

Evaluación de la toxicidad ocasionada por el exceso de micronutrientes en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Marco Alejandro Cañas Navarro, Yazmín Carreón Abud y Miguel Martínez Trujillo ✉

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán

Resumen

La toxicidad ocasionada por los metales que sirven como micronutrientes, en concentraciones mayores a las que las plantas necesitan, puede ser evaluada de diferentes maneras mediante bioensayos. En este trabajo se utilizaron plantas de *A. thaliana* germinadas y crecidas directamente en medios de cultivo in vitro con níquel, zinc o cobre. Los aspectos que se consideraron para determinar la toxicidad fueron el crecimiento de la raíz primaria, clorosis de las hojas, la presencia de pelos radiculares y la actividad mitótica de la raíz primaria. Los resultados obtenidos demostraron que el níquel y el cobre son los más tóxicos, con algunas variantes en los cambios fenotípicos, ya que en 75 mM en ambos casos se presenta la clorosis de las hojas, la actividad mitótica se pierde con níquel y casi desaparece con cobre, los pelos radiculares se pierden en medios con níquel pero no en los medios con cobre. En cambio, el zinc resultó ser un metal que se tolera mejor por *Arabidopsis*, ya que la raíz primaria sigue creciendo aun a concentraciones de 300 μ M, la actividad mitótica se conserva aunque disminuida, la clorosis de las hojas es notable sólo a partir de 200 μ M y se presenta el desarrollo de raíces laterales y pelos radiculares de manera normal. Los resultados obtenidos se compararon con los reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo, en los que las plantas se germinaban y crecían en medios sin metal y posteriormente eran trasplantadas a medios con metal, encontrándose que las plantas de *Arabidopsis* toleran mejor la concentración de níquel cuando se germinan directamente en medios con el metal, con relación a cuando son germinadas en medios sin el metal y posteriormente trasplantadas a medios con el metal, tanto en la actividad mitótica como en el crecimiento de la raíz primaria. En lo referente al zinc, las plantas toleran mejor el trasplante con relación a la germinación y crecimiento directo en medios suplementados con el metal. Para el cobre no hubo diferencias notables entre un tratamiento y otro. Los análisis de toxicidad realizados en *A. thaliana* permiten simular condiciones de campo que pueden ser de utilidad en estudios ecológicos, de reforestación o de biorremediación.

Palabras clave: *Micronutrientes, toxicidad, plantas.*

Abstract

The toxicity caused by metals that serve as micronutrients, in concentrations greater than the plants need, this can be evaluated in different ways by bioassays. In this work, *A. thaliana* plants were germinated and grown directly in media with nickel, zinc or copper. The aspects considered for toxicity were the primary root growth, yellowing of leaves, presence of root hairs and mitotic activity of the primary root. The results showed that the nickel and copper are the most toxic, with some variation in the phenotypic changes, as at 75 mM in both cases shows the chlorosis of leaves, mitotic activity is lost and almost disappears; root hairs are lost in nickel media in the media but not with copper. In contrast, zinc proved to be better tolerated by *Arabidopsis*, since the primary root is growing even at concentrations of 300 mM, mitotic activity is retained even lowered, yellowing of the leaves is noticeable only from 200 mM and presents the development of lateral roots and root hairs normally. The results obtained were compared with those reported previously by our research group, in which the plants are germinated and grown in media without metal and were subsequently transplanted to media supplemented with metals, finding that *Arabidopsis* plants to be more tolerant to nickel when plants are germinated directly on the metal relative to when they are germinated on media without the metal and subsequently transplanted to the metal media, both in mitotic activity and the growth of the primary root. With regard to zinc, transplanting plants are more tolerant relative to the direct germination and growth in media supplemented with metal. For copper no significant differences between treatments were found. Toxicity tests conducted on *A. thaliana* simulate field conditions that can be useful in ecological studies, reforestation or bioremediation.

Key words: *Micronutrients, toxicity, plants.*

Introducción

La contaminación por metales pesados afecta al 12% de las tierras agrícolas del mundo (Moffat, 1999) y en el hemisferio norte el 80% de ésta es generada por actividades antropogénicas, mientras que el 20% restante es debido a causas naturales como depósitos de polvo producidos por el viento, erupciones volcánicas y evaporación del agua contaminada (Buat-Menard, 1984).

Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la tabla periódica que normalmente tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm³ (Passow *et al.*, 1961). El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas. Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, a los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de

✉ **Autor de correspondencia:** Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Francisco Múgica s/n, Col. Felicitas del Río, Morelia, Michoacán, México. CP 58066. Email: codigogenetico@gmail.com

aguas superficiales y subterráneas se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aun cuando se encuentran presentes en concentraciones bajas, los metales pesados pueden ser detectados ya sea en su estado elemental o enlazados en varios complejos con sales. Una vez en el ambiente, los metales pueden sufrir transformaciones a diferentes formas móviles y/o pueden ser inmovilizados en trampas ambientales (Cañizales-Villanueva, 2000).

El níquel es requerido por las plantas en concentraciones muy bajas, de 1.7 nmol/g o menos en biomasa seca y es esencial para las plantas, animales y bacterias (Eskew *et al.*, 1984). Este metal es un componente de la enzima ureasa, la cual está presente en un rango muy amplio de especies vegetales y se ha mencionado que puede tener un papel en la síntesis de fitoalexinas y en la resistencia de las plantas a las enfermedades (Brown *et al.*, 1987). La deficiencia de níquel tiene un rango amplio de efectos en el crecimiento y el metabolismo de las plantas y su ausencia impide completar el ciclo de vida de éstas (Brown *op.cit.*).

Los humanos usan el níquel para muchas aplicaciones diferentes, siendo la más común como ingrediente del acero y otros productos metálicos. El exceso de níquel es tóxico para