experimentales que forman parte de la tesis doctoral, particularmente extendiendo mi agradecimiento y gratitud al **DR. JORGE SANTAMARÍA FERNÁNDEZ**, por permitirme realizar mis estancias de trabajo en su laboratorio y por todas las facilidades brindadas durante las mismas y por formar parte de mi Comité de evaluación, de igual forma, agradezco a la **DRA. GABRIELA FUENTES** por su apoyo y aporte brindado durante mi estancia y al **Laboratorio de Fisiología Vegetal**

y **Molecular**, a cada uno de mis compañeros y amigos que me extendieron su apoyo y cariño (Ama, Ari, Beto, Daniel, Don Fran).

Agradezco infinitamente y con todo mi corazón a mis Papis **Paula y Arnoldo**, por todo su cariño, amor y comprensión y por enseñarme a luchar día a día para conseguir mis metas, gracias por todo papás, los Amo por Siempre.

A mis **Hermanas (Sveidy, Briana y Aylin)**, por ser ellas y por apoyarme y comprenderme siempre cuando no estuve presente, las Amo mucho hermanas.

A **Rodrigo**, por ser mi compañero, mi amigo y mi **Gran Amor**, por motivarme constantemente para la culminación de esta etapa, por estar a mi lado apoyándome en cada momento y por amarme.

A la **Familia Flores Garivay**, a mis (Suegros, cuñados, sobrinos) por formar ya parte de mi familia querida, por su apoyo y protección durante todo este tiempo de conocernos y por abrirme las puertas de su corazón, los quiero a todos!!.

A mis **Amigos** que aunque los amigos dicen que se cuentan con la mano, gracias a dios tengo verdaderos y grandes amigos que me han acompañado aún en la distancia durante toda mi formación académica y a quienes agradezco su cariño e incondicional amistad.

Además agradezco todo el **personal Académico, Administrativo, de Servicios y a la Comunidad Universitaria del ICA** en general por todo el apoyo brindado, por su

amabilidad, y participación en este trayecto de formación, Gracias infinitas a mis Profesores, Compañeros de Clase y Laboratorio, a los que se han ido y a los que permanecen, a Sandrita, Don Fer, Viky, Maestra Cristina, Francis, a todos muchas gracias.

GRACIAS INFINITAS A TODOS POR FORMAR PARTE DE MI VIDA

RESUMEN

El equilibrio de ecosistemas áridos se ha visto alterado en las últimas décadas por un marcado aumento de contaminantes como los elementos potencialmente tóxicos (EPTs). Las plantas han sido utilizadas para la diagnosis o predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas mediante el estudio de sus procesos fisiológicos, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación y mortalidad. Los mecanismos internos de tolerancia y la respuesta ecotoxicológica de plantas a la exposición de metales esenciales y no esenciales han sido poco abordados en ambientes áridos y semiáridos en el Valle de Mexicali. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de Cobre y Cadmio en las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares de *P. juliflora*. Se evaluaron semillas de *P. juliflora* en condiciones hidropónicas y bajo estrés por diferentes concentraciones de Cu^{2+} (0.1 mM, 1 mM y 10 mM) y Cd^{2+} (50 μM , 100 μM , 1000 μM) y tiempos de exposición (4, 8, 12, 24, 48 hr). Se utilizaron tejidos de (hoja, tallo, raíz y embriones) para la determinación del contenido de (EPTs). Se utilizó RNA Total de *P. juliflora* para la amplificación de los genes *MT*'s y *FQ*'s por RT-PCR y se utilizó espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) para determinar la concentración del metal. Se empleó un modelo completamente al azar con cinco repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los posibles mecanismos de tolerancia y detoxificación de Cd^{2+} y Cu^{2+} presentes en las plantas de *P. juliflora* contribuyen al entendimiento de los mismos, así como también permiten realizar estudios posteriores donde el potencial biotecnológico de *P. juliflora* pueda ser utilizado como una alternativa de detoxificación de suelos contaminados en el Valle de Mexicali.

Palabras claves: mecanismos de tolerancia, estrés, metales pesados

ABSTRACT

The balance of arid ecosystems has been altered in recent decades by a marked increase of contaminants such as potentially toxic elements (EPTs). Plants have been used for diagnosis or prediction of negative consequences of anthropogenic activities through the study of their physiological processes, biochemical responses, mechanisms of adaptation and mortality. The internal mechanisms of tolerance and ecotoxicological response of plants to the exhibition of essential and nonessential metals have been little discussed in arid and semiarid in the Mexicali Valley. The aim of the study was to evaluate the effect of copper and cadmium on physiological, biochemical and molecular responses of *P. juliflora*. Seeds of *P. juliflora* were evaluated in hydroponic conditions and under stress by different concentrations of Cu^{2+} (0.1 mM, 1 mM y 10 mM) and Cd^{2+} (50 μM , 100 μM , 1000 μM) and exposure times (4, 8, 12 , 24, 48 hr). Tissues (leaf, stem, root and embryo) for determining the content of (EPTs) were used. *P. juliflora* Total RNA was used for amplification of FQ's MT'sy genes by RT-PCR was used and atomic absorption spectroscopy with graphite furnace (GFAAS) for determining the concentration of the metal. A model completely randomized with five replicates for each treatment was used. Possible mechanisms of tolerance and detoxification of Cd^{2+} and Cu^{2+} in plants of *P. juliflora* contribute to the understanding of them, as well as allow for further studies where the biotechnological potential of *P. juliflora* can be used as an alternative detoxification contaminated soil in the Mexicali Valley.

Keywords: tolerance mechanisms, stress, heavy metals

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	1
III.	OBJETIVOS.....	1
IV.	ANTECEDENTES	2
	4.1 Importancia de las Zonas Áridas y Semiáridas	2
	4.2 Presencia de elementos potencialmente tóxicos en ecosistemas semiáridos ...	3
	4.3 Tolerancia de las plantas a los EPTs en ambientes áridos y semiáridos	4
	4.4 Tolerancia del mezquite a EPTs	8
	4.5 Las Metalotioneinas y Fitoquelatinas de las plantas	9
	4.6 Fitoquelatinas.....	11
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
	5.1 Colecta del germoplasma de <i>Prosopis juliflora</i>	13
	5.2 Germinación de las semillas de <i>Prosopis juliflora</i>	13
	5.3 Determinación de las dosis subletales de Cu^{2+} y Cd^{2+} en <i>P. juliflora</i>	14
	5.4 Exposición de las plantas de <i>P. juliflora</i> a metales en condiciones hidropónicas	15
	5.5 Determinación de eficiencia fotosintética (F_v/F_m) de <i>P. juliflora</i>	17
	5.6 Determinación de la fuga de electrolitos mediante la conductividad eléctrica (CE) del tejido foliar de <i>P. juliflora</i>	17
	5.7 Determinación de pigmentos fotosintéticos: contenido de clorofilas (a, b y total)	18
	5.8 Determinación de Cu^{2+} y Cd^{2+} en los diferentes tejidos de <i>P. juliflora</i>	19
	5.9 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transporte de Cu^{2+} y Cd^{2+} en <i>P. juliflora</i>	20
	5.10 Expresión de genes de MT's (<i>Mt1</i> , <i>Mt2</i> y <i>Mt3</i>) y de la FQ's en el tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuestas a tres concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+}	21
	5.11 Extracción del ARN y síntesis del ADN complementario de <i>P. juliflora</i> y <i>P. glandulosa</i>	21
	5.12 Diseño de iniciadores específicos para los genes de metalotioneina tipo 1, 2 y 3 y la fitoquelatin sintetasa	22
	5.13 Homología de <i>PgMt2</i> Isoforma I, <i>PgMt2</i> , <i>PgMt3</i> y <i>PjFQs</i>	23
	5.14 Análisis de la expresión de <i>PgMt2</i> Isoforma I, <i>PgMt2</i> , <i>PgMt3</i> y <i>PjFQs</i> mediante la técnica de RT-PCR.....	25
	5.15 Estimación de la calidad de RNA	26

3.16 Estandarización de la técnica de extracción de RNA total de los tejidos de <i>P. glandulosa</i> y <i>P. juliflora</i>	27
3.17 Análisis estadístico	28
VI. RESULTADOS	29
6.1 Porcentaje de Germinación e índice de tolerancia	29
6.2 Fluorescencia en hojas de <i>P. juliflora</i> expuestas a Cd^{2+} y Cu^{2+}	32
6.3 Determinación de la fuga de electrolitos mediante la conductividad eléctrica (CE) del tejido foliar de <i>P. juliflora</i>	38
6.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos en <i>P. juliflora</i> expuestas a cobre	39
6.5 Determinación de pigmentos fotosintéticos en <i>P. juliflora</i> expuestas a cadmio	42
6.6 Determinación de Cu^{2+} en los diferentes tejidos de <i>P. juliflora</i>	44
6.7 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transferencia en los diferentes tejidos de <i>P. juliflora</i> expuestos a cobre	46
6.8 Determinación de Cd^{2+} en los diferentes tejidos de <i>P. juliflora</i>	47
6.9 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transferencia en los diferentes tejidos de <i>P. juliflora</i> expuestos a cadmio	48
6.10 Patrones de expresión de las Metalotioneinas en respuesta al estrés	49
6.11 Patrones de expresión de fitoquelatin sintetasa (FQs) en respuesta al estrés	51
VII. DISCUSIÓN	53
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. LITERATURA CITADA	62
X. ANEXOS	67

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Diseño experimental para plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas con Cu^{2+} y Cd^{2+} .	17
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados durante la técnica de RT-PCR.	23
Cuadro 3. Homología del gen <i>PgMt2</i> Isoforma I de <i>P. glandulosa</i> encontrada en diversas especies de plantas.	24
Cuadro 4. Homología del gen <i>PgMt2</i> de <i>P. glandulosa</i> encontrada en diversas especies de plantas.	25
Cuadro 5. Homología del gen <i>PgMt3</i> de <i>P. glandulosa</i> encontrada en diversas especies de plantas.	25
Cuadro 6. Homología del gen <i>PjFQs</i> de <i>P. juliflora</i> encontrada en diversas especies de plantas.	25
Cuadro 7. Programa predeterminado utilizado para la amplificación por PCR.	27
Cuadro 8. Oligonucleótidos utilizados durante a técnica de RT-PCR.	27
Cuadro 9. Factor de Bioacumulación (BAF) e Índice de translocación (<i>Ti</i>) de cobre en <i>Prosopis juliflora</i> durante 48 horas de exposición.	47
Cuadro 10. Factor de Bioacumulación (BAF) e Índice de translocación (<i>Ti</i>) de cadmio en <i>Prosopis juliflora</i> durante 48 horas de exposición.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
	.
Figura 1. Estrategias de respuestas de las plantas al incrementar la concentración de metal en suelo (Modificado de Hunt <i>et al.</i> , 2014).	8
Figura 2. Estructura química de la fitoquelatina (modificado de Adam <i>et al.</i> , 2009).	13
Figura 3. Efecto de la exposición de semillas de <i>P. juliflora</i> a Cu^{2+} y Cd^{2+} a los diferentes tiempos de exposición.	16
Figura 4. Colecta de las plantas de <i>P. juliflora</i> para la evaluación de las variables fisiológicas y bioquímicas: eficiencia fotosintética, fuga de electrolitos y pigmentos fotosintéticos.	18
Figura 5. . Preparación y análisis de las muestras de tejidos (hoja, tallo y raíz) de <i>P. juliflora</i> por medio del equipo ICP-OES a las 48 h después de la exposición a Cu^{2+} y Cd^{2+} .	21
Figura 6. Extracción de ARN total de embriones de (<i>P. glandulosa</i> y <i>P. juliflora</i>) expuestos a cobre y cadmio. Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus; Carril 1: [10 mM] Cu^{2+} , Carril 2: [50 mM] Cu^{2+} , Carril 3: [100 μM] Cd^{2+} , Carril 4: [1000 μM] Cd^{2+} , (E-Pg); Carril 6: [10 mM] Cu^{2+} , Carril 7: [50 mM] Cu^{2+} , Carril 8: [100 μM] Cd^{2+} , Carril 9: [1000 μM] Cd^{2+} , (E-Pj).	28
Figura 7. Amplificación del gen de Actina de embriones (<i>P. glandulosa</i> y <i>P. juliflora</i>) expuestos a metales. Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus; Carril 1: Control; Carril 2 [100 μM] Cd^{2+} , Carril 3: [0.1 μM] Cd^{2+} , Carril 4: Control; Carril 5: [10 mM] Cu^{2+} , Carril 6: [50 mM] Cu^{2+} .	29
Figura 8. Germinación de <i>P. juliflora</i> a 96 horas después de su exposición a diferentes dosis de CdCl_2 .	30
Figura 9. Índice de tolerancia de <i>P. juliflora</i> a las 96 horas después de su exposición a diferentes dosis de CdCl_2 .	31
Figura 10. Germinación de <i>P. juliflora</i> a 96 h después de su exposición a diferentes dosis de CuSO_4 .	32
Figura 11. a: Inhibición del crecimiento radicular y b: daño estructural de las semillas <i>P. juliflora</i> a 96 h después de su exposición a diferentes dosis de CuSO_4 .	33
Figura 12. Cambios en los valores de Fv/Fm del tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu^{2+} .	34

Figura 13. Cambios en los valores de Fv/Fo del tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu ²⁺ .	35
Figura 14. Cambios en los valores de Fo/Fv del tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu ²⁺ .	36
Figura 15. Cambios en los valores de Fv/Fm del tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cd ²⁺ .	37
Figura 16. Cambios en los valores de Fv/Fo y Fo/Fv del tejido foliar de <i>P. juliflora</i> expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu ²⁺ .	38
Figura 17. Valores de fuga de electrolitos de plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu ²⁺ . Los valores son expresados como medias ± S. D.	39
Figura 18. Valores de fuga de electrolitos de plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd ²⁺ . Los valores son expresados como medias ± S. D.	40
Figura 19. Cambios de clorofila a (a), b (b) y total (c) en plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu ²⁺ .	41
Figura 20. Contenido de carotenoides en plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu ²⁺ .	42
Figura 21. Cambios de clorofila a (a), b (b) y total (c) en plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd ²⁺ .	43
Figura 22. Contenido de carotenoides en plantas de <i>P. juliflora</i> tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd ²⁺ .	44
Figura 23. Contenido de cobre en parte aérea de <i>P. juliflora</i> a diferentes tiempos de exposición.	45
Figura 24. Distribución de cobre en parte radicular de <i>P. juliflora</i> a diferentes tiempos de exposición.	46
Figura 25. Distribución de cadmio en parte aérea de <i>P. juliflora</i> a diferentes tiempos de exposición.	48
Figura 26. Distribución de cadmio en parte radicular de <i>P. juliflora</i> a diferentes tiempos de exposición.	49
Figura 27. Amplificación de MTs de embriones de <i>P. glandulosa</i> expuesta a 4, 8 y 12 hr con CuSO ₄ [100 mM] y [100 μM] de CdCl ₂ . Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus. Carril 1-3: Mt1, Mt2 y Mt3 a las 4 hr de exposición; Carril 4-6: Mt1, Mt2 y Mt3 a las 8 hr de exposición; Carril 7-9: Mt1, Mt2 y Mt3 a las 12 hr de exposición.	51

-
- Figura 28.** Niveles de expresión del gen PjFQs en plántulas de *P. juliflora* y *P. glandulosa* expuesta a 24 h con metales. Carril MP de peso molecular 1kb Plus. Carril 1-3: *P. glandulosa* con Cu^{2+} .y *P. juliflora* con Cd^{2+} . 52
- Figura 29.** (a) Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de FQs reportado en otras plantas. (b) y (c) Alineación de nucleótidos correspondientes a secuencias del gen FQs de diferentes plantas. 53
- Figura 30.** Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de MT-1 reportado en otras plantas. 66
- Figura 31.** Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de MT-2 reportado en otras plantas. 67
- Figura 32.** Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de MT-3 reportado en otras plantas.
- Figura 33.** Depósito de secuencias en la base de datos del *GenBank* correspondientes a los genes MT's de *P. glandulosa* y FQ's de *P. juliflora*. 70

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el resultado del desarrollo de asentamientos poblacionales y actividades antropogénicas como la minería, han favorecido a una mayor persistencia y bio-disponibilidad de elementos químicos en los ecosistemas semiáridos afectando de esta forma su estructura y función (Abdul *et al.*, 2009; Del toro *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). Los metales pesados pueden ser esenciales o no esenciales para los seres vivos, pero todos ellos en exceso representan un riesgo potencial para la salud de las especies que habitan estos ecosistemas entre ellas al ser humano (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008). El empleo de la fitorremediación como una de las tecnologías de remediación disponibles para la recuperación de suelos contaminados con metales (esenciales y no esenciales) en diferentes ecosistemas, ha demostrado ser una tecnología factible a través de la vegetación nativa comparada con los métodos físico-químicos debido a que ofrece un menor impacto ambiental y un menor costo económico (Salt y Kramer, 2000; Mullapudi *et al.*, 2008). La fitorremediación es una tecnología verde que se puede aplicar para la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en diferentes ambientes (suelo, agua o aire) mediante procesos que involucran al tejido foliar, las raíces y microorganismos rizosféricos asociados a las plantas (Newman y Reynolds, 2004; Haque *et al.*, 2009). Actualmente, existe un interés creciente en determinar las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas de los mecanismos de tolerancia y acumulación de metales esenciales y no esenciales en plantas de ambientes semiáridos (Verbruggen *et al.*, 2009). En este sentido, las plantas de mezquite (*Prosopis* sp.) representan un modelo idóneo para el estudio de los procesos involucrados en la tolerancia a metales.

El mezquite es una planta de la familia de las leguminosas perteneciente al género *Prosopis*, se encuentra ampliamente distribuida principalmente en ambientes áridos y semiáridos de México y Estados Unidos de Norte América (Rzedowski, 1988). Estas plantas pueden ser cultivadas de manera eficiente en condiciones controladas a nivel de laboratorio y en invernadero. Además presentan propiedades metabólicas y genéticas que le permite desarrollarse en presencia de altas temperaturas, estrés hídrico y salino (Villagra *et al.*, 2005). Estas propiedades hacen que el mezquite pueda ser considerado como un organismo con potencial biotecnológico en la fitorremediación de ambientes áridos y semiáridos afectados por la presencia de metales.

Por lo tanto en el presente trabajo se estudió la expresión de los genes que codifican los genes de las metalotioneinas y la fitoquelatin sintetasa, así como el efecto a nivel fisiológico y morfológico en especies de plantas de *Prosopis* sp expuestas a cobre Cu^{2+} y cadmio Cd^{2+} .

II. HIPÓTESIS

La exposición de plantas de *Prosopis sp.*, a diferentes dosis de Cu^{2+} (esencial) y Cd^{2+} (no esencial) inducen la activación de mecanismos de tolerancia a nivel molecular como la expresión de fitoquelatina sintetasa (*FQS*) y metalotioneínas (*Mts*), para mantener la estabilidad celular y contrarrestar los efectos negativos de los metales esenciales y no esenciales en la fisiología de la planta.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar los cambios a nivel molecular y fisiológico en plantas de *Prosopis sp.*, expuestas a elementos esenciales (Cu^{2+}) y no esenciales Cd^{2+} .

3.2. Objetivos particulares

- 1 A nivel fisiológico, evaluar el efecto del Cu^{2+} y Cd^{2+} en la inhibición de la fotosíntesis de *P. juliflora* (SW) mediante la determinación de parámetros fotosintéticos como fluorescencia de clorofila, pigmentos fotosintéticos y fuga de electrolitos.
- 2 Evaluar la capacidad de bioacumulación de *P. juliflora* (SW) al ser expuesta a Cu^{2+} y Cd^{2+} y determinar el índice de transferencia de estos metales en la planta.
- 3 A nivel molecular, identificar y evaluar la expresión de los genes de metalotioneínas, *Mt1*, *Mt2* y *Mt3*. Así como la inducción del gen de *FQS* en diferentes tejidos de *P. glandulosa* (SW) y *P. juliflora* expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} , mediante la técnica de RT-PCR.

IV. ANTECEDENTES

4.1 *Importancia de las Zonas Áridas y Semiáridas*

Las regiones áridas y semiáridas en el mundo se caracterizan por presentar una baja disponibilidad de agua cuantificada a base de la precipitación media anual en relación con la evaporación de un área geográfica determinada (Padmavathiamma *et al.*, 2014). De tal forma que cuando esta relación es menor a 0.65 se considera zona de clima árido y semiárido (Mazuela, 2013). Entre los factores que pueden influir en la presencia de una alta evaporación se encuentran: la radiación solar incidente, la presión de vapor del aire, gran fluctuación de temperaturas diurna/ nocturna y la velocidad del viento (UNESCO, 2006). Los cuales pueden favorecer a la presencia de sales en el suelo, provocando la salinización de los mismos. Por otro lado, factores como la capacidad de retención de agua, textura, profundidad y contenido de materia orgánica en los suelos, podrían ser un aspecto importante en el proceso de salinización (Goykovic, 2012). En México las zonas áridas y semiáridas, representan más del 40% de la superficie total del territorio y se localizan principalmente en el altiplano Mexicano en la parte central y norte del país (CNA, 2002). La importancia de la región norte y noroeste del país, radica en la población cercana a los 77 millones que aportan el 84% del producto interno bruto del sector agrícola a nivel nacional (Sánchez *et al.*, 2007); aún cuando se caracteriza por ser una zona semiárida con precipitaciones anuales del 20% del total a nivel nacional (Tortajada, 1998).

4.2 Presencia de elementos potencialmente tóxicos en ecosistemas semiáridos

El término elementos potencialmente tóxicos (EPTs) se refiere a los elementos esenciales y no esenciales que pueden generar síntomas de toxicidad e inhibición del crecimiento en las plantas (Dietz *et al.*, 1999).

En las últimas décadas y particularmente a partir de los años ochenta, Baja California (BC), México, ha sido una de las zonas agrícolas más productivas del país, con un elevado volumen de exportación local e internacional de productos hortícolas, siendo las zonas de mayor producción San Quintín y el valle de Mexicali. El valle de Mexicali se caracteriza por tener un clima árido, en donde el principal aporte del agua para uso en los diversos sectores procede del Tratado Internacional de Límites y Aguas celebrado con México en 1944 (Quintero-Nuñez y Moncada-Aguilar, 2008). No obstante, factores antropogénicos como la urbanización, la presencia de la industria geotérmica y las actividades agropecuarias, pueden aportar cantidades importantes de EPTs al ambiente representando un riesgo latente para la salud de la población y la estabilidad del valle de Mexicali (Han y Singer, 2007; Gómez-Puentes *et al.*, 2014). Por otra parte, las variaciones ambientales características de los sitios semiáridos tienden a modificar, las propiedades edáficas de los suelos del valle de Mexicali (pH alcalino, anoxia, salinidad y actividad microbiana), modificando los procesos de acumulación, biodisponibilidad y movilización de EPTs en estos edafosistemas (Espinosa-Reyes, 2014). Por ejemplo, el riego y la fertilización en las zonas áridas pueden provocar un aumento de las concentraciones de EPTs en la zona de la raíz debido a la alta evapotranspiración y formación de sales (Oren *et al.*, 2004). Adicionalmente, las actividades mineras en la región han provocado, la incorporación de grandes

cantidades de EPTs al ambiente a través de sus procesos de extracción y manejo de residuos (Mendez y Maier, 2008; Salas-Luévano, 2009; Huerta-Díaz, *et al.*, 2014).

Algunos metales esenciales y no esenciales como el Cu^{2+} y el Cd^{2+} son comúnmente encontrados en altas concentraciones en los suelos de los ambientes áridos y semiáridos, en donde pueden causar efectos negativos a la salud de las plantas (Abbaslou *et al.*, 2014). En el caso del Cu^{2+} , su presencia en el ambiente puede ser resultado de actividades mineras, industria metalúrgica y electrónica (Jadhav y Hocheng, 2012). Por su parte, las actividades agropecuarias, principalmente, la aplicación de fertilizantes fosforados, aguas residuales y la sobre explotación de pozos de riego, son las principales fuentes de aporte de Cd^{2+} al suelo (Cheng, S., 2003). Los efectos y los mecanismos de desintoxicación del Cu^{2+} en las plantas son mejor comprendidos que los del Cd^{2+} . En forma general se sabe que ambos metales ocasionan una disminución en la asimilación del carbono, generan estrés oxidativo, afectan la capacidad fotosintética e inhiben el crecimiento (Das *et al.*, 1997; Yruela, 2009; Zhou y Qiu, 2005).

4.3 Tolerancia de las plantas a los EPTs en ambientes áridos y semiáridos

En las regiones áridas y semiáridas, las plantas están expuestas a una serie de factores físico-químicos, temperaturas extremas, baja precipitación, vientos de alta velocidad y presencia de EPTs que afectan su crecimiento, desarrollo y productividad (Padmavathiamma *et al.*, 2014). Las plantas presentan una serie de mecanismos celulares que pueden estar participando en la tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. Estos mecanismos son diversos e involucran la asociación con microorganismos simbióticos, el secuestro del metal en la pared celular de la planta, la

precipitación con exudados radicales, la reducción de la absorción del metal por la membrana plasmática y la quelación del metal en el citosol por diversas moléculas.

Además la presencia de transportadores específicos localizados en el tonoplasto que permiten el secuestro del metal y su transporte a vacuolas, no se descarta. De tal forma que estos mecanismos permiten a la planta mantener la concentración de los EPTs dentro de los límites fisiológicos permisibles en las células, favoreciendo su desarrollo fisiológico en ambientes extremos (González-Mendoza y Zapata-Pérez, 2008; Yong-Hoe *et al.*, 2013). La presencia de tolerancia a EPTs en las plantas puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies, la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos esenciales y no esenciales (Linhart y Grant, 1996; Hall 2002). Donde los cambios evolutivos que han dado origen a la tolerancia son resultado del desarrollo de una serie de mecanismos eficientes y específicos que permiten mantener la adsorción de elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles; además de proporcionar la capacidad de inactivar metabólicamente los elementos esenciales y no esenciales cuando representan un riesgo para la integridad celular (Linhart y Grant, 1996; Cai y Ma, 2002).

Autores como Shat *et al.*, (2000), han clasificado a la tolerancia de acuerdo a la serie de mecanismos moleculares o bioquímicos que la conforman en: a) co-tolerancia, la cual puede ser el resultado de un mecanismo específico que confiere una tolerancia a diversos metales; b) múltiple-tolerancia, en donde la tolerancia es generada por una serie de mecanismos independientes para cada metal o metales que interaccionan de manera conjunta, para evitar el daño a la planta. De estas dos ideas, las evidencias

sugieren que la múltiple-tolerancia es la que se encuentra presente en la mayoría de las plantas (Macnair *et al.*, 2000).

La presencia de múltiple-tolerancia ha permitido que las plantas desarrollen tres estrategias básicas (Figura 1), para establecerse en suelos con niveles tóxicos de metales: a) exclusión: esta estrategia consiste en una limitada acumulación de metales en las partes aéreas de las plantas e involucra una acumulación preferente en el sistema radical; b) indicadoras: esta estrategia se caracteriza porque las plantas acumulan metales en sus tejidos que generalmente reflejan los niveles de metales presentes en el ambiente. Ejemplo de ello se ha encontrado a los musgos (*Bryophyta*) como bioindicadores de altas concentraciones de metales en agua y a *Stanleya pinnata* (Prince's Plume) como indicadora de selenio (Se) (Wendy Ann Peer *et al.*, 2005) y c) hiperacumulación: se caracteriza por la capacidad de la planta de bioacumular altas concentraciones de metales en sus tejidos principalmente en las partes aéreas (Baker, 1981; Baker y Walker, 1990; Vogel-Mikuš *et al.*, 2006). Así mismo, se ha propuesto definir la hiperacumulación como el cociente de las concentraciones del metal de los brotes a la raíz (o índice de translocación), que normalmente es >1 en hiperacumuladoras (van der Ent *et al.*, 2013).

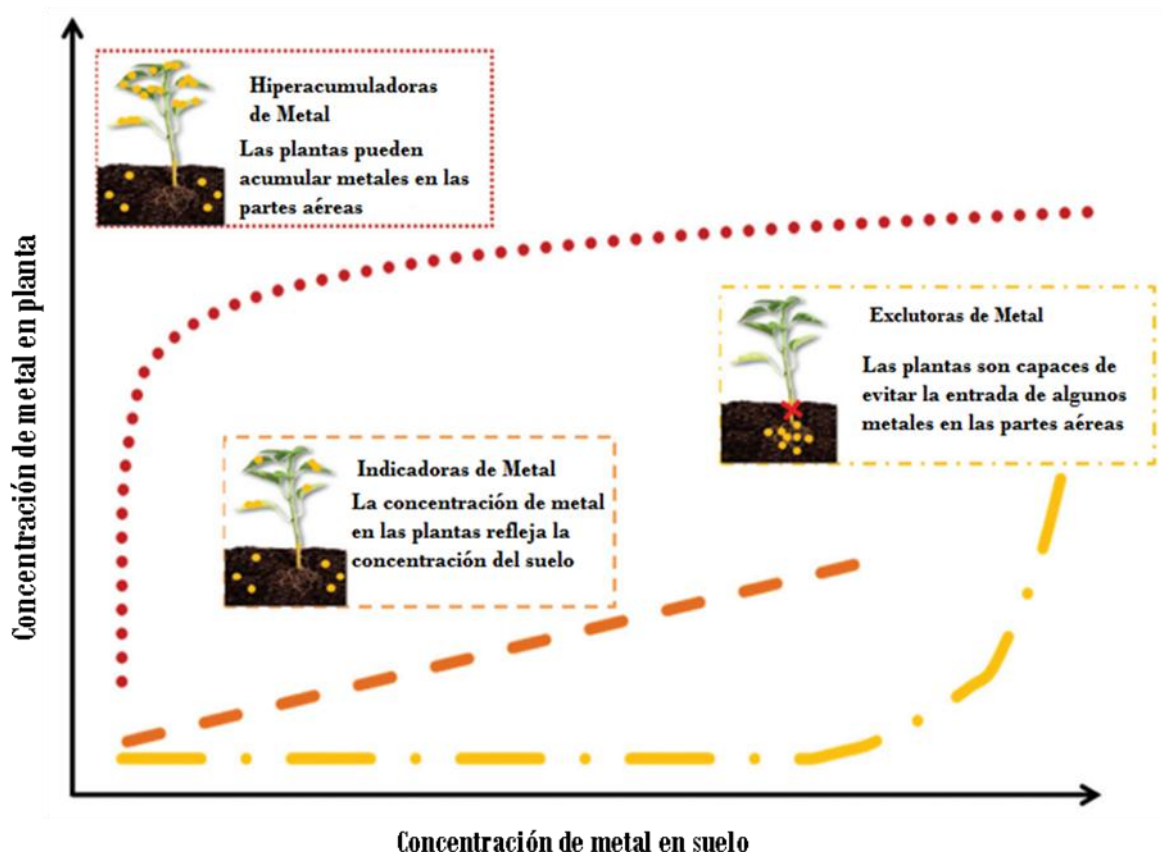


Figura 1. Estrategias de respuestas de las plantas al incrementar la concentración de metal en suelo (Modificado de Hunt *et al.*, 2014).

4.4 Tolerancia del mezquite a EPTs

La restauración ambiental implica la selección, justificación, optimización y aplicación de las técnicas adecuadas para la recuperación de áreas afectadas. Parte de estas metodologías (fitotecnologías) consideran el uso de las plantas, dado su bajo impacto ambiental (Chaney *et al.*, 1997; Iskandar y Adriano, 1997; Vidal-Durango *et al.*, 2010). El término genérico "fitorremediación" atribuye al prefijo griego *fito* (planta), adscrito al latín raíz *remedium* (para corregir o eliminar un mal). La fitorremediación es una solución tecnológica eficaz y factible utilizada para extraer los metales del suelo de manera respetuosa a su entorno (Voijant Tangahu *et al.*, 2011; Padmavathiamma *et al.*, 2014).

Por otro lado, en la fitorremediación de sitios contaminados en regiones áridas y semiáridas se considerado recientemente el uso de especies de *Prosopis sp.* (Padmavathiamma *et al.*, 2014). Estas especies poseen una serie de diversos mecanismos que involucra una gran variedad de compuestos quelatantes que podrían desempeñar un papel importante en la fisiología y la protección contra el estrés causado por los metales en la planta (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009). Por ejemplo en plántulas de *P. laevigata* sometidas a estrés por Pb (II) y Ni (II) en medios de cultivo, se demostró que esta especie presentaba una alta capacidad de bioacumular dichos elementos en sus tejidos, indicando una posible translocación de los elementos tóxicos de las raíces hacia las partes aéreas. De la misma manera, con base en el factor de bioacumulación obtenido (Ni superior a 32 y por arriba de 21 para Pb), se determinó que *P. laevigata* puede ser una especie prometedora para fines de fitorremediación de Pb (II) y Ni (II) (Buendía-González *et al.*, 2010). Por otra parte, Beramendi-Orosco *et al.*, (2013) determinaron que especies de *P. juliflora*, pueden ser buenas indicadoras de contaminación en sitios con altas concentraciones de metales pesados como (Cu, Pb y

Zn), debido a una alta capacidad de acumulación y baja movilidad de dichos metales en el tallo, lo que proporciona información acerca de la cronología y las fuentes de contaminación en los sitios analizados a través del tiempo. Así mismo, Usha *et al.*, (2009), observaron que *P. juliflora* al ser tratadas con Cd (300 μ M), Cu (500 μ M) y Zn (1 mM), es capaz de acumular dichos metales y expresar proteínas quelatantes, las cuales fueron denominadas como: *PjMT1*, *PjMT2* y *PjMT3*. Similares resultados fueron observados por Jayaram y Prasad (2009) en plantas de *P. juliflora* crecidas en soluciones acuosas de Pb.

En base a lo anterior se pueden indicar que los mezquites (*Prosopis sp*) son especies que presentan una serie de mecanismos bioquímicos y fisiológicos que le permiten desarrollarse en ambientes con presencia de diferentes tipos de metales (Varun *et al.*, 2011). *Prosopis juliflora* podría ser considerada como una especie prometedora en procesos de fitorremediación en ambientes áridos o semiáridos. Sin embargo, los estudios realizados sobre la expresión de los genes que codifican a proteínas o moléculas quelatantes son escasos. Por lo que estudios encaminados a identificar la presencia de metalotioneinas y fitoquelatin sintetasa en *Prosopis juliflora* en México son necesarios para determinar el potencial de esta especie como fitorremediadora en ecosistemas semidesérticos contaminados por metales en el noroeste del país.

4.5 Las Metalotioneinas y Fitoquelatinas de las plantas

Las metalotioneinas (MTs) son proteínas ubicuas ricas en cisteínas (Cys) con gran afinidad por los iones de metales divalentes. La expresión de genes MTs en plantas es inducida no sólo por los elementos esenciales, sino también por elementos no esenciales. Actualmente, se sugiere que las MTs están implicadas en los procesos de

regulación homeostática celular de elementos potencialmente tóxicos, pudiendo funcionar como “scavengers” de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por metales (Ren y Zhao, 2009; Samardzi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Las MTs de plantas contienen generalmente dos dominios pequeños ricos en cisteína (10-17 residuos de cisteínas cada uno) y una gran región espaciadora (30-50 residuos) carentes del aminoácido Cys, tienen pocos residuos de histidina y el número de aminoácidos aromáticos varía de cero a varios aa. Basado en la distribución de los residuos de cisteína, el número de aminoácidos aromáticos y la longitud de la región espaciadora se clasifican en cuatro tipos (MT tipo I, II III y IV) (Domènech *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012).

En estudios recientes Zhang *et al.*, (2009) han sugerido que el nivel de expresión génica de MT-2 se relaciona con el nivel de tolerancia a Cu en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente, la expresión de la isoforma MT-2b demostró una cosegregación en genotipos tolerantes a Cu en *Silene vulgaris*.

Por su parte Lv *et al.*, (2013), observaron que las *AtMT-3* y *AtMT-2a* reducen los niveles de ROS en las células guarda de plantas de *Vicia faba* expuestas a metales no esenciales como Cd^{2+} . Así mismo, se demostró en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, que la expresión de *BcMT1* y *BcMT2* incrementan la tolerancia a Cu^{2+} y Cd^{2+} y disminuyen la producción de ROS inducida por los metales, protegiendo de esta manera a las plantas del estrés oxidativo.

Similares resultados fueron obtenidos en plantas de *Casuarina glauca* y *Brassica rapa*, en donde la expresión de *CgMT1* y *BrMT1* respectivamente, disminuyeron los niveles de producción de ROS provocados por efecto del metal (Kim *et al.*, 2007; Obertello *et al.*, 2007).

4.6 Fitoquelatinas

Las Fitoquelatinas (FQs) son una familia de pequeños polipéptidos ricos en tiol derivados del glutatión que presentan la fórmula general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde (n) generalmente oscila de 2 a 11. Estos polipéptidos son producidos en las plantas después de la exposición a cantidades excesivas de elementos tóxicos (Miszczak *et al.*, 2013; Shri *et al.*, 2014) (Figura 2). Fueron identificadas por primera vez como péptidos de unión a cadmio (CBP) en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, posteriormente, estos péptidos se encontraron también en plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, y en nematodos como *Caenorhabditis elegans* (Song *et al.*, 2014).

La principal función de las fitoquelatinas es unir iones metálicos a través de los grupos tiol; por lo tanto, juegan un papel clave en la desintoxicación y la homeostasis de iones metálicos y metaloides en las plantas, especialmente para Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Sb^{3+} , y las especies de arsénico y selenio (Miszczak *et al.*, 2013). Al formar complejos con los elementos tóxicos, las FQs se almacenan en compartimentos celulares como vacuolas y cloroplastos, reduciendo así el efecto nocivo de los iones tóxicos en las células (Estrella-Gómez *et al.*, 2009). Los complejos FQ-M pueden ser bombeados dentro de las vacuolas a través de transportadores de unión a ATP tipo ABC (del inglés ATP-binding cassette); de esta forma, el complejo y el secuestro vacuolar reducen la concentración de metales/metaloides libres en el citoplasma, disminuyendo así su toxicidad (Duan *et al.*, 2011) y los principales compuestos tiol de bajo peso molecular (LMWT) en plantas (Mokgalaka-Matlala *et al.*, 2009).

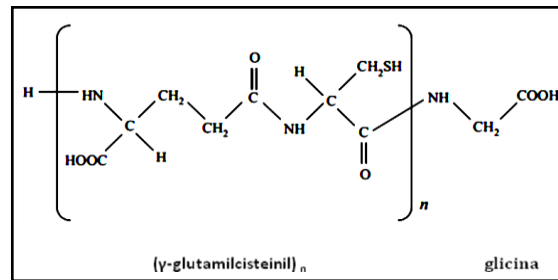


Figura 2. Estructura química de la fitoquelatina (modificado de Adam *et al.*, 2009).

La síntesis enzimática de FQs se activa mediante la unión de iones metálicos a la fitoquelatin sintasa (FQ). Recientes investigaciones han confirmado el postulado de que los complejos de un metal con el glutatión (GSH) o con las FQs, pueden funcionar como co-sustrato adecuado para crear un complejo de metal-enzima a través de intercambio de ligandos (Miszczak *et al.*, 2013).

La fitoquelatin sintasa (FQ) es una enzima expresada constitutivamente y es conocida por la activación post-traducciona en presencia de metales pesados (Shri *et al.*, 2014). Se expresa constitutivamente, pero la síntesis de FQs sólo se induce en la presencia de elementos no esenciales como Cd (II), As (III) y Hg (I) o con concentraciones elevadas de metales de transición esenciales como Zn (II) y Cu (II) (Song *et al.*, 2014). Se ha observado que las FQs desempeñan un papel muy importante en la desintoxicación de los metales pesados. Así mismo, los genes que codifican para las FQ han sido identificados en *Arabidopsis* (*AtPCS1*), *trigo* (*TaPCS1*), *Schizosaccharomyces pombe* (*SpPCS*) y *Caenorhabditis elegans* (*CePCS1*) (Shri *et al.*, 2014).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA-UABC) de la Universidad Autónoma de Baja California. Con estancias cortas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán y Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. Para el análisis a diferentes niveles de organización (molecular, bioquímico y fisiológico) de *Prosopis juliflora* y *Prosopis glandulosa* tratadas con diferentes concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} . Se procedió previamente a colectar semillas de las especies antes mencionadas, para su germinación en condiciones de invernadero.

5.1 Colecta del germoplasma de *Prosopis juliflora*

El germoplasma de *Prosopis juliflora* y *Prosopis glandulosa* fue proporcionado por el banco especializado en el resguardo de semillas forestales, de árboles y arbustos, nativos o endémicos de interés comercial, operado por la Comisión Nacional Forestal en Baja California (CONAFOR) en Septiembre de 2012. Las semillas, fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA-UABC) para su desinfección con una solución de NaOCl (Clorox) al 1% por 3 min. Finalmente se realizaron cuatro lavados sucesivos con agua destilada estéril (dos minutos por lavado) para eliminar el exceso del desinfectante.

5.2 Germinación de las semillas de *Prosopis juliflora*

El mezquite generalmente presenta problemas de germinación de las semillas ya que poseen una cubierta dura e impermeable que impide el paso del agua (Rivas Medina *et al.*, 2005). Debido a ello, en el presente estudio se aplicó un tratamiento pre-germinativo para romper el letargo en las semillas de *Prosopis juliflora* y *Prosopis*

glandulosa, respectivamente, lo que a su vez incrementa la eficiencia en su germinación (Villareal-Garza *et al.*, 2013). Para la escarificación de las semillas de mezquite se utilizaron 160 semillas de cada especie, las cuales fueron sumergidas en agua caliente a 75 °C durante 5 minutos. Posteriormente las semillas de cada especie de mezquite se colocaron en cajas de Petri sobre papel filtro humedecido y se mantuvieron en cámara bioclimática (Mark III Environmental Chamber de Lab-line) con un fotoperiodo de 12 horas de luz: oscuridad y 60% de humedad relativa a una temperatura 28 ± 1 °C. Se realizaron 5 repeticiones con 10 semillas en cada caja; y el porcentaje de germinación (G%) se registró diariamente por un período de tres días mediante la observación del número de semillas germinadas al inicio y al final del experimento (Hartmann y Kester, 1982).

5.3 Determinación de las dosis subletales de Cu^{2+} y Cd^{2+} en *P. juliflora*

Una vez que se comprobó la viabilidad de las semillas, se procedió a determinar la dosis letal media (LC_{50}) de Cu^{2+} y Cd^{2+} para ser utilizadas en los subsiguientes experimentos de esta investigación. Se implementó para ello la técnica de exposición de semillas a metales propuesta por Mami *et al.*, (2011) que permite realizar una evaluación rápida de la toxicidad por los EPTs en las plantas.

Para determinar la LC_{50} en *P. juliflora*, se probaron las dosis de metales: Cu^{2+} (0.1 mM, 1 mM y 10 mM) y Cd^{2+} (50 μM , 100 μM , 1000 μM).

El experimento consistió en exponer semillas de *P. juliflora* por 24 h a una solución (15 ml) de diferentes concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} , preparadas con agua destilada-desionizada estéril (dde). Los grupos controles consistieron en exponer las semillas solo al agua dde (Figura 3).

Durante este experimento, se evaluó los siguientes parámetros: porcentaje de germinación e índice de tolerancia a los metales y viabilidad celular con la técnica de tinción vital con azul de Evans al 1% y lipoperoxidación (reactivo de Schiff) (Lehotai *et al.*, 2011). El análisis se realizó utilizando un tamaño de muestra de 10 semillas para cada concentración y el experimento se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar las siguientes concentraciones para cada tipo de metal: Cu^{2+} (10 mM, 50 mM y 100 mM) y Cd^{2+} (50 μM , 100 μM , 1000 μM).



Figura 3. Efecto de la exposición de semillas de *P. juliflora* (SW) a Cu^{2+} y Cd^{2+} a los diferentes tiempos de exposición.

3.4 Exposición de las plantas de *P. juliflora* a metales en condiciones hidropónicas

Para evaluar las respuestas a nivel molecular, fisiológico y morfológico en el tejido foliar de *P. juliflora* expuestas a Cu^{2+} y Cd^{2+} , se utilizaron un total de 160 plantas de dos meses de edad, crecidas en condiciones de invernadero y con una altura promedio de 36.0 cm y 17 hojas promedio por planta. Las plantas se establecieron en condiciones de hidroponía a dosis crecientes de Cu^{2+} y Cd^{2+} por diferentes períodos de tiempo.

Para la realización de estos experimentos, se establecieron 6 tratamientos más un control utilizando 4 réplicas para cada tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental para plantas de *P. juliflora* tratadas con Cu^{2+} y Cd^{2+} .

Tratamiento	Dosis de metal		Plantas (Número)	Tiempo de exposición (Horas)
	(Cu^{2+})	(Cd^{2+})		
T ₁	10 mM	-	10	4, 8, 12, 24, 48
T ₂	50 mM	-	10	4, 8, 12, 24, 48
T ₃	100 mM	-	10	4, 8, 12, 24, 48
T ₄	-	50 μM	10	4, 8, 12, 24, 48
T ₅	-	100 μM	10	4, 8, 12, 24, 48
T ₆	-	1000 μM	10	4, 8, 12, 24, 48
Control	-	-	10	4, 8, 12, 24, 48

Al finalizar el tiempo de exposición de *P. juliflora* a las concentraciones de metales, se procedió a la colecta del material vegetal para evaluar los cambios fisiológicos y bioquímicos (Figura 4). Adicionalmente, fueron evaluados para cada tratamiento los parámetros de crecimiento: número de hojas, altura, longitud radicular y peso fresco de las muestras.



Figura 4. Colecta de las plantas de *P. juliflora* para la evaluación de las variables fisiológicas y bioquímicas: eficiencia fotosintética, fuga de electrolitos y pigmentos fotosintéticos.

3.5 Determinación de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) de *P. juliflora*

Para evaluar el daño al fotosistema II en las plantas de *P. juliflora* causado por Cu^{2+} y Cd^{2+} se determinó la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) a las 4, 8, 12, 24, 48 horas después de la exposición a los metales mediante un fluorómetro portátil Modelo Mini-PAM-2100 Chlorophyll Fluorescence System WALZ (Yuan *et al.*, 2013). Las mediciones se realizaron en hojas completamente expandidas y en condiciones fitosanitarias adecuadas. Las hojas seleccionadas se sometieron a un período de adaptación a la oscuridad por 20 min y posteriormente las hojas se irradiaron con una luz actínica de $2100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad por un período de 2 segundos para obtener los datos de fluorescencia de acuerdo a Sanclemente y Peña (2008).

3.6 Determinación de la fuga de electrolitos mediante la conductividad eléctrica (CE) del tejido foliar de *P. juliflora*

La determinación de la fuga de electrolitos en *P. juliflora* expuesta a diferentes dosis de Cu^{2+} y Cd^{2+} , se realizó mediante la metodología propuesta por Cruz (2002) con ligeras modificaciones. La metodología consistió en utilizar tres folíolos de las hojas intermedias de *P. juliflora*, de cada uno de los tratamientos al final del experimento por

triplicado. Los folíolos de cada tratamiento se suspendieron en 10 mL de agua bidestilada y desionizada y se mantuvieron en agitación a 100 rpm por 2 horas a 25 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo de agitación, se determinó la CE (conductividad eléctrica) usando un conductímetro (ORION, modelo 162).

Después de la primera medición de cada tratamiento, las muestras fueron esterilizadas a 120 °C y 2 atmósferas de presión por 15 min para garantizar la plasmólisis celular total. Posteriormente, las muestras se dejaron reposar por 24 horas y se cuantificó de nuevo la CE total. La fuga de electrolitos para cada tratamiento se expresó en $\mu\text{S cm}^{-1}$ y fue calculada mediante la siguiente fórmula (Begum *et al.* 2014): $(\text{ECf}-\text{ECi}/\text{ECt}-\text{ECi}) \times 100$.

Donde:

ECf= conductividad eléctrica final

ECi= conductividad eléctrica inicial

3.7 Determinación de pigmentos fotosintéticos: contenido de clorofilas (a, b y total)

La determinación de pigmentos fotosintéticos en *P. juliflora* se realizó a las 4, 8, 12, 24, 48 horas después de la exposición a las diferentes dosis de Cu^{2+} y Cd^{2+} . La obtención de los pigmentos fotosintéticos se extrajeron mediante maceración en condiciones de oscuridad en un mortero previamente enfriado usando 5 mL de acetona fría al 80% y 0.2 g de tejido foliar (Borell *et al.* 2000). Posteriormente, el extracto obtenido de cada tratamiento se colocó en tubos de 15 mL y se centrifugaron por 10 minutos a 14 000 rpm, dejándose reposar por 5 min en completa oscuridad. Posteriormente, se registraron los valores de las lecturas de las muestras a 470 nm, 646 nm, y 663 nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20). Los valores de los

pigmentos fotosintéticos, *Chla*, *Chlb*, *Chl* total y carotenoides fueron calculados usando la fórmula propuesta por Gashi *et al.*, (2013):

- **Clorofila A** (A_{663}) ($\mu\text{g/mL}$) = $12.21 (A_{663}) - 2.81(A_{646})$
- **Clorofila B** (A_{646}) ($\mu\text{g/mL}$) = $20.13 (A_{646}) - 5.03 (A_{663})$
- **Clorofila Total** ($\mu\text{g/mL}$) = Clorofila A + Clorofila B
- **Carotenoides** $Cx + c = (1000 A_{470} - 3.27Ca - 104Cb)/198$

Los datos obtenidos de cada pigmento se reportaron como $\mu\text{g/ml}$ de peso fresco (PF).

3.8 Determinación de Cu^{2+} y Cd^{2+} en los diferentes tejidos de *P. juliflora*

Una vez que las plantas se expusieron a las concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} por 48 h, se procedió a lavarlas con EDTA 10 mM, seguido de un enjuague con agua desionizada para eliminar el Cu^{2+} y Cd^{2+} superficial. Posteriormente, los tejidos (hojas, tallos y raíces) se liofilizaron, hasta obtener su peso constante (Malec *et al.*, 2009). Para realizar el análisis de los metales en los tejidos de *P. juliflora*, 200 mg de cada tejido (hojas, tallos y raíces) se pusieron a digestión con 200 μl de ácido nítrico (HNO_3) (69 %) y se mantuvieron a 80 °C en baño maría durante 3 horas como mínimo o hasta obtener la digestión total de la muestra (Haque *et al.*, 2009). La biomasa completamente digerida se aforó a 2 mL con agua desionizada e inmediatamente se homogenizaron por 5 minutos a máxima velocidad en el vórtex. Enseguida, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, las muestras de tejido, se enfriaron y se pusieron en tubos de grafito piro-recubiertos (por triplicado), en donde se les determinó las concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} mediante un espectrofotómetro de ICP-OES (ES-Plasma 400, PERKIN ELMER) a las siguientes longitudes de onda (λ) 228.8 y 324.8 nm, respectivamente (Figura 5).

La exactitud del método analítico se controló empleando un material de referencia certificado (BCR 279, *Ulva lactuca*), con un porcentaje de recuperación entre 91-95 % para Cu^{2+} y Cd^{2+} . Adicionalmente, se realizaron curvas de calibración usando concentraciones estándar conocidas de Cu^{2+} y Cd^{2+} (50, 20, 5, 2, 0.5 ppm) respectivamente (Martí *et al.*, 2009; Jiménez-Vieyra y Zambrano-Zaragoza, 2011). Finalmente, la concentración de cada metal en los diferentes tejidos de la planta se expresó en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco (PS).

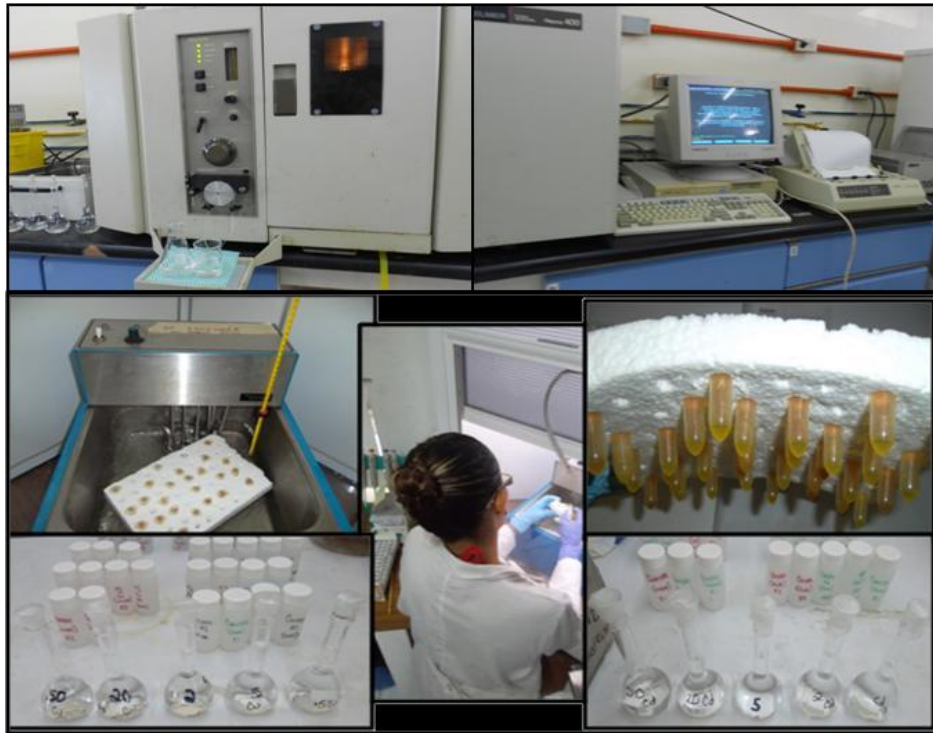


Figura 5. Preparación y análisis de las muestras de tejidos (hoja, tallo y raíz) de *P. juliflora* por medio del equipo ICP-OES a las 48 h después de la exposición a Cu^{2+} y Cd^{2+} .

3.9 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transporte de Cu^{2+} y Cd^{2+} en *P. juliflora*

La absorción de los iones de Cu^{2+} y Cd^{2+} en los diferentes tejidos de *P. juliflora*, se calculó usando el factor de bioacumulación (FBA). Este factor nos proporciona información sobre la habilidad de la planta para acumular metales, con respecto a la

concentración de metales presentes en la solución nutritiva (Zayed *et al.*, 1998; Ghosh y Singh, 2005). El FBA se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{FBA} = \frac{\text{Concentración del metal en el tejido de la planta (ppm)}}{\text{Concentración inicial del metal adicionado a la solución nutritiva (ppm)}}$$

Por otra parte, el índice de transporte (*It*) nos proporciona información sobre la relación existente entre la concentración de metales presentes en el tejido radical y el tejido foliar (tallo y hojas). Este *It* nos muestra la habilidad de *P. juliflora* para transportar los metales de la raíz a las hojas y de esta manera, poder clasificar a la planta en base a su estrategia de tolerancia al metal (Ghosh y Singh, 2005). El *It* se evaluó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$It = \frac{\text{Metal en hojas (ppm)}}{\text{Metal en raíces (ppm)}}$$

3.10 Expresión de genes de MT's (Mt1, Mt2 y Mt3) y de la FQ's en el tejido foliar de *P. juliflora* expuestas a tres concentraciones de Cu²⁺ y Cd²⁺

3.11 Extracción del ARN y síntesis del ADN complementario de *P. juliflora* y *P. glandulosa*

Las muestras de los tejidos (hoja, tallo, raíz y embriones) de las plantas expuestas a los metales y sus controles, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. Para la extracción del ARN total se siguió el método de aislamiento libre de sales de guanidina y fenol saturado descrito por Ghawana *et al.*, (2011) para plantas ricas en metabolitos secundarios. El ARN total obtenido se trató

con DNasa en presencia de un inhibidor de ribonucleasa para evitar su degradación. La integridad del ARN se evaluó espectrofotométricamente y se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La síntesis del ADN complementario se realizó utilizando 5 µg del ARN total y un kit de pre-amplificación SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.12 Diseño de iniciadores específicos para los genes de metalotioneina tipo 1, 2 y 3 y la fitoquelatin sintetasa

Con la finalidad de identificar los genes de *MT's* (*Mt1*, *Mt2* y *Mt3*) y de la *FQ's*, se diseñaron iniciadores específicos en base a las secuencias conservadas de los genes de las *MT's* (Anexo 1). Los iniciadores seleccionados para la evaluación de los genes de metalotioneina tipo 1, 2 y 3 y la fitoquelatin sintetasa se diseñaron utilizando el programa DNASTAR (Lasergene Primer Select Program, DNASTAR, Madison, WI). Los pares de iniciadores para cada uno de los genes consistieron en las siguientes secuencias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados durante la técnica de RT-PCR.

Proteína	Nombre del Primer	Secuencia del Primer	T _m [°C]	Tamaño del Fragmento [pb]
PjMt1	MT1-F	5'-GCTGCGGAAGCAAGATG-3'	62	450
PgMt1	MT1-R	5'-GATGGACCTTTATGGACAACA-3'		430
PjMt2	MT2-F	5'-CAAGTGCGGCTCTGGAT-3'		300
PgMt2	MT2-R	5'-GCTTTCATACAACACCCTCAA-3'		450
PjMt3	MT3-F	5'-GAAAGGCAACGGCTATG-3'		430
PgMt3	MT3-R	5'-TGGATGTGCCTCGTGTAT-3'		300
PjFQs	FQ-F	5'-GGAAAGGACCTTGGAGAT-3'	60	240
	FQ-R	5'-TCGGTGGTACGATGAGATTA-3'		240
Actina	ACT-F	5'-GGATGGGTCAGAAAGGATG-3'	60	500
	ACT-R	5'-CGTCCACTGGCATAACAGA-3'		

3.13 Homología de PgMt2 Isoforma I, PgMt2, PgMt3 y PjFQs

Los productos amplificados con los iniciadores de *PgMt2 Isoforma I*, *PgMt2*, *PgMt3* y *PjFQs* obtenidos en *P. juliflora* y *P. glandulosa* se enviaron a secuenciar a la Universidad de Davis, CA para su verificación. Las secuencias nucleotídicas de *PgMt2 Isoforma I*, *PgMt2*, *PgMt3* y *PjFQs* obtenidas se compararon con secuencias de los genes *MT's* y *FQs* de otros organismos disponibles en la base de datos del GenBank (Cuadro 3, 4, 5 y 6). La alineación y comparación se realizó utilizando el algoritmo de Clustal W (MegAlign, DNASTAR software, Lasergene Versión, 1.02, Madison WI) (Sanger *et al.*, 1997). Los resultados mostraron que las secuencias obtenidas con los iniciadores *PgMt2 Isoforma I*, *PgMt2*, *PgMt3* presentaron una alta homología (80-90%) con secuencias del gen *MT1*, *MT2* y *MT3* presentes en otras plantas (Cuadro 3, 4 y 5). Por otra parte para las secuencias obtenidas con los iniciadores de *PjFQs* mostraron una alta homología (85-89%) con las secuencias del gen *FQS* presente en otras plantas (Cuadro 6). Las tres secuencias de *MT* para ambos organismos, en este estudio se registraron en la base de datos del *GenBank* con las siguientes claves y números de acceso: *PgMt2* (Isoforma 1), [KJ957829.1](#); *PgMt2* [KJ949044.1](#); y *PgMt3* [KJ949045.1](#) (Anexo 2). En el caso de la secuencia de *FQS* obtenida para ambos organismos se registro con la clave y numero de acceso: *PjFQs*, [KJ493795.1](#) (Anexo 3).

Cuadro 3. Homología del gen *PgMt2 Isoforma I* de *P. glandulosa* encontrada en diversas especies de plantas.

Espece	Fragmentos	No. de Acceso	Homología	Valor E	bp
<i>Prosopis juliflora</i>	metallothionein mRNA, complete cds	EU447157.1	97 %	6e-147	542
<i>Leucaena leucocephala</i>	metallothionein mRNA, complete cds	KC355440.1	91 %	5e-58	231
<i>Lotus japonicus</i>	clone JCVI-FLLj-9D6 unknown mRNA	BT142377.1	82 %	3e-30	553
<i>Vigna angularis</i>	MET mRNA for type 2 metallothionein, complete cds	AB176561.1	80 %	2e-22	649

Cuadro 4. Homología del gen *PgMt2* de *P. glandulosa* encontrada en diversas especies de plantas.

Espece	Fragmentos	No. de Acceso	Homología	Valor E	bp
<i>Prosopis juliflora</i>	type 2 metallothionein (MT2) mRNA, complete cds	EU447158.1	98 %	0.0	622
<i>Lotus japonicus</i>	clone JCVI-FLLj-9D6 unknown mRNA	BT142377.1	81 %	2e-51	553
<i>Cicer arietinum</i>	metallothionein-like protein 2-like (LOC101504992), transcript variant X1, mRNA	XM_004492289.1	82 %	2e-22	594

Cuadro 5. Homología del gen *PgMt3* de *P. glandulosa* encontrada en diversas especies de plantas.

Espece	Fragmentos	No. de Acceso	Homología	Valor E	bp
<i>Lotus japonicus</i>	phytochelatin synthase PCS1-8R (pcs1) mRNA, complete cds	AY633847.1	89 %	2e-38	1506
<i>Sesbania rostrata</i>	phytochelatin synthase isoform 4 (PCS) mRNA, complete cds, alternatively spliced	GQ204310.1	88 %	7e-37	1325
<i>Glycine max</i>	metallothionein-like protein 2-like homo-phytochelatin synthase (PCS1), mRNA	NM_001248647.1	85 %	3e-30	1874

Cuadro 6. Homología del gen *PjFQs* de *P. juliflora* encontrada en diversas especies de plantas.

Espece	Fragmentos	No. de Acceso	Homología	Valor E	bp
<i>Lotus japonicus</i>	phytochelatin synthase PCS1-8R (pcs1) mRNA, complete cds	AY633847.1	89 %	2e-38	1506
<i>Sesbania rostrata</i>	phytochelatin synthase isoform 4 (PCS) mRNA, complete cds, alternatively spliced	GQ204310.1	88 %	7e-37	1325
<i>Glycine max</i>	metallothionein-like protein 2-like homo-phytochelatin synthase (PCS1), mRNA	NM_001248647.1	85 %	3e-30	1874

3.14 Análisis de la expresión de *PgMt2* Isoforma I, *PgMt2*, *PgMt3* y *PjFQs* mediante la técnica de RT-PCR

Una vez confirmada la identidad de cada una de las secuencias de *PgMt2* Isoforma I, *PgMt2*, *PgMt3* y *PjFQs* y con la finalidad de establecer posibles diferencias entre los mecanismos de quelación de las plantas expuestas a las distintas dosis de Cu^{2+} y Cd^{2+} , se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de los genes en los tejidos (hoja, tallo, raíz y embriones) de *P. juliflora* y *P. glandulosa* expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} y a distintos tiempos de exposición.

Por su parte, la evaluación de la expresión se realizó mediante la reacción de RT-PCR utilizando un termociclador MultiGene (Labnet). Se utilizaron 2 μL de ADNc como templado, 3 μL de búfer 10x, 2.5 μL de MgCl_2 (50mM), 1 μL de la mezcla de dNTP's (10mM), 0.2 μL de la enzima *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μL) y 2 μL de los iniciadores *PgMt2* Isoforma I, *PgMt2*, *PgMt3* y *PjFQs*. A su vez, se utilizaron como controles internos los iniciadores de 18S (Ambion) y Actina (Sigma) para evaluar la expresión de los genes.

El programa de PCR implementado consistió en una desnaturalización a 94°C por 3 minutos, posteriormente 35 ciclos por 30 segundos a 94°C para desnaturalizar el DNA, 30 segundos a 60°C para el alineamiento de los iniciadores y la extensión por 30 segundos a 72°C, finalmente el programa concluye con 10 minutos de extensión final a 72°C. (Cuadro 7). Los productos de PCR obtenidos, se separaron y se visualizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los fragmentos observados se analizaron por densitometría mediante la utilización del programa ImageJ. Los niveles de expresión de cada uno de los transcritos se reportaron como unidades relativas de expresión resultado de la normalización con el control interno de Actina (Rubio-Piña y Zapata-Pérez, 2011).

Cuadro 7. Programa predeterminado utilizado para la amplificación por PCR.

Pre-desnaturalización	Amplificación de PCR	Extensión final	Almacenamiento
1 Ciclo a 95 °C por 5 min	35 ciclos de:	72 °C por 10min	4 °C por tiempo indefinido
	Desnaturalización: 94 °C por 40seg		
	Alineamiento: 55 °C por 40seg		
	Extensión: 72 °C por 1min		

3.15 Estimación de la calidad de RNA

La pureza y concentración de las muestras de RNA obtenidas de los tejidos de *P. juliflora* (SW) y *P. glandulosa* fueron evaluados espectrofotométricamente mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a diferentes longitudes de onda, obteniendo los radios de OD $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ nm para medida de contaminación por polifenoles/carbohidratos y proteínas, respectivamente (Malnoy *et al.*, 2001). La integridad del RNA se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cargó un total de 3 μ l por muestras y los geles fueron teñidos con bro393muro de etidio y visualizados en un fotodocumentador de luz UV MultiDoc-It Digital Imaging System UVP. Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento con DNasas utilizando RQ1 RNase-Free DNase (Promega) y siguiendo el protocolo comercial.

Cuadro 8. Oligonucleótidos utilizados durante la técnica de RT-PCR.

Muestra	Radios de Absorbancias		Concentración RNA Total (μ g/ μ l)
	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	
1	2	1.92	2.2861
2	2.02	1.81	3.9886
3	2.01	2.15	0.4093
4	2.03	2.19	0.4234
5	2.06	2.2	0.6783
6	2.02	2.01	0.7039
7	1.88	1.98	1.0621

3.16 Estandarización de la técnica de extracción de RNA total de los tejidos de *P. glandulosa* y *P. juliflora*

En el presente estudio, primeramente se llevó a cabo el proceso de estandarización de la técnica de extracción de RNA total de plántulas de *P. juliflora* y *P. glandulosa* expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} y Cd^{2+} y a distintos tiempos de exposición. El RNA total de las muestras utilizadas en cada uno de los tratamientos se extrajo de manera satisfactoria implementando la técnica descrita por Ghawana *et al.*, (2011), para plantas ricas en metabolitos secundarios con algunas modificaciones (Figura 27).

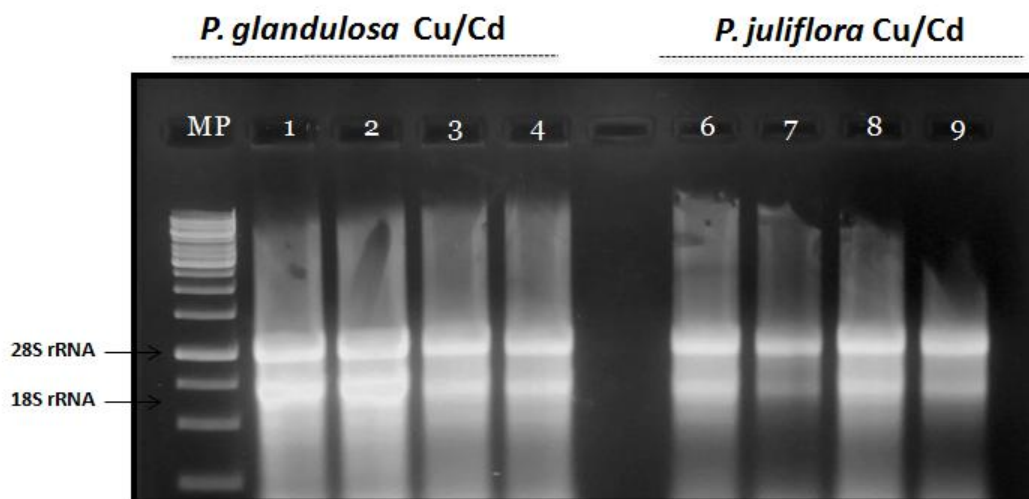


Figura 6. Extracción de ARN total de embriones de (*P. glandulosa* y *P. juliflora*) expuestos a cobre y cadmio. Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus; Carril 1: [10 mM] Cu^{2+} , Carril 2: [50 mM] Cu^{2+} , Carril 3: [100 μM] Cd^{2+} , Carril 4: [1000 μM] Cd^{2+} , (E-Pg); Carril 6: [10 mM] Cu^{2+} , Carril 7: [50 mM] Cu^{2+} , Carril 8: [100 μM] Cd^{2+} , Carril 9: [1000 μM] Cd^{2+} , (E-Pj).

Para analizar el correcto diseño de los iniciadores utilizados en el proceso de RT-PCR, se llevó a cabo la verificación mediante la amplificación del fragmento del gen constitutivo de Actina (300 pb) (Figura 28) de esta forma se comprobó que el diseño de las secuencias de los iniciadores son correctas.

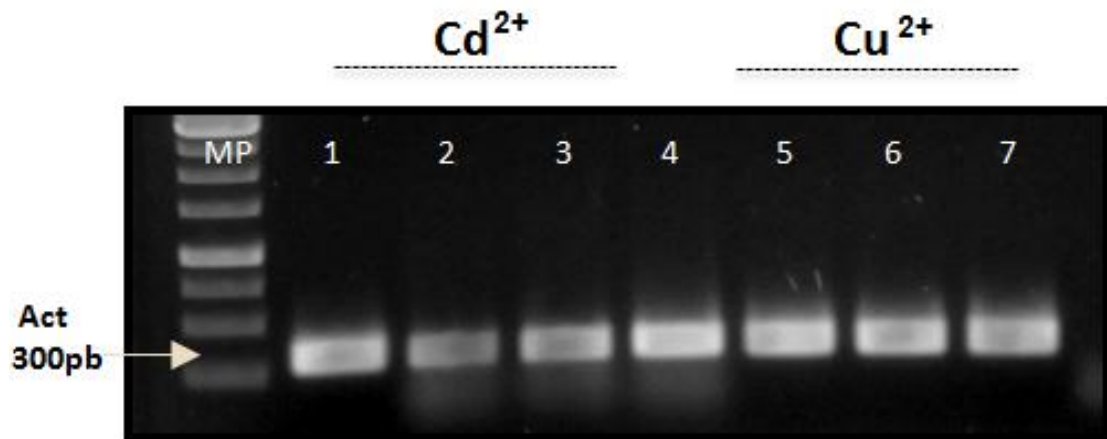


Figura 7. Amplificación del gen de Actina de embriones (*P. glandulosa* y *P. juliflora*) expuestos a metales. Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus; Carril 1: Control; Carril 2 [100 μM] Cd²⁺, Carril 3: [0.1 μM] Cd²⁺, Carril 4: Control; Carril 5: [10 mM] Cu²⁺, Carril 6: [50 mM] Cu²⁺.

3.17 Análisis estadístico

Para el análisis de las muestras se diseñó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar con sus tres repeticiones y se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey ($P < 0.05$) para la determinación de las diferencias entre las absorbancias obtenidas para cada uno de los tratamientos. De la misma manera, se utilizó la prueba de Duncan a ($P < 0.01$) para evaluar las diferencias entre los tratamientos. El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SAS (Saberri and Shahriaari, 2011).

VI. RESULTADOS

6.1 Porcentaje de Germinación e índice de tolerancia

En el presente estudio los resultados de germinación *P. juliflora* mostraron que dosis crecientes de Cd^{2+} (50, 100 y 1000 μM) estimularon de manera no significativa ($p > 0.05$) un mayor porcentaje de germinación después de 96 h de exposición al metal (Figura 8).

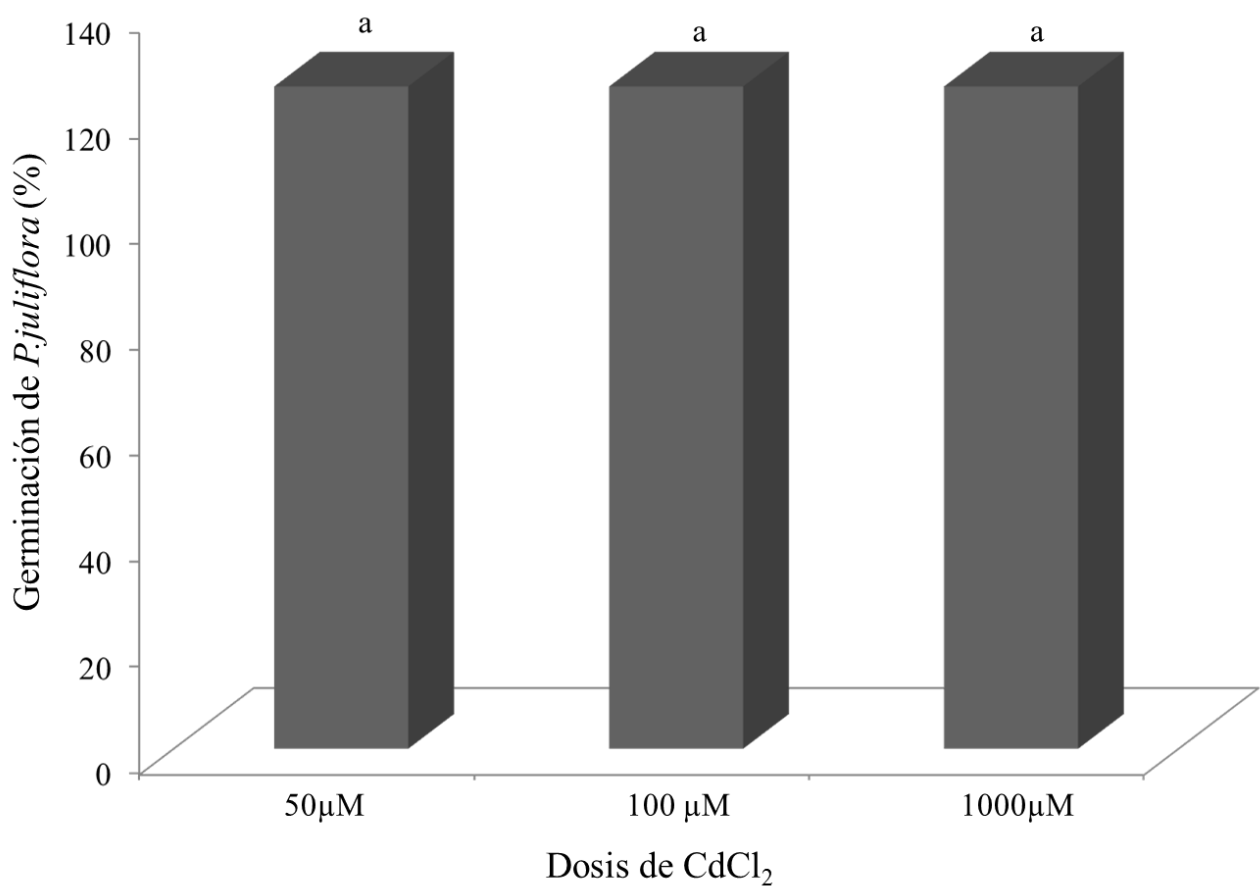


Figura 8. Germinación de *P. juliflora* a 96 horas después de su exposición a diferentes dosis de CdCl_2 .

Con respecto al índice de tolerancia los resultados obtenidos con las muestras expuestas a diferentes dosis de Cd^{+2} (Figura 9), se observó que el *IT* disminuía significativamente ($p > 0.05$) conforme se incrementaba la concentración del metal.

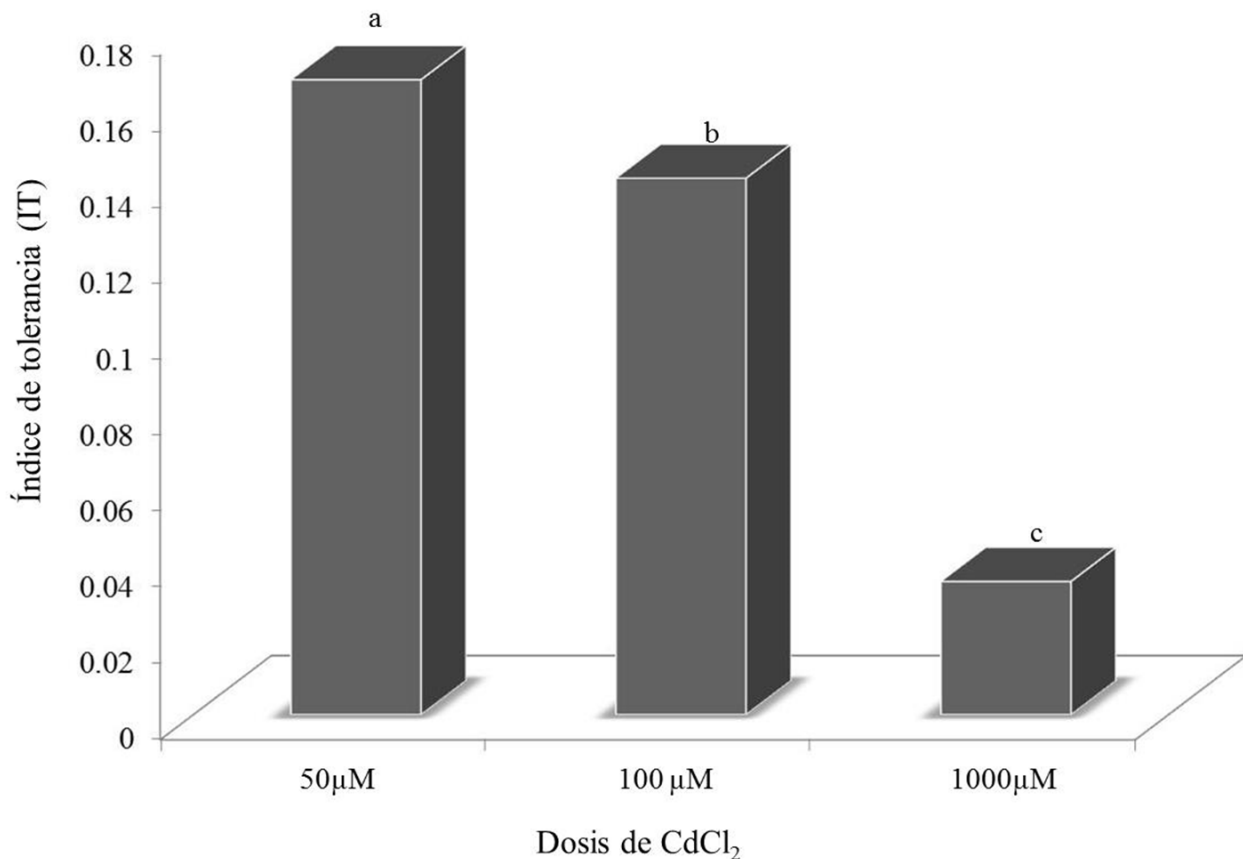


Figura 9. Índice de tolerancia de *P. juliflora* a las 96 horas después de su exposición a diferentes dosis de CdCl_2 .

Con respecto al efecto de dosis crecientes de Cu^{+2} (10, 50 y 100 mM) en *P. juliflora*, los resultados mostraron un efecto inhibitorio dosis dependiente significativo ($p > 0.05$) en el porcentaje de germinación con respecto al control después de 96 h de exposición al metal (Figura 10).

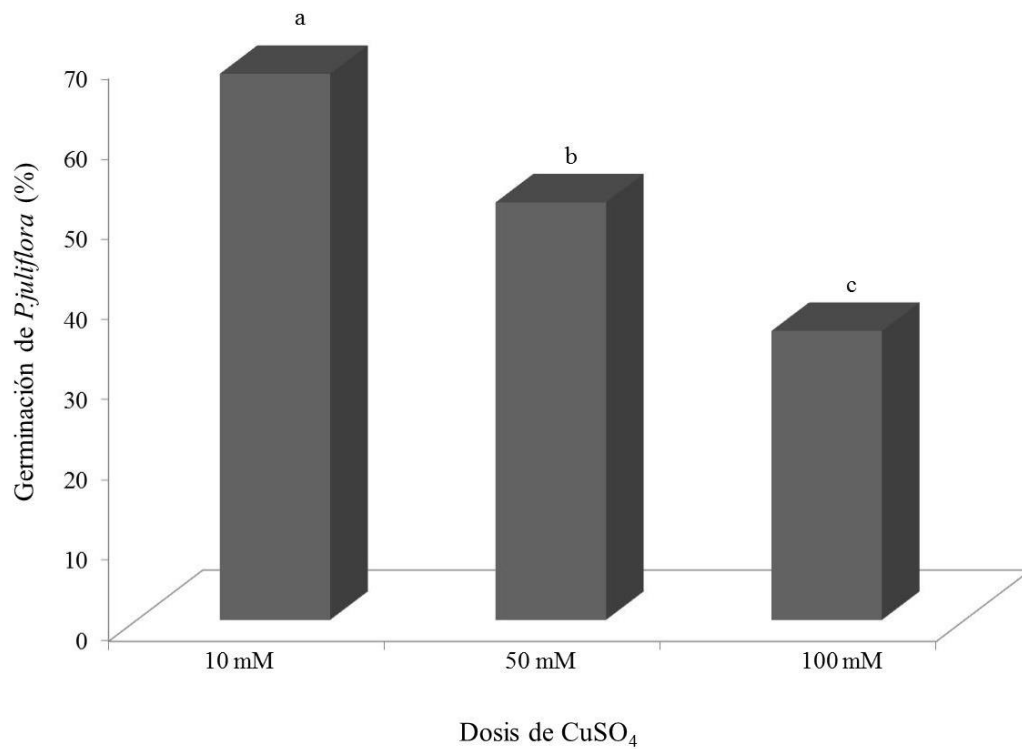


Figura 10. Germinación de *P. juliflora* a 96 h después de su exposición a diferentes dosis de CuSO_4 .

Por otra parte los valores de *IT* en *P. juliflora* no pudieron ser evaluados debido a una rápida inhibición del crecimiento radicular por las dosis empleadas del metal (Figura 11).

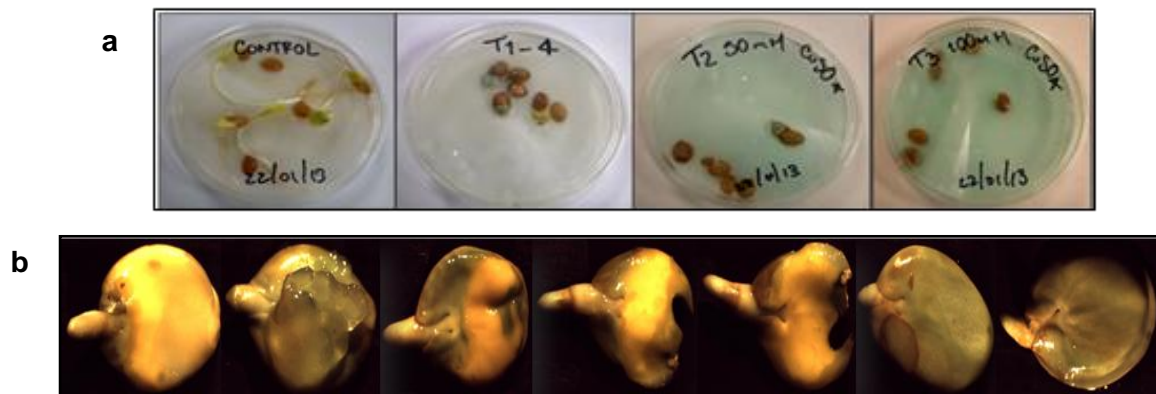


Figura 11. a: Inhibición del crecimiento radicular y b: daño estructural de las semillas *P. juliflora* a 96 h después de su exposición a diferentes dosis de CuSO₄.

6.2 Fluorescencia en hojas de *P. juliflora* expuestas a Cd²⁺ y Cu²⁺

En el presente estudio las diferentes dosis de cobre evaluadas mostraron cambios en los valores de eficiencia fotosintética (Fv/Fm) de *P. juliflora* después de 24 h de tratamiento con el metal. Observándose que las concentraciones de 10 y 50 mM de Cu²⁺ causaron una disminución significativa en los valores de Fv/Fm (Figura 12).

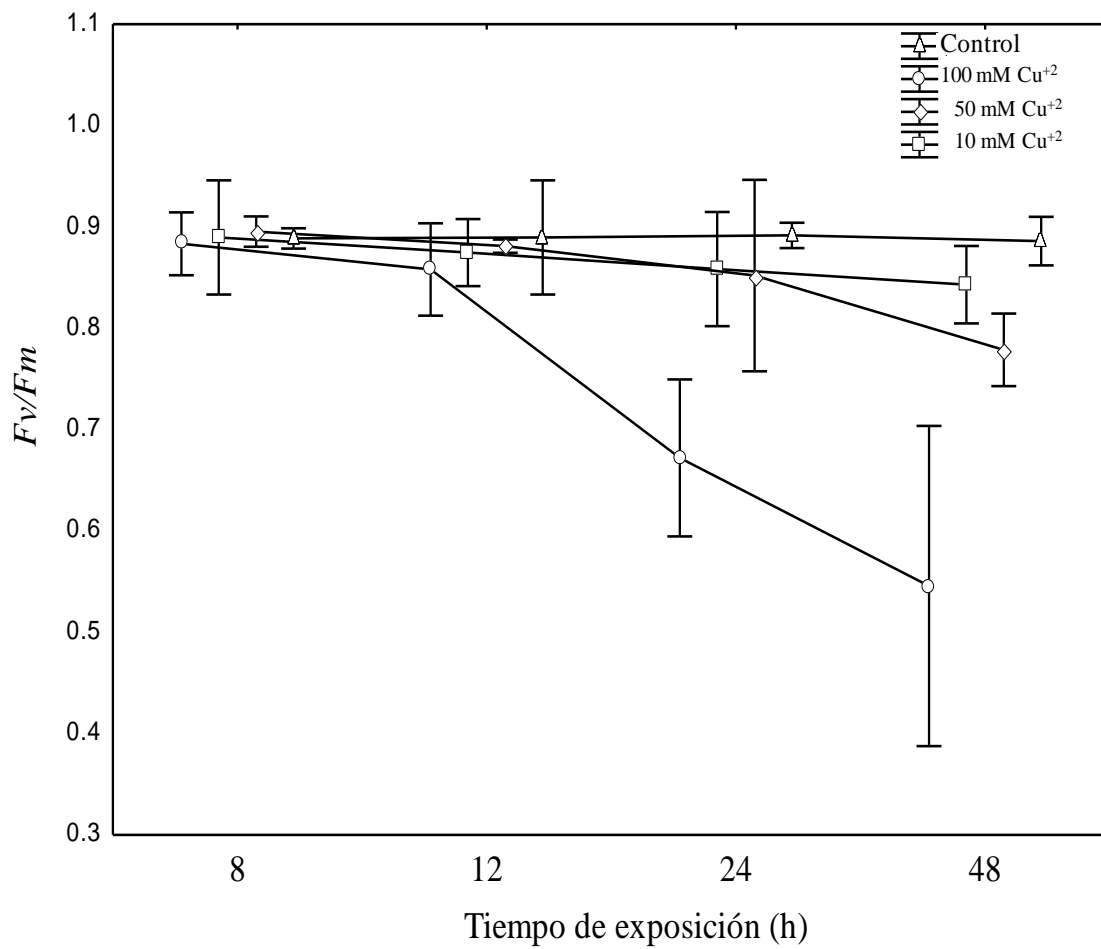


Figura 12. Cambios en los valores de F_v/F_m del tejido foliar de *P. juliflora* expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu^{2+} .

Por otra parte, el efecto de las dosis crecientes de Cu^{+2} , el tamaño y el número de centros de reacción activos en las hojas, dado por la relación sobre F_v/F_o (Figura 12), mostró un claro efecto inhibitorio de F_v/F_o de las hojas de *P. juliflora* a través del tiempo e incremento de la concentración del metal.

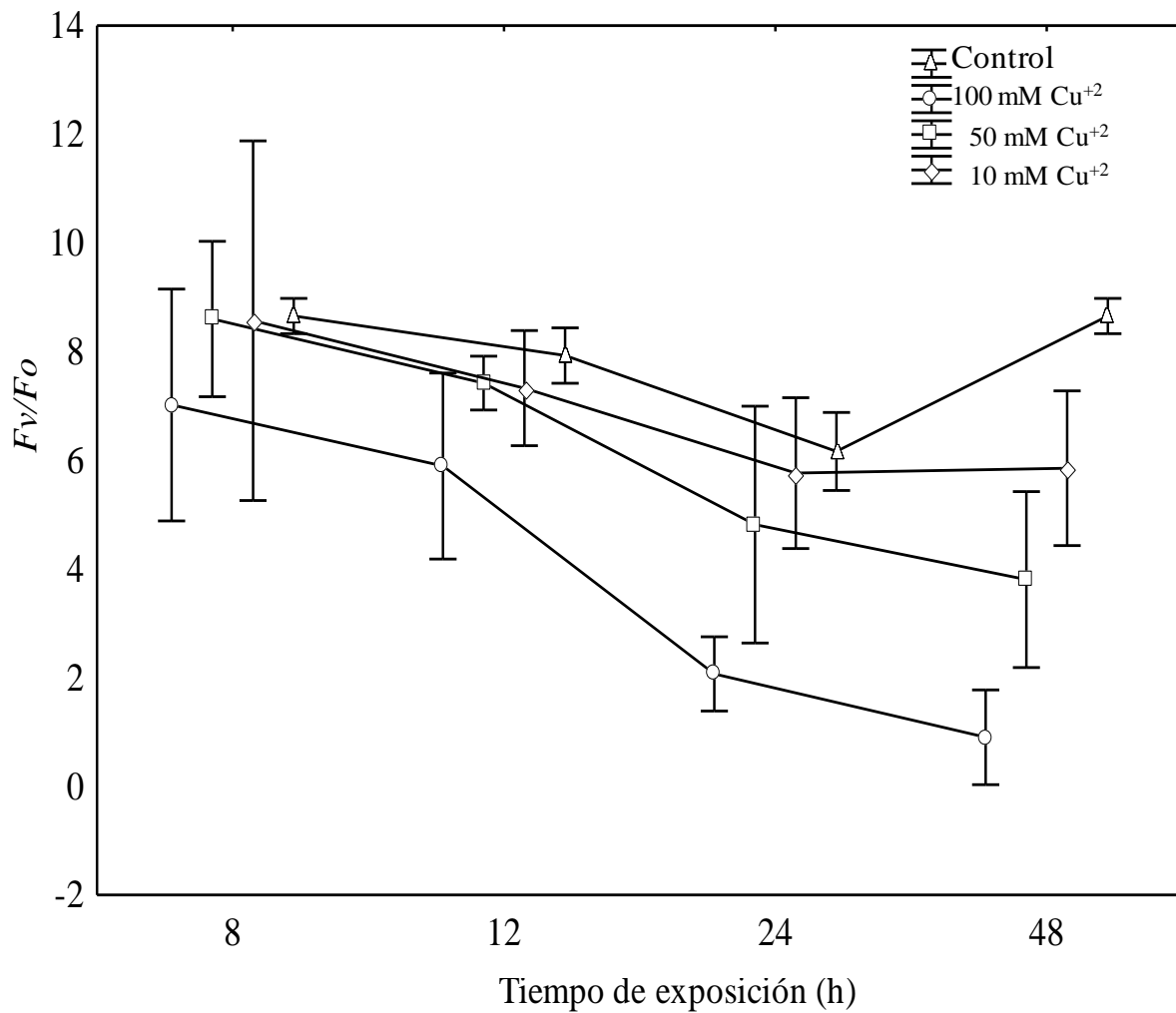


Figura 13. Cambios en los valores de F_v/F_o del tejido foliar de *P. juliflora* expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu^{+2} .

Similares resultados fueron observados al evaluar la eficiencia del proceso de disociación de la molécula del agua evaluado por medio del parámetro F_o/F_v . En donde, las dosis de 10 mM de Cu^{+2} afectaron de manera significativa los valores de F_o/F_v a partir de las 24 h después de la exposición al metal.

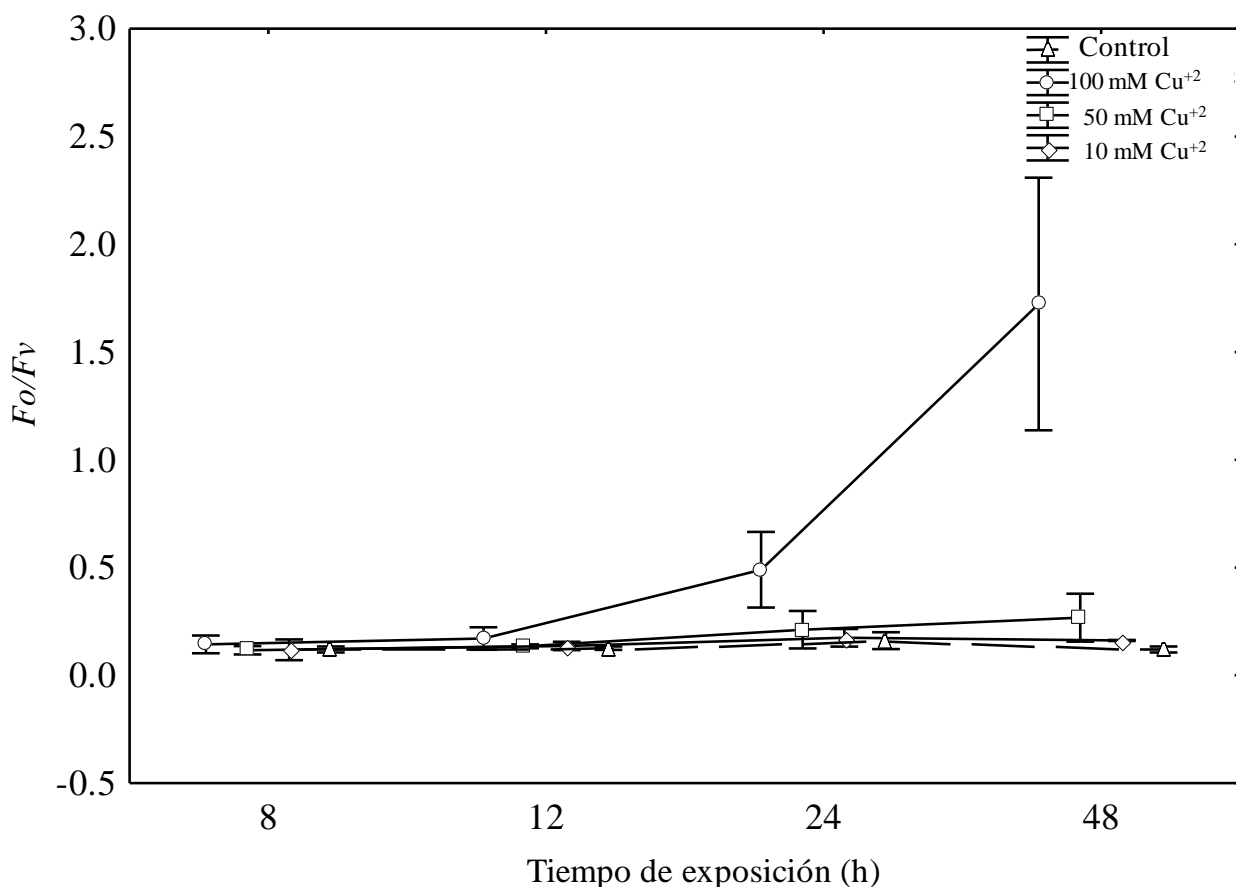


Figura 14. Cambios en los valores de F_o/F_v del tejido foliar de *P. juliflora* expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cu^{+2} .

En contraste, cuando las plantas de *P. juliflora* fueron tratadas con dosis crecientes de Cd^{+2} (50,100 y 1000 μM); los valores de eficiencia fotosintética (F_v/F_m) de *P. juliflora* no presentaron cambios significativos después de 48 h de tratamiento con el metal (Figura 14).

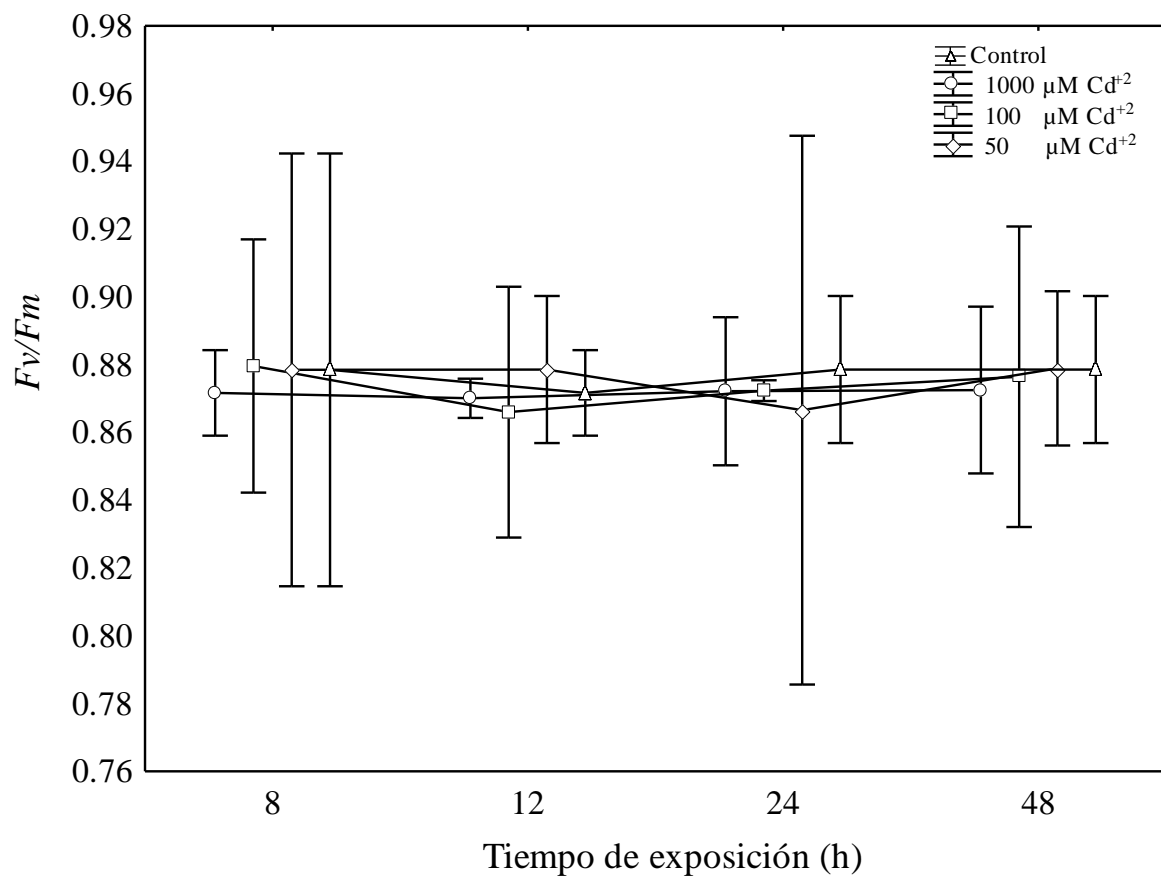


Figura 15. Cambios en los valores de F_v/F_m del tejido foliar de *P. juliflora* expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cd^{+2} .

De la misma forma, los valores de F_o/F_v y F_v/F_o , respectivamente, no mostraron cambios significativos al incrementar las dosis del metal con respecto al testigo después de 48 h de tratamiento (Figura 15a y b).

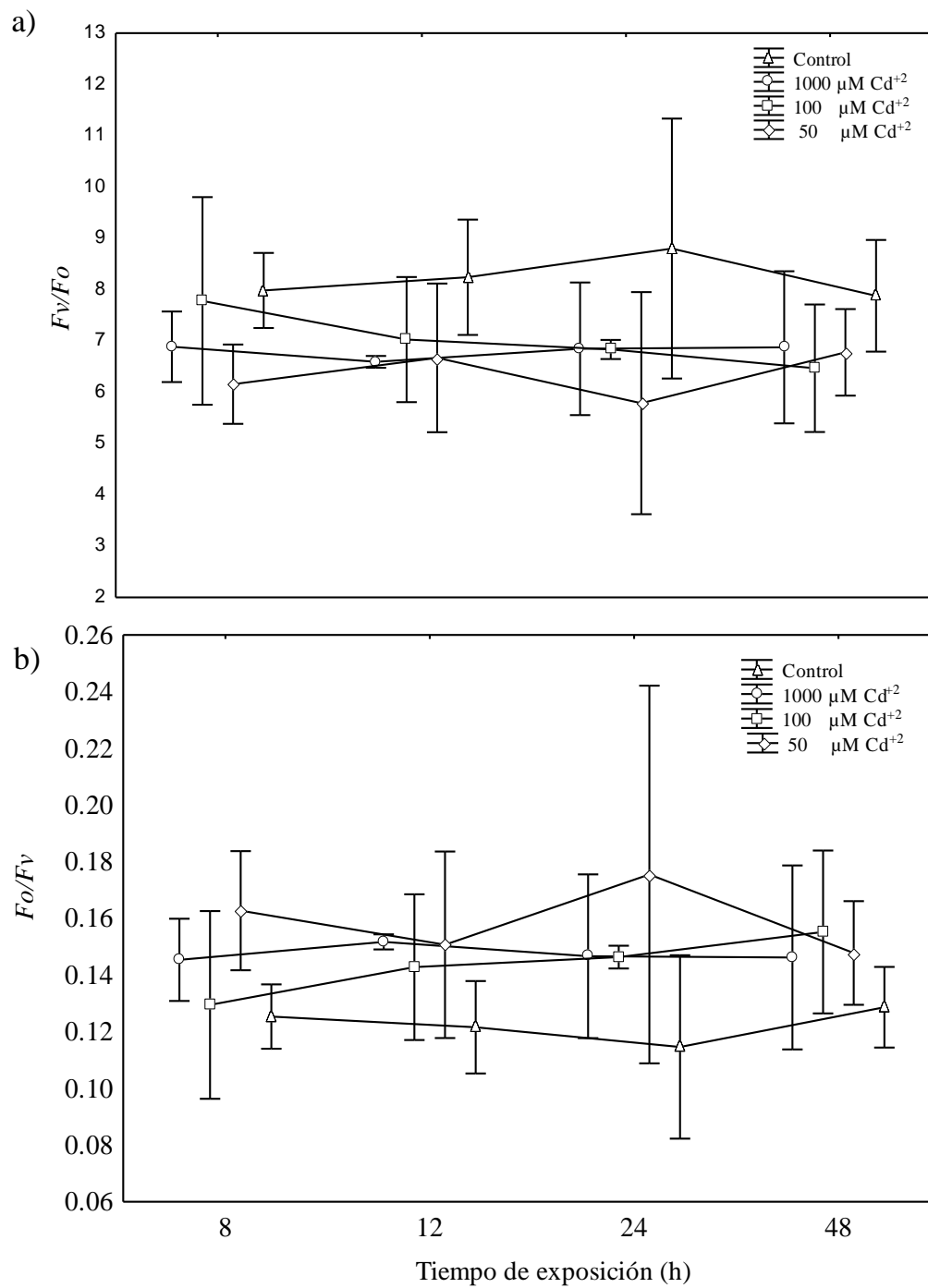


Figura 16. Cambios en los valores de F_v/F_o (a) y F_o/F_v (b) del tejido foliar de *P. juliflora* expuesta por 48 h a dosis crecientes de Cd^{+2} .

6.3 Determinación de la fuga de electrolitos mediante la conductividad eléctrica (CE) del tejido foliar de *P. juliflora*

La fuga de electrolitos (FE) es un indicador de la integridad celular que permite identificar de manera rápida el efecto de metales en las plantas. En este sentido nuestros resultados mostraron que los valores del FE en hojas de *P. juliflora* expuestas a Cu^{+2} , presentaron un incremento significativo del 75% a partir de las 24 h para las dosis de 0.05 mM del metal con una ligera disminución a 60% a las 48 h después de la exposición. Por su parte los valores de FE de *P. juliflora* tratadas con dosis de 0.1 mM del metal presentaron incrementos significativos con respecto al control a partir de las 12 h con un 60% y 70% de FE, después de la exposición al metal.

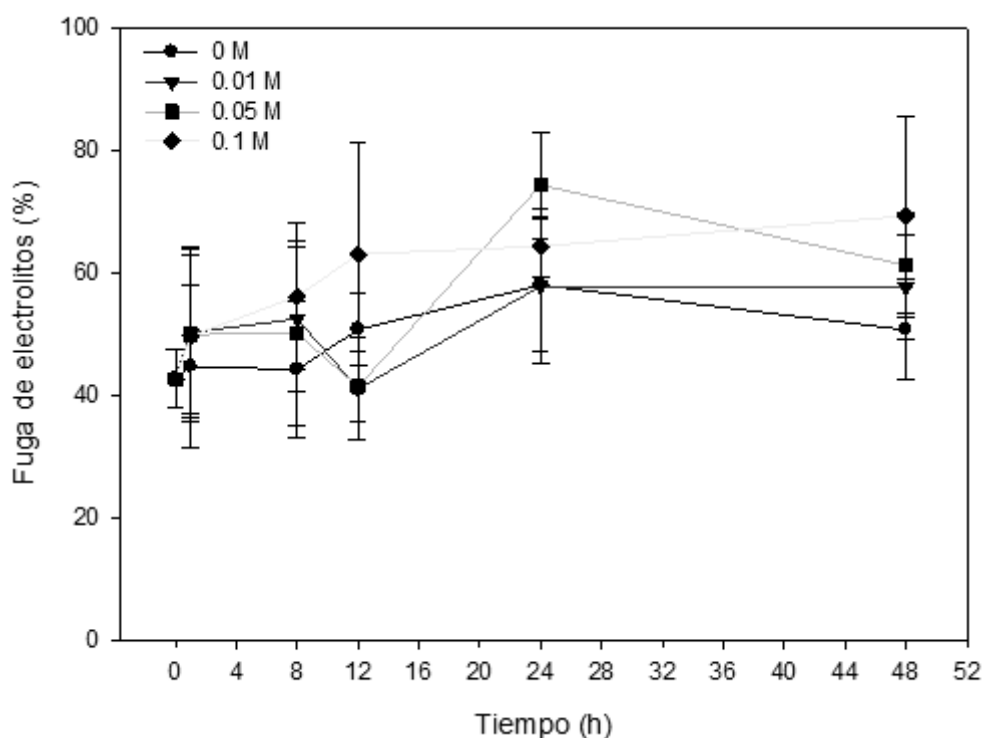


Figura 17. Valores de fuga de electrolitos de plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu^{+2} . Los valores son expresados como medias \pm S. D.

Por su parte, la exposición de *P. juliflora* a las dosis crecientes de Cd^{+2} generó un efecto no significativo en los valores de FE en el tejido foliar después de 48 h después de la exposición al metal (Figura 18). No obstante, aun cuando los valores de FE no fueron significativos, estos mostraron una ligera tendencia de incrementarse a medida que se aumentaba la dosis y el tiempo de exposición al metal.

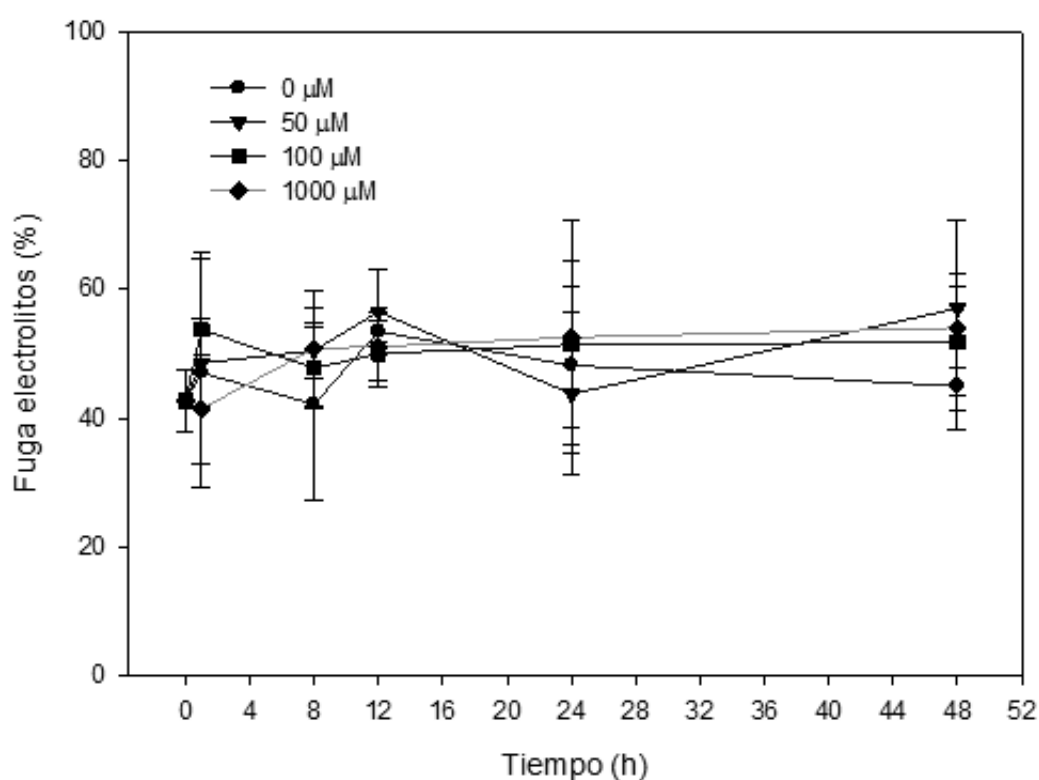


Figura 18. Valores de fuga de electrolitos de plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd^{+2} . Los valores son expresados como medias \pm S. D.

6.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos en *P. juliflora* expuestas a cobre

Los cambios en clorofila *a*, *b* y total en el tejido foliar de plantas de *P. juliflora* expuestas a 10, 50 y 100 mM de Cu^{+2} por 48h, son mostrados en la figura 18 a, b y c.

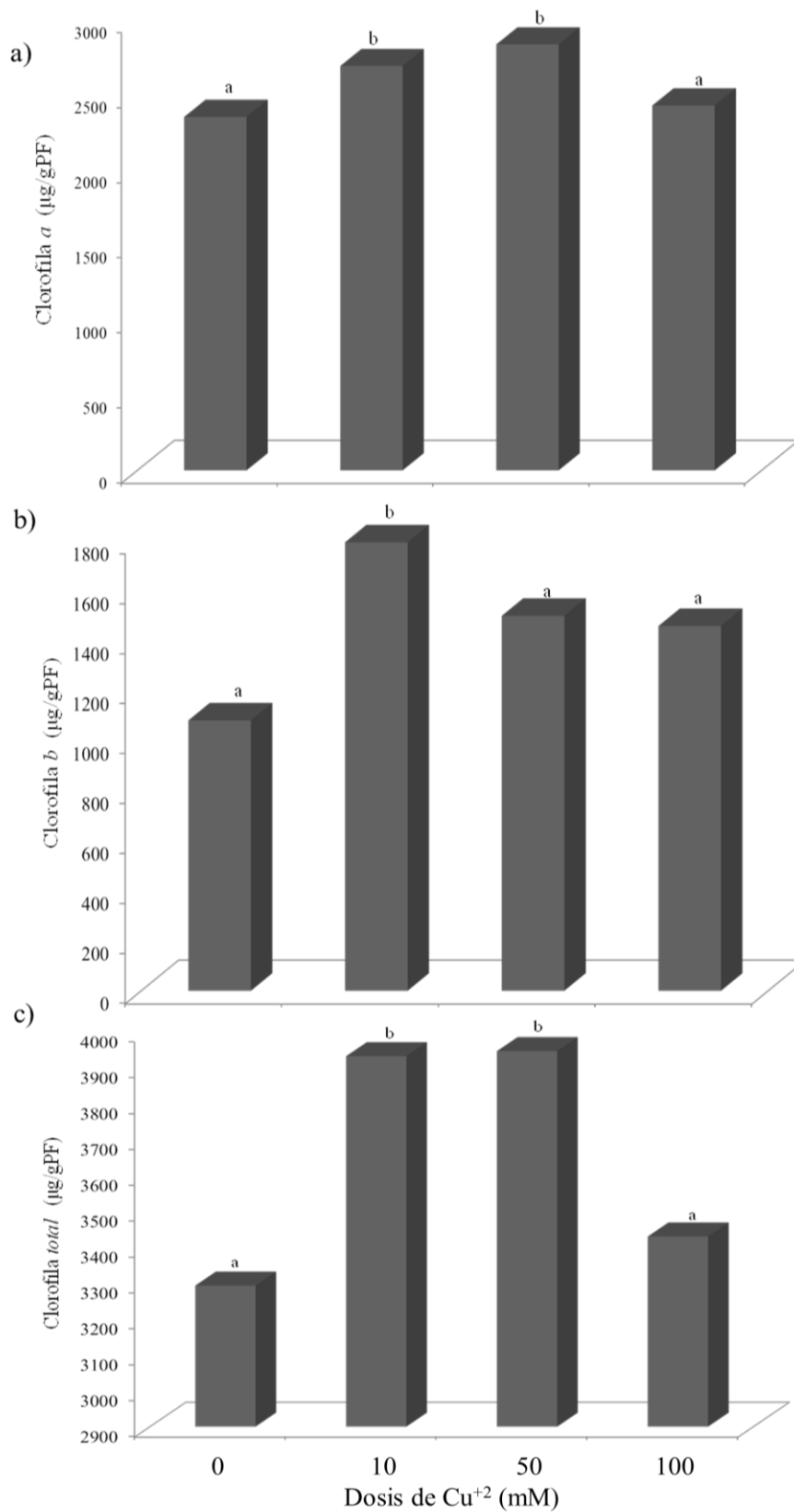


Figura 19. Cambios de clorofila a (a), b (b) y total (c) en plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu^{2+} .

En donde se puede observar que el efecto de dosis menores del metal (10 y 50 mM) produjo un efecto significativamente mayor en los valores de Clorofila *a*, *b* y total comparado con las plantas control. En contraste la dosis alta del metal no mostró cambios significativos en las variables evaluadas comparadas con las plantas control (Figura 18). En el caso del contenido de carotenoides los resultados mostraron que después de 48 h de exposición a 10, 50 y 100 mM del metal mostraron un efecto significativamente menor comparado con las plantas que no estuvieron expuestas a Cu^{2+} (Figura 19).

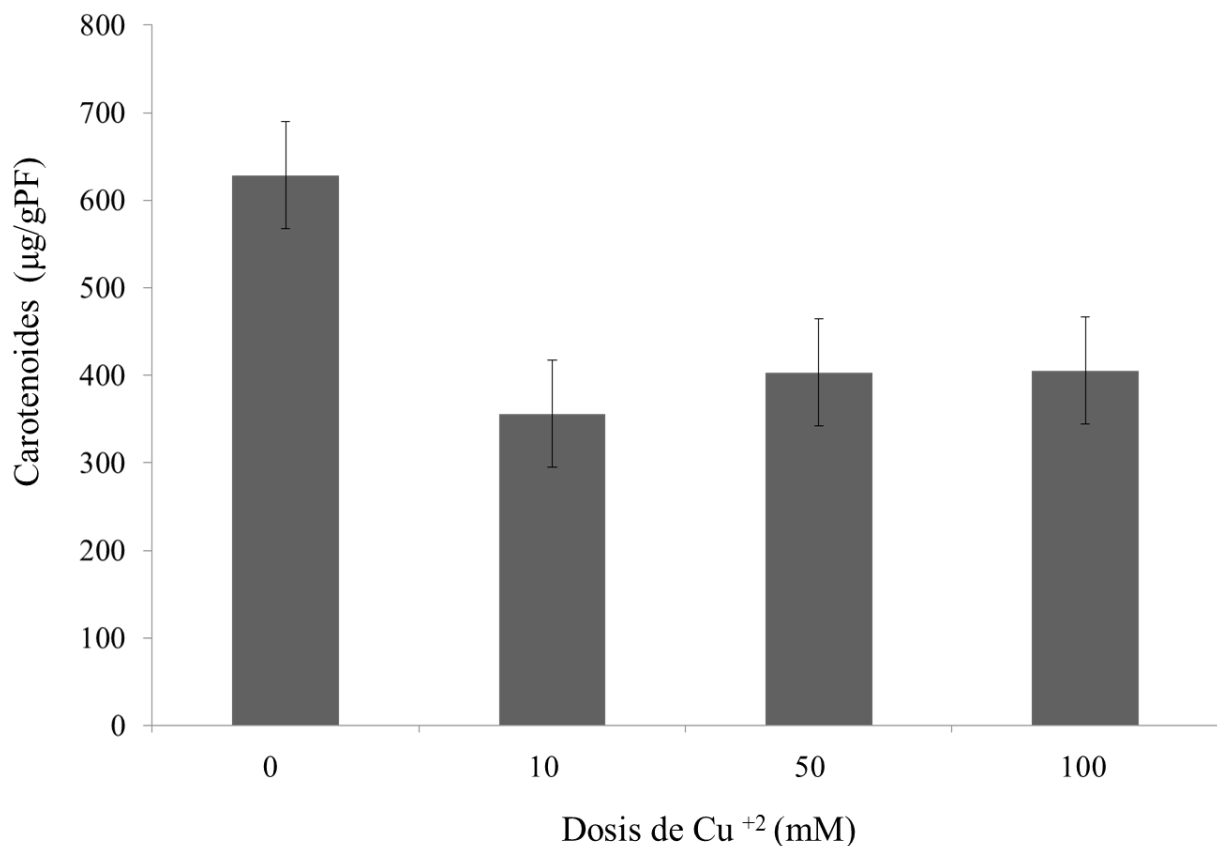


Figura 20. Contenido de carotenoides en plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cu^{+2} .

6.5 Determinación de pigmentos fotosintéticos en *P. juliflora* expuestas a cadmio

En el presente estudio las plantas de *P. juliflora* expuestas a 100 y 1000 μM de cadmio mostraron una disminución significativa en los valores de clorofila *a* y total, a las 48 h después de la exposición al metal (Figura 21).

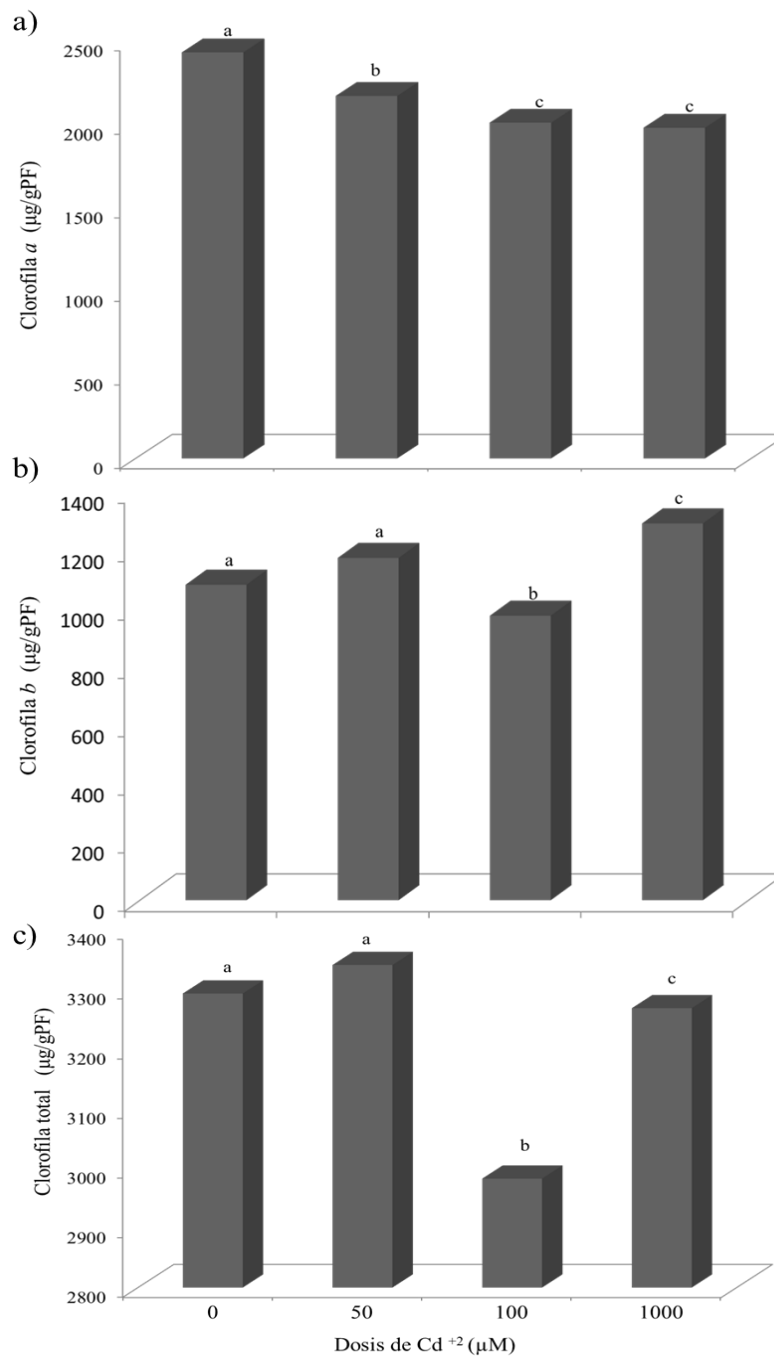


Figura 21. Cambios de clorofila *a* (a), *b* (b) y total (c) en plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd^{+2} .

En el caso en de la clorofila *b* la dosis de 100 μM de cadmio mostraron un efecto negativo no así la dosis de 1000 μM que presentó un incremento en los valores de esta variable con respecto al control (Figura 21b).

En cuanto al efecto de las dosis de cadmio sobre el tejido foliar de *P. juliflora* los resultados mostraron que las tres dosis empleadas (50, 10 y 100 μM) causaron una disminución significativa en el contenido de carotenoides totales comparados con las plantas control (Figura 22).

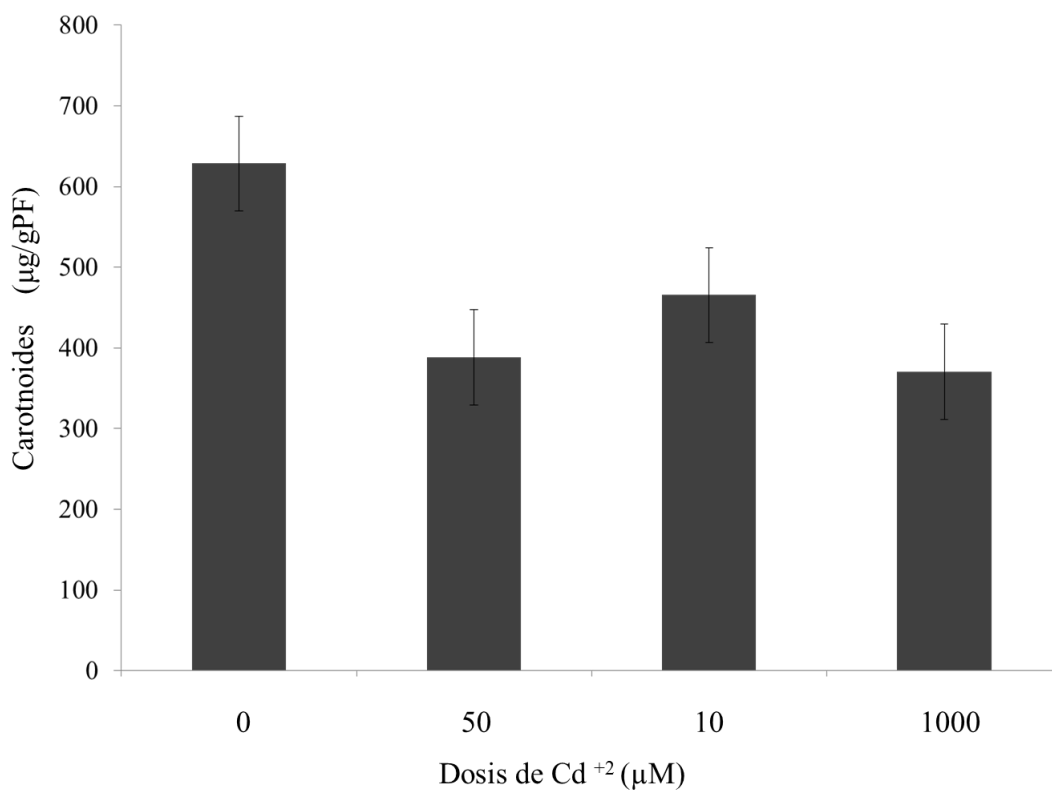


Figura 22. Contenido de carotenoides en plantas de *P. juliflora* tratadas por 48 horas con diferentes dosis de Cd^{+2} .

6.6 Determinación de Cu^{2+} en los diferentes tejidos de *P. juliflora*

La exposición de las plantas de *P. juliflora* a cobre, mostraron que la dosis alta (100 mM) generó mayor acumulación con respecto al tiempo y comparado con las dosis de 10 y 50 mM que fueron similares a las plantas control (Figura 23).

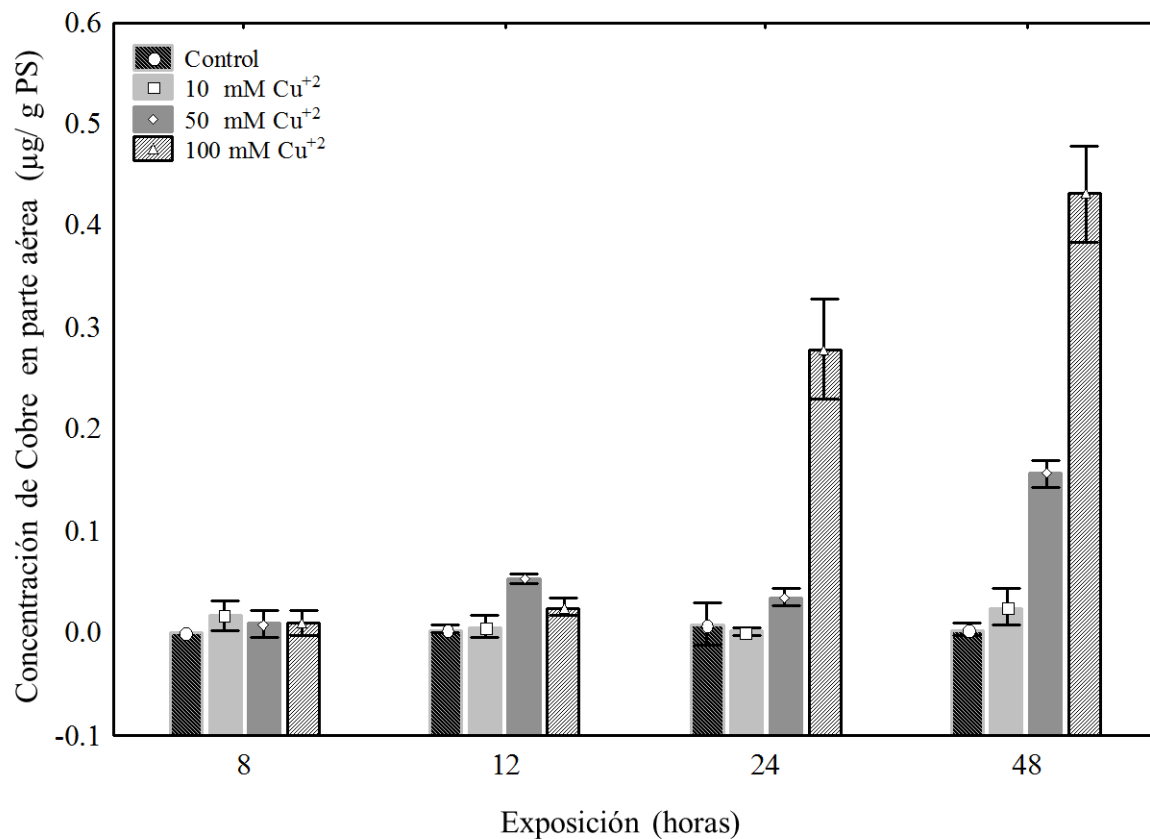


Figura 23. Contenido de cobre en parte aérea de *P. juliflora* a diferentes tiempos de exposición.

En el caso del análisis de la acumulación de cobre en el tejido radicular, los resultados mostraron que todas las dosis del metal presentaron una tendencia significativa de acumulación en raíz a partir de las primeras horas de exposición.

No obstante al finalizar el experimento se observó una ligera disminución en la acumulación del metal en las plantas, pero significativamente superior comparadas con las plantas sin exposición al metal (Figura 24).

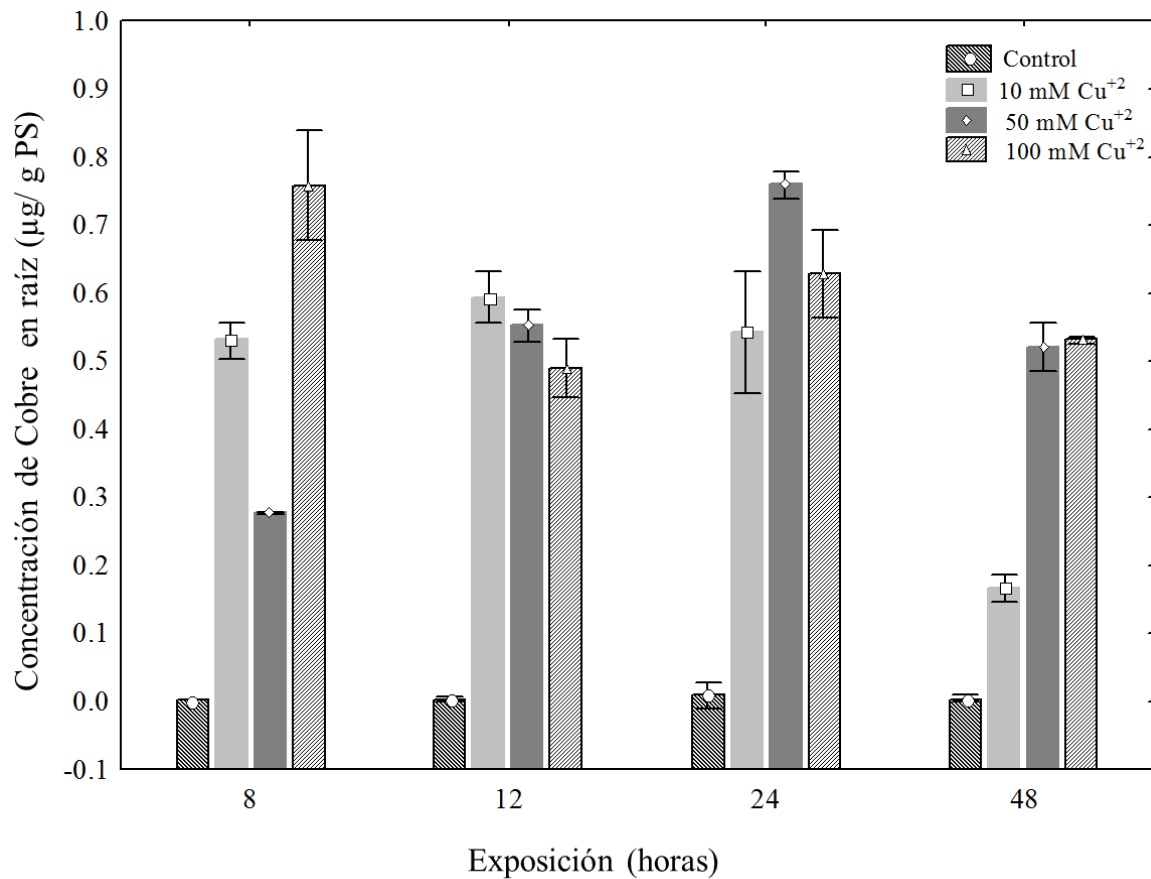


Figura 24. Distribución de cobre en parte radicular de *P. juliflora* a diferentes tiempos de exposición.

6.7 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transferencia en los diferentes tejidos de *P. juliflora* expuestos a cobre

El factor de bioacumulación (BAF) en *P. juliflora* tratadas con cobre, mostraron que los valores de FBA tienden a disminuir en el tejido radicular a medida que se incrementaron las dosis del metal de 10 a 100 mM (Cuadro 9). Indicando una mayor acumulación del metal en el tejido foliar de *P. juliflora*, lo anterior se reflejó en los valores del Índice de translocación (IT) de *P. juliflora* en donde se observó que las dosis mayores del metal incrementaron la transferencia del sistema radicular a la parte aérea de las plantas al final del experimento.

Cuadro 9. Factor de Bioacumulación (BAF) e Índice de translocación (Ti) de cobre en *Prosopis juliflora* durante 48 horas de exposición.

Dosis (mM)	BAF		Ti
	Raíz	Parte Aérea	Parte Aérea/Raíces
50	208.33 ± 10.40 ^a	32.5 ± 9.01 ^a	0.16 ± 0.036 ^a
100	130.66 ± 3.54 ^b	39.5 ± 1.32 ^b	0.30 ± 0.002 ^b
1000	66.41 ± 0.28 ^c	54.16 ± 2.36 ^c	0.81 ± 0.04 ^c

Datos de las medias ± S. D. (n=4). Las letras con diferente superíndice (a, b, y c) en la misma columna son significativamente diferentes (Comparación múltiple Tukey p< 0.005).

6.8 Determinación de Cd^{2+} en los diferentes tejidos de *P. juliflora*

P. juliflora tratadas con diferentes dosis de cadmio por 48 h de exposición, mostraron una baja acumulación del metal en el tejido foliar con respecto a las plantas (Figura 25).

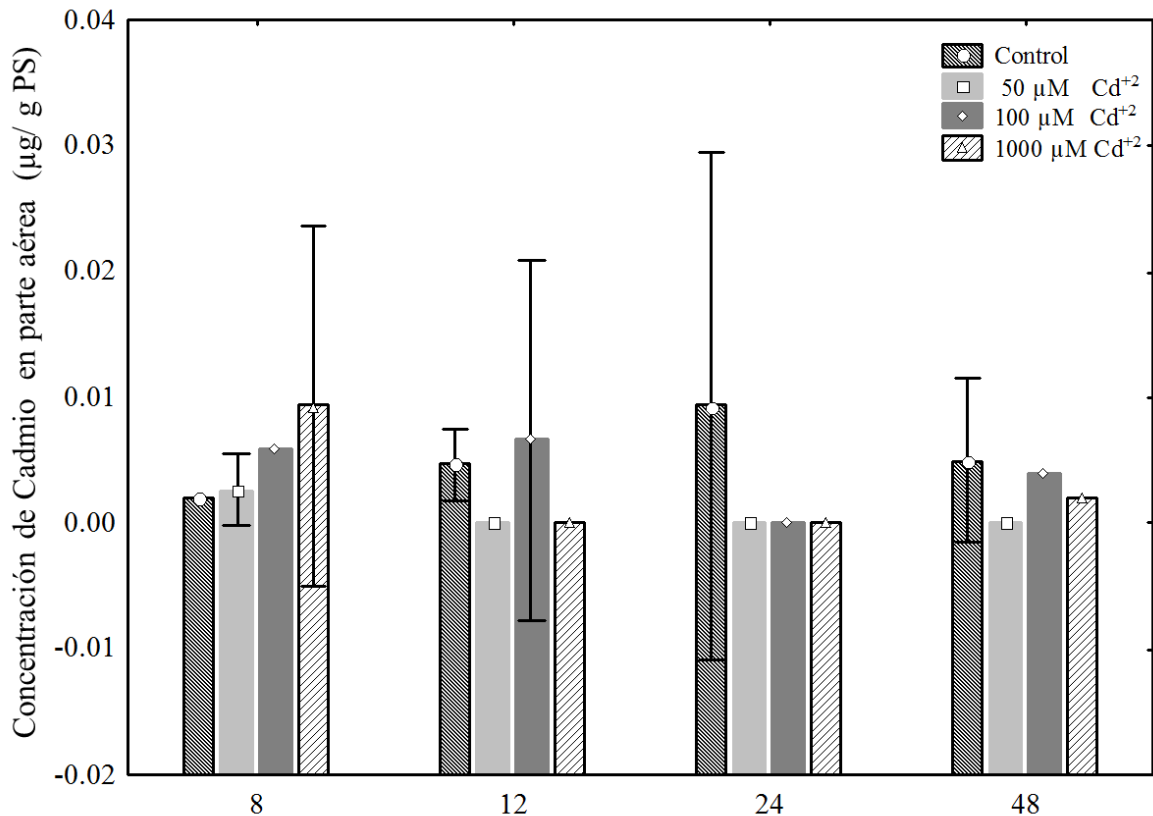


Figura 25. Distribución de cadmio en parte aérea de *P. juliflora* a diferentes tiempos de exposición.

En contraste el análisis del metal en el tejido radicular mostró que las plantas de *P. juliflora* expuestas a 50, 100 y 1000 µM del metal se acumuló significativamente con respecto al tiempo (Figura 26). Donde la exposición de *P. juliflora* a dosis altas de Cd^{2+} fueron las que mostraron una mayor acumulación del metal al final del experimento comparadas con las plantas control.

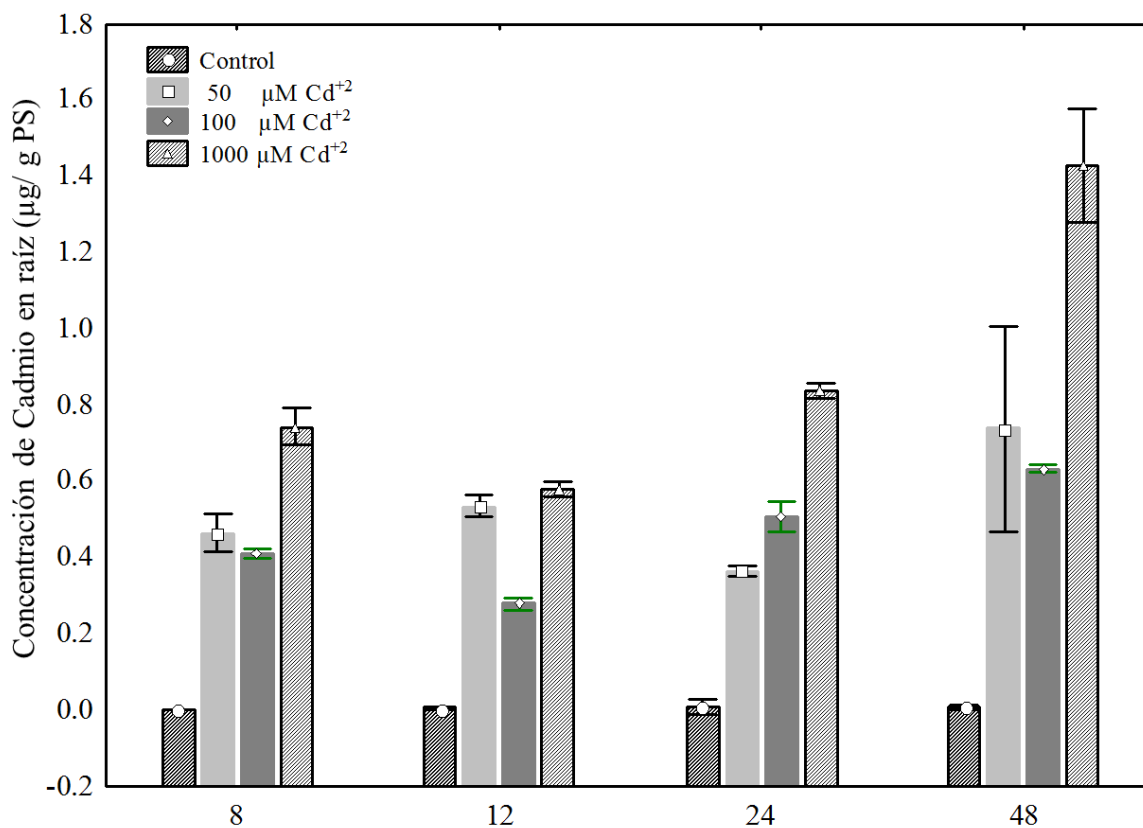


Figura 26. Distribución de cadmio en parte radicular de *P. juliflora* a diferentes tiempos de exposición.

6.9 Determinación del factor de bioacumulación e índice de transferencia en los diferentes tejidos de *P. juliflora* expuestos a cadmio

El factor de bioacumulación (BAF) en *P. juliflora* tratadas con cadmio, mostraron que los valores de BAF se incrementaron con las dosis (1000 μM) empleadas al final del experimento (Cuadro 10). Así mismo, los mayores niveles de acumulación del metal fueron observados en el sistema radicular y en menor proporción en las partes aéreas.

Cuadro 10. Factor de Bioacumulación (BAF) e Índice de translocación (Ti) de cadmio en *Prosopis juliflora* durante 48 horas de exposición.

Dosis (μM)	BAF		Ti
	Raíz	Parte Aérea	Parte Aérea/Raíces
10	36.93 \pm 5.41	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
50	31.7 \pm 0.2	0.2 \pm 3.39	0.0063 \pm 22.27
100	71.53 \pm 3.02	0.1 \pm 1.69	0.0013 \pm 50.050

Datos de las medias \pm S. D. ($n=4$). Las letras con diferente superíndice (a, b, y c) en la misma columna son significativamente diferentes (Comparación múltiple Tukey $p < 0.005$).

6.10 Patrones de expresión de las Metalotioneínas en respuesta al estrés

Los resultados de expresión obtenidos de las MT's en plántulas de *P. juliflora* y *P. glandulosa* expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} (100 mM) y Cd^{2+} (100 μM) y distintos tiempos de exposición verificaron el diseño de los iniciadores específicos para cada una de las MT's (*PgMt2 Isoforma I*, *PgMt2*, *PgMt3*) debido a que se logró amplificar dichos genes.

Los genes fueron inducidos significativamente con cobre, comparado con los tratamientos de cadmio que aún cuando también expresaron las tres metalotioneínas, los expuestos a cobre fueron casi siempre inferiores en expresión. Durante las primeras 4 h posteriores a la exposición, se observó un mayor nivel de expresión de las tres MT's expuestas a cobre (Figura 24a), finalmente se observó una disminución de la densidad relativa en las cada una de las MT's conforme transcurría el tiempo de exposición (Figura 24b).

En el caso de las plantas tratadas con cadmio, éstas tuvieron una expresión constante desde las primeras horas de exposición (4 h) y hasta el término de la exposición (12 h) (Figura 24b), sin embargo, fueron en su mayoría siempre inferiores en densidad relativa (%) con respecto a los tratamientos con cobre.

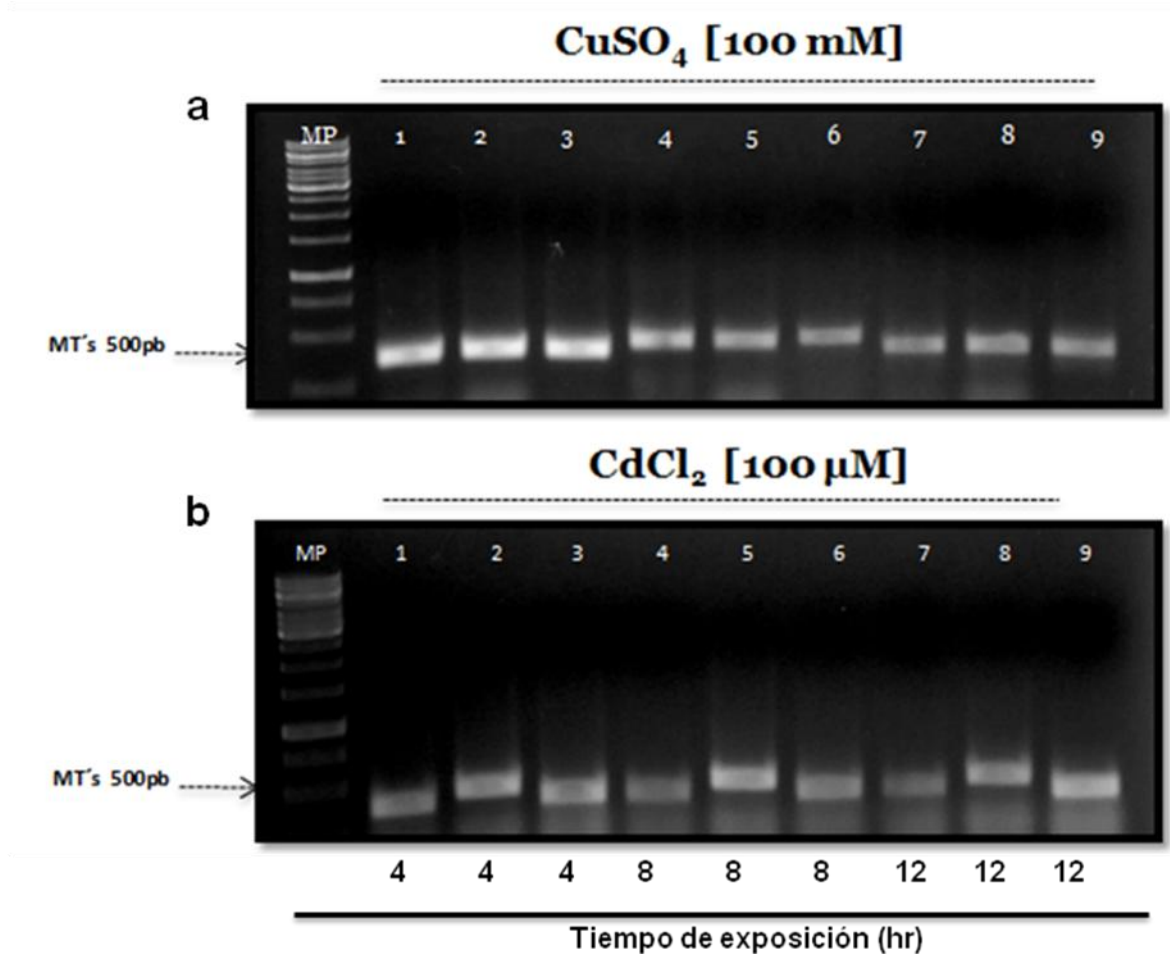


Figura 27. Amplificación de MTs de embriones de *P. glandulosa* expuesta a 4, 8 y 12 hr con CuSO₄ [100 mM] y [100 μM] de CdCl₂. Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus. Carril 1-3: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 4 hrs de exposición; Carril 4-6: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 8 hr de exposición; Carril 7-9: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 12 hrs de exposición.

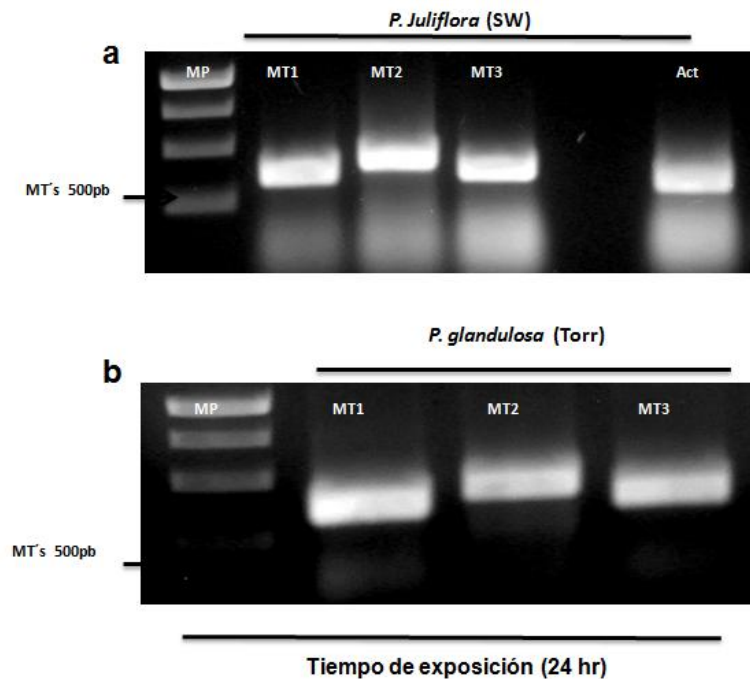


Figura 28. Amplificación de MTs de embriones de *P. glandulosa* y *P. juliflora* expuestas a 4, 8 y 12 hr con CuSO_4 [100 mM] y [100 μM] de CdCl_2 . Carril MP: Marcador de peso molecular 1kb Plus. Carril 1-3: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 4 hrs de exposición; Carril 4-6: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 8 hr de exposición; Carril 7-9: *Mt1*, *Mt2* y *Mt3* a las 12 hrs de exposición.

6.11 Patrones de expresión de fitoquelatin sintetasa (FQs) en respuesta al estrés

Los resultados de nuestro estudio mostraron un patrón similar de inducción de las fitoquelatinas bajo el estrés por cadmio en donde las plantas mostraron mayores niveles de expresión del gen comparado con las plantas estresadas con cobre. En este estudio, se logró la amplificación del gen fitoquetin sintetasa FQs en las plantas de *P. glandulosa* y *P. juliflora*, respectivamente, sometidas al estrés por cobre y cadmio. Sin embargo, hasta el momento sólo la secuencia perteneciente a la especie de *P. juliflora* fue secuenciada y depositada en la base de datos del GenBank.

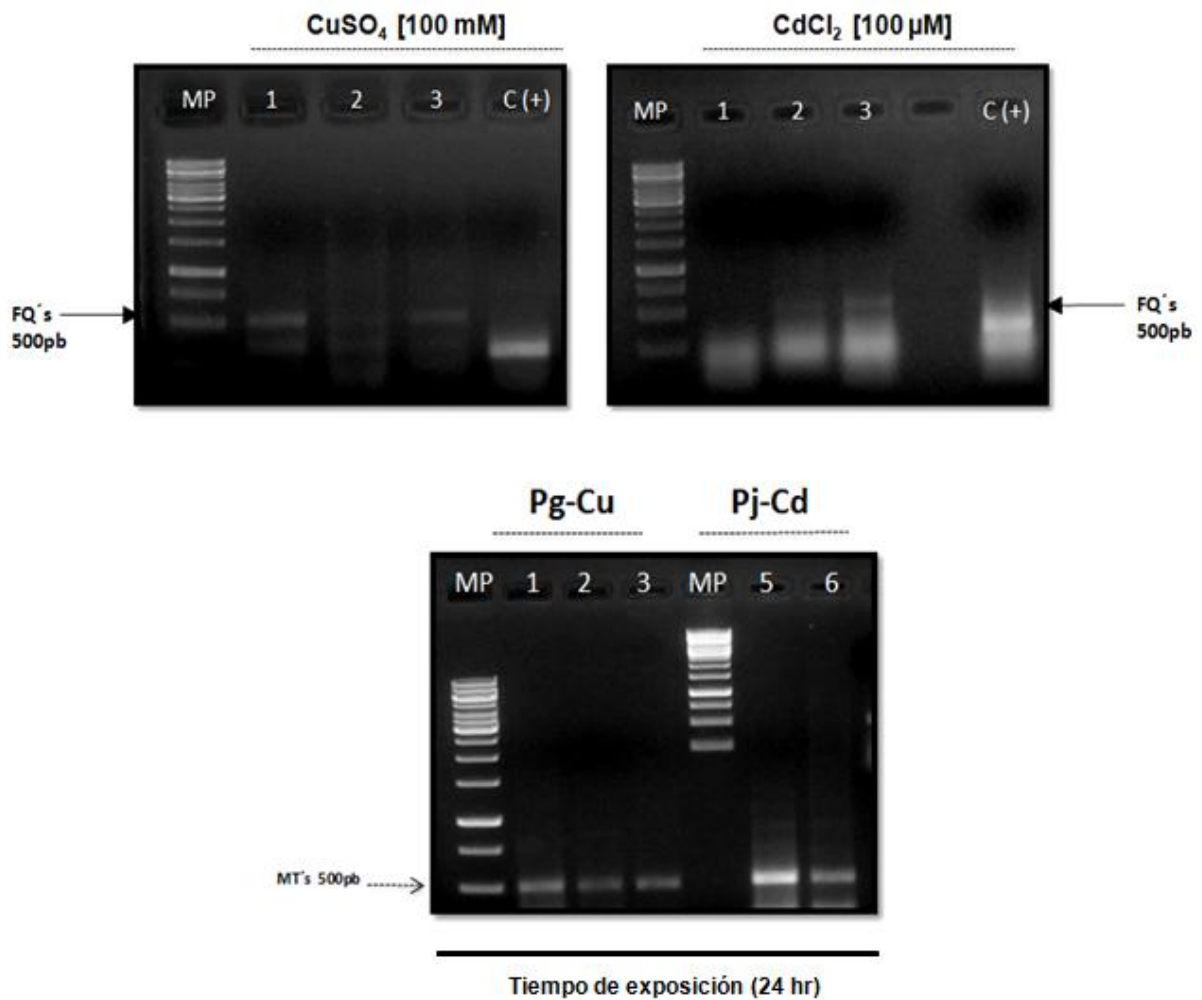


Figura 29. Niveles de expresión del gen ***PjFQs*** en plántulas de *P. juliflora* y *P. glandulosa* expuesta a 24 h con metales. Carril MP de peso molecular 1kb Plus. Carril 1-3: *P. glandulosa* con Cu²⁺ y *P. juliflora* con Cd²⁺.

VII. DISCUSIÓN

Los nutrientes esenciales requeridos en concentraciones trazas como Cu, Zn, Ni, Co, Fe, entre otros, son de gran importancia debido a que juegan un rol significativo en la expresión de genes, biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, producción de metabolitos secundarios, clorofilas y en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Parmar *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando una planta es sometida a estrés por elementos esenciales y no esenciales, estos pueden ejercer un efecto adverso sobre la respuesta fotosintética, síntesis de proteínas, transporte de metabolitos y en la toma y translocación de iones esenciales principalmente (Lotmani y Mesnoui, 2011). Así mismo, la mayoría de las respuestas relacionadas con el estrés ambiental en plantas están ligadas con el crecimiento, diferenciación y aspectos fisiológicos como la fotosíntesis, absorción de iones, transporte, entre otras (Parmar *et al.*, 2013).

Durante el análisis de los resultados de germinación de las semillas de mezquite *P. juliflora* se observó que dosis crecientes de Cd^{2+} y Cu^{2+} influyeron de manera significativa en el porcentaje de germinación cuando fueron expuestas a 50 mM y 100 mM de Cu^{2+} , observándose una disminución de hasta un 55 y 40 % del total de semillas germinadas respectivamente. Resultados similares se encontraron en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) en donde la exposición prolongada al cobre causó efectos negativos en el porcentaje de germinación (%), perturbaciones en la morfología, reducción y crecimiento de la raíz (Singh *et al.*, 2012). De la misma manera, estudios proteómicos recientes han revelado que la toxicidad del Cu^{2+} inhibe la germinación de semillas debido a una disminución en la actividad regulatoria de alfa-amilasas o enolasas; así mismo, afecta el metabolismo en general, la absorción de agua y la movilización de alimentos de reserva (Senthyl y Ghosh, 2013).

Contrariamente, la exposición de semillas de *P. juliflora* a Cd^{2+} mostró un efecto positivo en el incremento de semillas germinadas (100 %). Lo cual contrasta con los resultados observados por Amirjani (2012) en donde plantas de arroz, soja y cebada expuestas con diferentes dosis de Cd^{2+} en condiciones hidropónicas mostraron menor crecimiento y desarrollo. En contraste en semillas de trigo (*Triticum aestivum*) Munzuroglu y Zengin (2006), demuestran que bajas concentraciones de Cd^{2+} no afectaron la germinación de las semillas pero si mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de la radícula y del coleóptilo. Lo cual fue similar a los resultados observados en el presente estudio en donde las diferentes dosis empleadas no afectaron la germinación de *P. juliflora* pero si el desarrollo radicular. De tal forma que el Cd^{2+} puede no afectar la germinación de *P. juliflora* pero si disminuir el crecimiento radicular mediante la inhibición del desarrollo de células meristemáticas y algunas enzimas presentes en el cotiledón. Lo anterior ha sido previamente descrito en semillas de *Leucaena leucocephala* expuestas a dosis creciente de Cd^{2+} , en donde dosis de 100 ppm no afectaron la germinación pero si el desarrollo de las plántulas (Muhammad *et al.*, 2008). No obstante estudios posteriores son necesarios para conocer los posibles mecanismos involucrados en el proceso de estimulación de la germinación por el Cd^{2+} , y su posterior efecto en la inhibición de enzimas que participan en el desarrollo radicular. Finalmente, aunque existen estrategias de defensa de las plantas para hacer frente a la toxicidad de los metales esenciales y no esenciales como Cd^{2+} y Cu^{2+} , los mecanismos por los que el proceso de germinación de semillas compite contra el estrés generado por los metales, sigue siendo en gran parte desconocido (Zoran-Ilić *et al.*, 2015).

Por otro lado, la exposición de plántulas de *P. juliflora* a Cu^{2+} y Cd^{2+} se manifestó en la fisiología de dichas plantas. En nuestro estudio el incremento de la exposición a cobre

provocó una baja en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *P. juliflora* que estuvieron expuestas por mayor tiempo y conforme se incrementaba la concentración del metal. En este sentido los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que las plantas de *P. juliflora* bajo estrés por Cd^{2+} y Cu^{2+} presentaron una disminución significativa en la concentración de clorofilas *a*, *b* y total y carotenoides totales conforme se aumentó la concentración y el tiempo de exposición. Por su parte, las plantas que fueron expuestas a Cu^{2+} resultaron en una mayor influencia negativa disminuyendo los niveles fotosintéticos; pudiéndose deber en parte a que el Cu^{2+} es un cofactor que interviene en el transporte de electrones durante la fotosíntesis y la respiración, así como en el mecanismo de detoxificación de radicales libres generados en el metabolismo; siendo el fotosistema II (FS II) uno de los componentes más sensibles del aparato fotosintético (Singh-Tomar y Jajoo, 2013). También, en diversos estudios se ha observado que los metales pesados ejercen un efecto negativo en la relación de los valores de fluorescencia de clorofila *a* y clorofila *b*, debido a una hidrólisis más rápida de Chl *a* comparado con Chl *b*.

Así mismo, se ha observado la sustitución de Mn en la molécula de clorofila por metales pesados como Cd, Zn, Cu y Hg, dando lugar a un cese abrupto de la fotosíntesis. Siguiendo con esto, los resultados obtenidos en nuestro estudio la disminución significativa de la clorofila en las plántulas de *P. juliflora* que fueron expuestas a cobre y en menor proporción con las plántulas expuestas a Cd^{2+} podrían ser debido a una posible sustitución de Mn por Cu^{2+} en el cloroplasto. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de eficiencia fotosintética mediante la técnica de medición de la fluorescencia de la clorofila (Singh-Tomar y Jajoo, 2013). En donde la inhibición de la fotosíntesis por Cu^{2+} indica un efecto del metal en el cierre de los centros de reacción del fotosistema II y el complejo de disociación de la molécula del

agua con dosis altas del metal en las últimas horas de exposición (48 hr). De la misma manera, similares resultados fueron observados cuando las plántulas de *P. juliflora* cuando fueron expuestas a 100 y 1000 μM de Cd^{+2} . Resultados similares han sido reportados por Nwugo y Huerta, (2008), en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) expuestas a cadmio en condiciones hidropónicas, quienes observaron que los tratamientos con Cd^{+2} disminuyeron los valores de Fm y Fv/Fm. El daño generado por las dosis crecientes de Cu^{2+} y Cd^{+2} no solo se registró en la eficiencia fotosintética y en los pigmentos fotosintéticos, sino también se vio reflejado a nivel fisiológico. Lo anterior se comprobó mediante el análisis de la fuga de electrolitos en el tejido foliar de *P. juliflora* donde se observó una deficiencia ligera en los valores de fuga en las muestras de *P. juliflora* que fueron estresadas con Cd^{2+} contrastante con un cambio ligeramente más significativo en las plantas expuestas a Cu^{2+} que fueron sometidas a una mayor concentración y con un mayor tiempo de exposición.

Estos resultados muestran que la fuga de electrolitos y la clorosis del tejido foliar observados en *P. juliflora* son generados por los metales que causan un daño significativo en la permeabilidad de la membrana celular, resultado de procesos de lipoperoxidación y estrés oxidativo. Similares estudios han sido reportados por Benimeli *et al.* (2010) en plantas de maíz (*Zea mays*) en donde el exceso de cobre generó una inhibición del crecimiento, clorosis de las hojas e incremento de la fuga de electrolitos.

Por su parte, en los análisis de acumulación de Cu^{2+} y Cd^{2+} se ha demostrado que los metales esenciales o no esenciales, provocan una disminución significativa del crecimiento y la acumulación de la biomasa de forma directa o indirectamente (Gangwar *et al.*, 2014). En el presente estudio, los resultados obtenidos con las plantas de *P. juliflora* expuestas a cadmio y cobre tuvieron un comportamiento similar acumulando los mayores niveles de concentración en las raíces comparado con las

partes aéreas. Esto debido a la posible presencia de mecanismos de tolerancia y de transferencia de los metales de la raíz a la parte aérea la cual es mediada por mecanismos activos (Chmielowska-Bąk y Deckert, 2012). De la misma manera, estudios realizados por Senthilkumar *et al.*, (2005) en especies de *P. juliflora* expuestas a Cu^{2+} y Cd^{2+} indican que dicha especie es capaz de acumular mayor concentración de Cd^{2+} en el sistema radicular comparativamente con el tejido aéreo. En este sentido, Felici *et al.*, (2014), observaron que plantas de soya *Glycine max* expuestas a cadmio es acumulado principalmente en las raíces y sólo una pequeña porción es transportada a los órganos aéreos, así mismo, las actividades metabólicas en los diferentes compartimentos celulares son indirectamente afectadas.

Por su parte Lehotai *et al.*, (2011), en chícharo (*Pisum sativum* L. cv. Rajnai törpe y cv. Lincoln) sometidos a estrés por cobre, encontraron que la mayor acumulación del metal se llevó a cabo en el sistema radicular de dichas especies comparado con las partes aéreas, demostrando de esta forma el bajo índice de translocación del Cu^{2+} hacia las hojas. Dicho estudio, concuerda con los resultados obtenidos en nuestra investigación en donde *P. juliflora* presentó bajos niveles de translocación de cobre y cadmio hacia las partes aéreas, acumulando la mayor concentración en las raíces, demostrando a su vez, que muy probablemente *P. juliflora* también implemente un tipo de mecanismo de defensa al estrés por metales a nivel radicular.

De acuerdo a los resultados de nuestro estudio se determinó que *P. juliflora* puede ser clasificada como una planta fitoestabilizadora de Cd^{2+} y Cu^{2+} dada las concentraciones de cada metal mayormente acumuladas en los tejidos radiculares, con una limitada translocación a los tejidos aéreos de *P. juliflora*. En donde una planta fitoestabilizadora será aquella que mantenga los niveles relativamente bajos en sus tejido foliar y puedan contener grandes cantidades de metales en sus raíces (Baker y Walker 1990; Mganga

et al., 2011; Seth, 2011). No obstante la participación de moléculas quelantes como las fitoquelatinas, metalotioneinas o la presencia de compuestos tioles, podrían favorecer a una mayor acumulación de los metales en la raíz, debido a que son considerados los principales ligandos de alta afinidad implicados en los procesos de detoxificación y tolerancia de metales esenciales y no esenciales como cobre y cadmio (Hossain *et al.*, 2012).

La tolerancia a metales pesados en plantas ha sido definida como la habilidad que tienen de sobrevivir en suelos contaminados que resultan tóxicos para otras especies de plantas (Yong-Hoe *et al.*, 2013). Esto como resultado del desarrollado de diversos mecanismos basados en la compartimentación de los metales en los tejidos inactivos, quelación por los ligandos de metales y la detoxificación por antioxidantes (Al-Shanfari y Abdullah, 2014; Kapoor *et al.*, 2014). En este contexto, el presente estudio permitió identificar por primera vez la presencia de MTs y FQs en plantas de *P. juliflora* expuestas a cobre y cadmio. Lo cual es de gran relevancia ya que muestra la capacidad de esta planta de inducir mecanismos de tolerancia a metales específicos como las MTS y FQs durante el estrés a metales esenciales y no esenciales. Las MTs participan en la tolerancia debido a su función como moléculas quelantes y transportadoras de iones. Estas pueden unir de manera eficiente los elementos tóxicos como resultado de la formación de enlaces mercaptídeos (azufre-metal) con numerosos residuos de Cys (presentes en las proteínas) y el metal. De tal forma que contribuyen a la detoxificación de metales mediante la regulación de la concentración del metal en el citosol (Kumar *et al.*, 2012; Dabrowska *et al.*, 2013). Por otro lado, existen varios estudios con diferentes tipos de plantas y algas, en donde se ha observado que la acumulación de fitoquelatinas es inducida bajo estrés por Cu^{2+} debido a la toxicidad generada por el metal bajo un nivel de exposición agudo, lo que a su vez sugiere que

las FQs muy probablemente no participan en el secuestro de Cu^{2+} en condiciones de exposición subtóxico. Así mismo, se ha asumido que las FQs pudieran estar funcionando en el mantenimiento de la homeostasis celular o en el tráfico de nutrientes esenciales como Cu y Zn (Henk *et al.*, 2014). De esta manera con base en lo anterior y de acuerdo a los resultados observados en nuestro estudio, se asume la posible participación de las fitoquelatinas como principales moléculas participantes en los mecanismos de tolerancia en *P. juliflora*, debido en parte a que los requerimientos de Cu^{2+} son mínimamente necesarios para inducir FQs cuando dicho metal se encuentra en concentraciones considerables en las células vegetales o incluso cerca de los umbrales de toxicidad (Henk *et al.*, 2014). Por otro lado, se observó que la inducción de FQs en las plantas de *P. juliflora* expuestas a cadmio, tuvieron una menor participación debido a un bajo nivel de expresión observado. Contrariamente a nuestros resultados, se ha demostrado que la fitoquelatin sintasa es constitutivamente expresada, pero la síntesis de fitoquelatinas (FQs) es únicamente inducida en presencia de metales no esenciales como Cd (II), As (III) y Hg (I) ó por concentraciones elevadas de metales esenciales de transición como Zn (II) y Cu (II) (Won-Yong *et al.*, 2014). Estudios realizados en diferentes especies de plantas expuestas a diversos metales esenciales y no esenciales, han reportado diversos niveles de expresión de proteínas quelantes de metales como las fitoquelatinas (FQs). A su vez, se ha demostrado que la síntesis de FQs se lleva a cabo bajo el estrés por metales como Hg, Cu, Zn, Pb y Ni, habiéndose demostrado que no sólo es exclusivo de Cd. Aún cuando el cadmio es el primer inductor de la síntesis de estas proteínas, la exposición de *P. juliflora* a Cu^{2+} y Cd^{2+} en nuestro estudio resultó ser mayormente expresado bajo el estrés por Cu^{2+} en toda la evaluación del experimento comparado con las plantas estresadas por Cd^{2+} .

Por otra parte, se tiene bien documentado que los genes de FQs se encuentran presentes en todas las plantas superiores, encontrándose secuencias homólogas en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas como *P. juliflora* (Yadav, S., 2010). Con base a lo anterior y considerando nuestros resultados es posible indicar que la expresión de las moléculas quelantes (MTs y FQs) inducidas en plantas de mezquite expuestas a Cu^{2+} y Cd^{2+} , son uno de los primeros mecanismo de tolerancia primario, la producción de metalotioneinas bajo estrés con ambos metales. Sin embargo, no se descarta la participación de otros mecanismos o componentes enzimáticos como los que forman parte del sistema de defensa antioxidante como mecanismo de defensa por el estrés oxidativo provocado por Cu^{2+} y Cd^{2+} (Yanyan *et al.*, 2013). Finalmente, considerando la eficacia en la acumulación y tolerancia de los metales, se consideró a *P. juliflora* como una planta potencial para la descontaminación de suelos contaminados con metales en las regiones semiáridas y áridas del Valle de Mexicali.

VIII. CONCLUSIONES

Con base en el análisis de nuestros resultados se observó que las especies de *P. juliflora* expuestas a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición de Cd^{2+} y Cu^{2+} demostraron ser un buen modelo de estudio para la evaluación del estrés por metales pesados debido en gran parte a las características físicas y biológicas de la especie. Así mismo, fue posible demostrar que la especie de *P. juliflora*, presenta la capacidad de acumular metales como cadmio y cobre mayormente en sus tejidos radiculares, lo cual hace posible la implementación de dicha especie para fines de fitorremediación de suelos contaminados con metales. Por otro lado, se logró la obtención, amplificación, secuenciación y el depósito de las secuencias en la base de datos del GenBank, lo cual es de suma importancia debido a que son nuevos registros de los genes MT's (*PgMt2 Isoforma 1*, *PgMt2*, *PgMt3*) y la FQ's (*PjFQs*) para las especies de *P. glandulosa* y *P. juliflora*, respectivamente. Finalmente debido a las características que presentan las especies de *Prosopis* sp, y con base en la literatura se recomienda el uso de estas especies para el mejoramiento y conservación de los ecosistemas áridos y semiáridos de Baja California sujetos a contaminantes como Cd^{2+} y Cu^{2+} .

IX. LITERATURA CITADA

- Abbaslou, H., Martin, F., Abtahi, A. and Moore, F. 2014. Trace element concentrations and background values in the arid soils of Hormozgan Province of southern Iran. Archives of Agronomy and Soil Science. <http://dx.doi.org/10.1080/03650340.2013.864387>.
- Al-Shanfari, A.B. and Abdullah S.N.A. 2014. Isolation and expression analysis of transcripts encoding metallothioneins in oil palm. Vol. 58 (1): 18-28.
- Amirjani, M R. 2012. Effects of Cadmium on Wheat Growth and Some Physiological Factors, International Journal of Forest, Soil and Erosion, 2 (1):50-58.
- Amoroso, M. J. & Gómez, M. I. 2010. Bioaccumulation of Copper by *Zea mays*: Impact on Root, Shoot and Leaf Growth. Water Air Soil Pollut 210: 365–370.
- Benimeli, C. S. & Medina, A. & Navarro, C. M. & Medina, R. B. & Chmielowska-Bąk, J. & Deckert, J. 2012. A common response to common danger? Comparison of animal and plant signaling pathways involved in cadmium sensing. 6(4):191-204.
- Benimeli, C. S., Medina, A., Navarro, C. M., Medina, R. B. 2010. Bioaccumulation of Copper by *Zea mays*: Impact on Root, Shoot and Leaf Growth. Water Air Soil Pollut 210:365–370
- Dąbrowska, G., Mierek-Adamska, A., Goc, A. 2013. Characterisation of *Brassica napus* L. metallothionein genes (BnMTs) expression in organs and during seed germination. Australian Journal of Crop Science AJCS 7(9):1324-1332.
- Espinosa-Reyes G., González-Mille, D.J. Ilizaliturri-Hernández, C. A., Mejía-Saavedra, J. V., Cilia-López, G., Costilla-Salazar, R. and Díaz-Barriga, F. 2014. Effect of Mining Activities in Biotic Communities of Villa de la Paz, San Luis Potosi, Mexico. BioMed Research International Article ID 165046, 13 pages.
- Felici, E., Almeida, C., Baldo, M. F., Martínez, L. D. Zirulnik, F. y Gómez, M. R. 2014. Analysis of metal profile in soybean after cadmium-induced oxidative damage. Journal of Coastal Life Medicine 2(6): 458-464.
- González-Mendoza, D. y Zapata-Perez, O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. Bol. Soc. Bot. Méx. 82: 53-61.
- Guan-Jhong Huang, Jeng-Shyan Deng, Hsien-Jung Chen, Shyh-Shyun Huang, Chun-Ching Shih and Yaw-Huei Lin. 2013. Dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase activities of two metallothionein-like proteins

- from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam. 'Tainong 57') storage roots. *Botanical Studies* 54:7.
- Han, F. X., & Singer, A. 2007. Trace Element Pollution In Arid Zone Soils. In *Biogeochemistry of Trace Elements in Arid Environments* (pp. 267-302). Springer Netherlands.
- Haque, N., J.R. Peralta-Videa, M. Duarte-Gardea, J. Gardea-Torresdey, L. 2009. Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial seeds. *Bioresource Technology* 100, 6177–6182.
- Henk, S., Merce, L., Riet, V., Hartley-Whitaker, J. and Bleeker, P. M. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 379, pp. 2381±2392.
- Hossain, M. A., Piyatida, P. Jaime A. Teixeira da Silva, and Fujita, M. 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany* Volume Article ID 872875, 37 pages.
- Jayaram, K. and Prasad, M.N.V. 2009. Removal of Pb (II) from aqueous solution by seed powder of *Prosopis juliflora* DC. *Journal of Hazardous Materials* 169: 991–997.
- Jiménez-Vieyra María E. y María L. Zambrano-Zaragoza. 2011. Cuantificación de Cobre en Polifenoloxidasas de Frutas Tropicales por Espectrofotometría de Absorción Atómica. *Información Tecnológica* Vol. 22 N° 2, 15-22.
- Kai-Wei, J., Yung-I L., Hung-Yu L., Chiung-Huei W., y Bo-Ching C. 2012. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environ Sci Pollut Res* 19:1315–1322.
- Kapoor, D., Kaur, S. and Bhardwaj, R. 2014. Physiological and Biochemical Changes in *Brassica juncea* plants under Cd-induced stress. *Biomed Res Int*. 2014:726070. doi: 10.1155/2014/726070.
- Kumar, G. H., Kushwaha, R., Panjabi-Sabharwal, V., Kumari, S., Joshi, Ratna, R. Karan, Mittal, S., Pareek, S. Singla, L. and Pareek, A. 2012. Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of

- OsMT1e-P confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging. *BMC Plant Biology* 12:107.
- Lehotai, N., Petô, A., Weisz, M., Erdei, L., Kolbert, Z. 2011. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in pea cultivars under copper exposure. *Acta Biologica Szegediensis* Volume 55(2):273-278.
- Lotmani, B. and Mesnoua, M. 2011. Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*. *African Journal of Biotechnology* 10(50): 10143-10148.
- Machado-Estrada, B. Calderón, J., Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Zavala, J. S. 2013. Accumulation of arsenic, lead, copper, and zinc, and synthesis of phytochelatin by indigenous plants of a mining impacted area. *Environ Sci Pollut Res* 20:3946–3955.
- Martí Luis Silvia Troilo María Flavia Filippini Carlos Salcedo Adriana Bermejillo Analía Valdés, Silvia Troilo, Carlos Salcedo, Analía Valdés. 2009. Monitoreo de cadmio y plomo en los principales fungicidas cúpricos comercializados en Mendoza, Argentina. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XLI. N° 2, 109-116.
- Mganga, N., Manoko, MLK and Rulangaranga, ZK. 2011. Classification of plants according to their heavy metal content around north mara gold mine, tanzania: implication for phytoremediation. *Tanz. J. Sci.* Vol. 37. Págs. 109-119.
- Muhammad, S. Iqbal, M. Zafar; M. A. 2008. Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, Vol. 12, No. 3, pp. 61-66.
- Munzuroglu, O, Zengin, FK. 2006. Effect of cadmium on germination, coleoptile and root growth of barley seeds in the presence of gibberellic acid and kinetin. *J Environ Biol.* 27(4):671-7.
- Nóra Lehotai, Andrea Petô, Máté Weisz, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert. 2011. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in pea cultivars under copper exposure. *Acta Biologica Szegediensis*. Volume 55(2):273-278.
- Salt, D. and Krämer, U. 2000. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In: I. Raskin and B. D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*, Wiley & Sons, New York, USA: 231-246.

- Sancllemente, M. A. y Peña, E. J. 2008. Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* walter (Onagraceae) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Acta biol. Colomb* 13(1):175 – 186.
- Senthilkumar P. S., Prince, W. P.M. Sivakumar, S. Subbhuraam, C.V. 2005. *Prosopis juliflora*—A green solution to decontaminate heavy metal (Cu and Cd) contaminated soils. *Chemosphere* 60 1493–1496. *Plants under Cd-Induced Stress*. BioMed Research International.
- Seth, C.S., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, M. Gielen, H., Opdenakker, K., Weyens, J., Vangronsveld, J. y Cuypers, A. 2011. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant, Cell & Environment* 35(2): 334-346.
- Sethy, S. K., & Ghosh, S. 2013. Effect of heavy metals on germination of seeds. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 4(2), 272–275. doi:10.4103/0976-9668.116964.
- Singh, P.K., Tewari, R.K. 2012. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology* 24:107-112.
- Singh-Tomar, R. and Jajoo, A. 2013. A quick investigation of the detrimental effects of environmental pollutant polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on the photosynthetic efficiency of wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology* 22:1313–1318.
- Slamet-Loedin, I. H., Johnson-Beebout, S. E., Somayanda, I. and Tsakirpaloglou N. 2014. Enriching rice with Zn and Fe while minimizing Cd risk. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2015.00121.
- Toro-Guerrero, F., Kretschmar, J. T. y Hinojosa-Corona, A. 2010. Estimación del balance hídrico en una cuenca semiárida, El Mogor, Baja California, México. *Tecnología y Ciencias del Agua*, vol. V, núm. 6, pp. 69.
- Usha, B., Venkataraman, G. y Parida, A. 2009. Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals in vitro. *Mol Genet Genomics* 281:99–108.
- Varun, M., D'Souza, R. and Pratas, Joao. 2011. Phytoextraction Potential of *Prosopis juliflora* (Sw) DC with Specific Reference to Lead and Cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol* 87:45-49.

- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol* 181:759-776. Volume 2014, Article ID 726070, 13 pages
- Won-Yong, S., Mendoza-Cózatl, D.G. Lee, Y., Schroeder, J. I., Sang-Nag A., Hyun-Sook L., Wicker, T., Martinoia, E. 2014. Phytochelatin–metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 37, 1192–1201.
- 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* 76 (2010) 167–179.
- Yanyan, Lv., Xiaopeng, D., Lingtong, Q., Yan, X., Zhenguo, S. 2013. Metallothioneins BcMT1 and BcMT2 from *Brassica campestris* enhance tolerance to cadmium and copper and decrease production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 367:507–519.
- Yong-Hoe Choea, Young-Saeng Kima, Il-Sup Kima, Mi-Jung Baea, Eun-Jin Leea, Yul-Ho Kimb, Hyang-Mi Parkb, Ho-Sung Yoon. 2013. Homologous expression of γ -glutamylcysteine synthetase increases grain yield and tolerance of transgenic rice plants to environmental stresses. *Journal of Plant Physiology* 170 610– 618.
- Zhang, H., Lian, C. and Shen, Z. 2009. Proteomic identification of small copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Annals of Botany* 103: 923–930.

X. ANEXOS

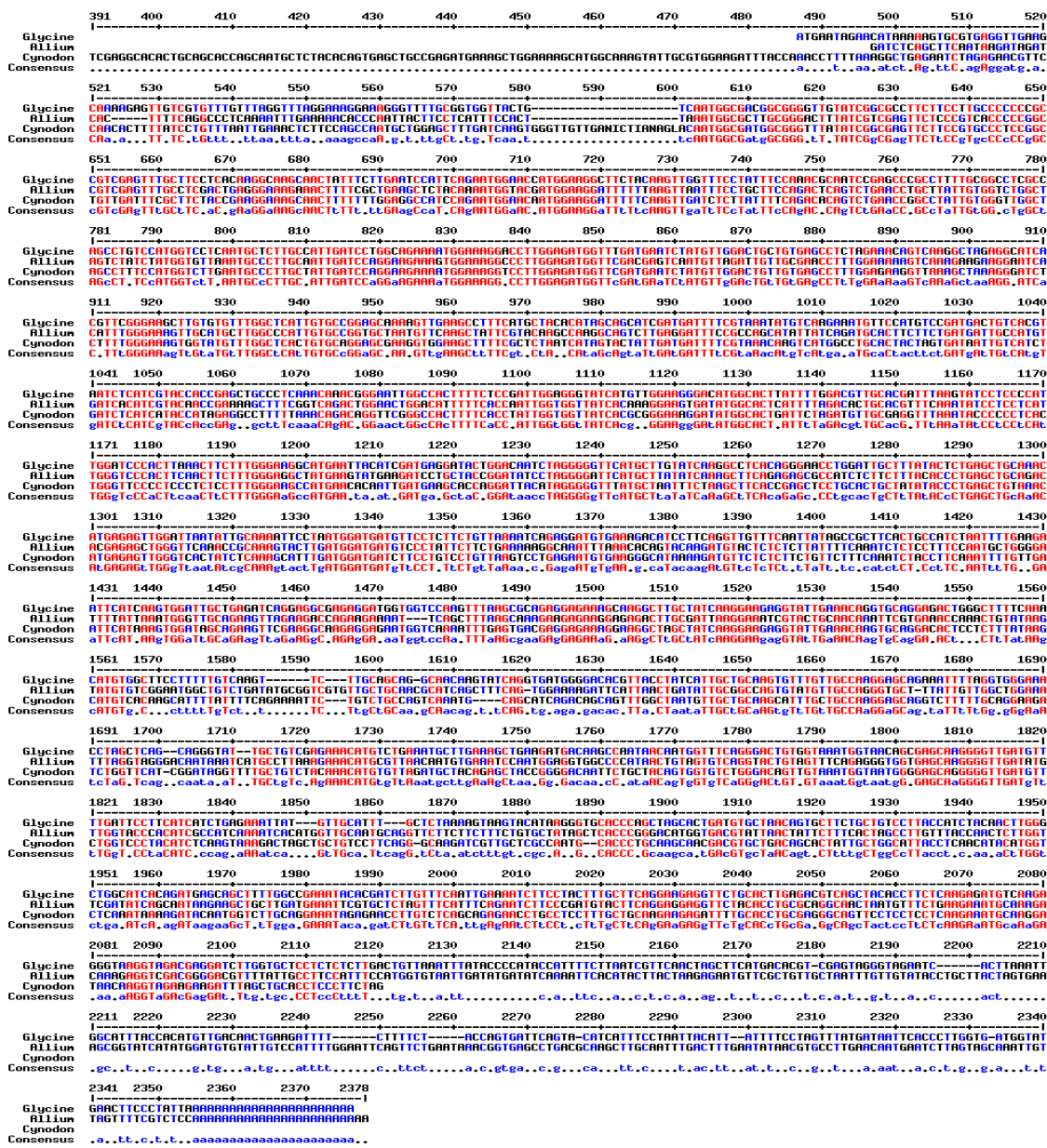


Figura 30. (a) Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de FQs reportado en otras plantas. (b) y (c) Alineación de nucleótidos correspondientes a secuencias del gen FQs de diferentes plantas.

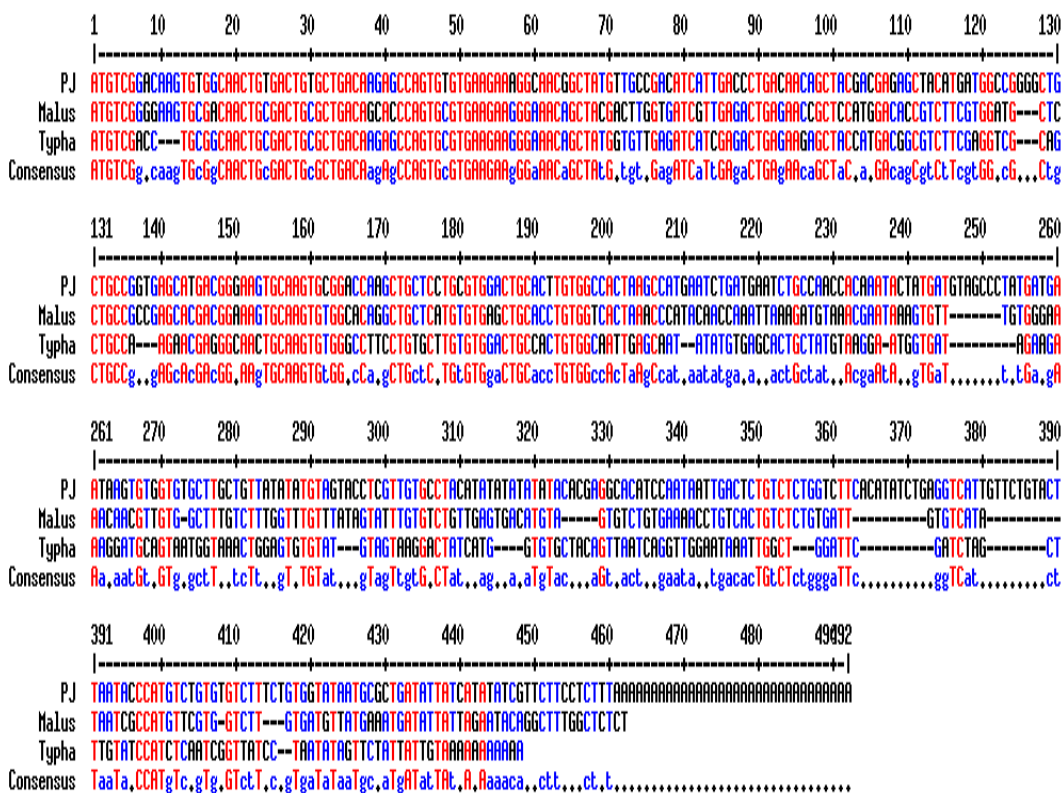


Figura 31. Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de *MT-1* reportado en otras plantas.

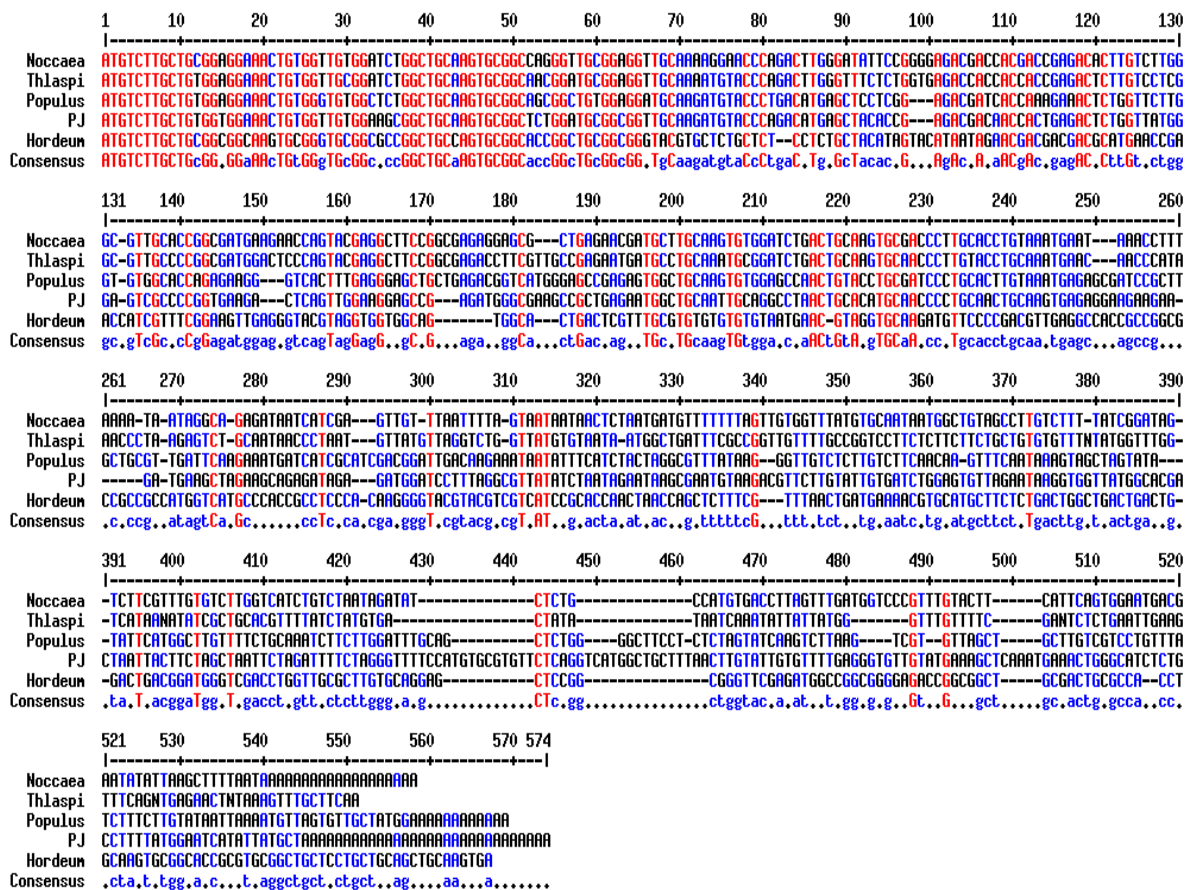


Figura 32. Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de *MT-2* reportado en otras plantas.

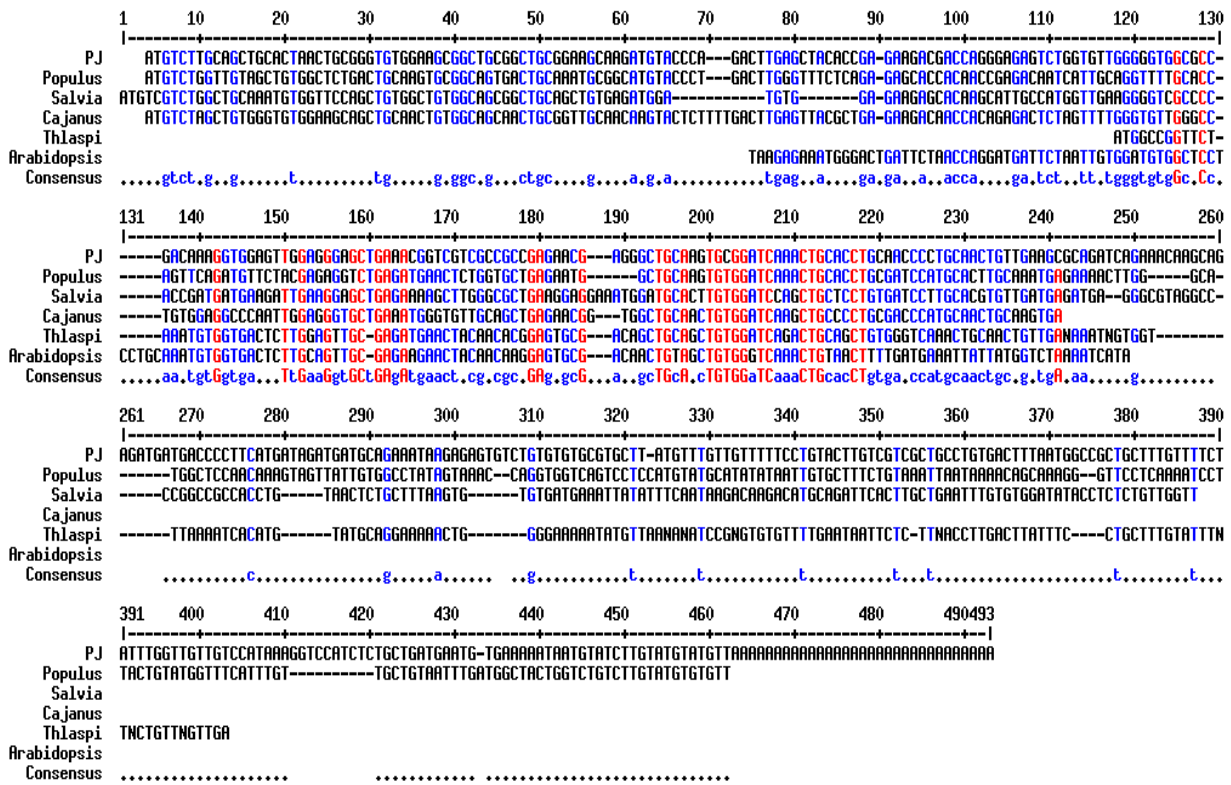


Figura 33. Alineación de los aminoácidos correspondientes a las secuencias análogas de *MT-3* reportado en otras plantas.

How To ▾

Nucleotide ▾ Michel-Lopez C
Save search Advanced

Display Settings: (v) Summary, Sorted by Default order [Send to:](#) (v)

Results: 4

- [Prosopis glandulosa metallothionein type 2 isoform 1 mRNA, complete cds](#)
1. 533 bp linear mRNA
Accession: KJ957829.1 GI: 668357708
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [Prosopis glandulosa metallothionein type 2 mRNA, complete cds](#)
2. 443 bp linear mRNA
Accession: KJ949044.1 GI: 663082488
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [UNVERIFIED: Prosopis juliflora phytochelatin synthase-like \(PCS\) mRNA, partial sequence](#)
3. 568 bp linear mRNA
Accession: KJ493795.1 GI: 592928530
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [Prosopis glandulosa metallothionein type 3 mRNA, complete cds](#)
4. 460 bp linear mRNA
Accession: KJ949045.1 GI: 663082490
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Display Settings: (v) Summary, Sorted by Default order [Send to:](#) (v)

Figura 34. Depósito de secuencias en la base de datos del *GenBank* correspondientes a los genes MT's de *P. glandulosa* y FQ's de *P. juliflora*.



Fast protocol for extraction of DNA from *Prosopis* spp leaves (plant adapted to arid environment) without liquid nitrogen

C.Y. Michel-López, D. González-Mendoza and O. Grimaldo-Juarez

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México

Corresponding author: D. González-Mendoza
E-mail: daniasaf@gmail.com

Genet. Mol. Res. 12 (3): 4090-4094 (2013)

Received September 14, 2012

Accepted January 31, 2013

Published September 27, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.27.10>

ABSTRACT. The extraction of high-quality genomic DNA from *Prosopis* spp for polymerase chain reaction (PCR) amplification is complicated, owing to the presence of a high percentage of secondary metabolites that bind to or co-precipitate with nucleic acids. In the present study, we report a modified sodium dodecyl sulfate/phenol protocol that eliminates the use of liquid nitrogen in the maceration process, β -mercaptoethanol in the buffer extraction, and the ethanol precipitation step. The A_{260}/A_{280} absorbance ratios of the isolated DNA were approximately 2.0 to 1.9, suggesting that the DNA fraction was pure and can be used for further PCR analysis. The DNA isolated by this protocol is of sufficient quality for molecular applications; this technique could be applied to other organisms that have similar substances that hinder DNA extraction. Finally, this proposal represents an alternative fast, cheap, and effective method for the isolation of genomic DNA from fresh leaves of *Prosopis* spp, even in low-technology laboratories.

Key words: Genomic DNA extraction; Polymerase chain reaction; *Prosopis* spp

Chemistry and Ecology, 2013
<http://dx.doi.org/10.1080/02757540.2013.851194>



Modifications of photochemical efficiency, cellular viability and total phenolic content of *Prosopis glandulosa* leaves exposed to copper

Claudia Yared Michel-López^a, Daniel González-Mendoza^{a*}, Esaú Ruiz-Sánchez^b and Roberto Zamora-Bustillos^b

^aInstituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC), Mexicali, México; ^bDivisión de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal, Merida, México

(Received 28 February 2013; final version received 17 September 2013)

The effects of copper (Cu^{2+}) on photochemical efficiency, cellular viability and total phenolic content in *Prosopis glandulosa* leaves were evaluated after 4, 8 or 12 h exposure to 0.1, 10 or 100 mM Cu^{2+} using the tissue tolerance test. The results showed that significant reductions ($p < 0.003$) of photochemical efficiency in *P. glandulosa* leaves were found after 8 h exposure to 100 mM Cu^{2+} compared with controls leaves. The results also showed a significant increase ($p < 0.05$) on electrolyte leakage values in *P. glandulosa* leaves after 4 h exposure to 100 mM Cu^{2+} compared with control leaves. Total phenolic content in *P. glandulosa* leaves only differed significantly when exposed 12 h to the highest concentration of Cu^{2+} . These results suggest that Cu^{2+} can produce reactive oxygen species that may form hydroxyl radicals that damage proteins and lipids, which in turn causes loss of integrity and reduce photochemical efficiency of leaves. In conclusion, the photochemical efficiency and cellular viability analyses can be used as useful physiological tools to assess early changes in photosynthetic performance of *P. glandulosa* in response to copper pollution.

Keywords: *Prosopis glandulosa*; heavy metals; photosynthesis; total phenolic content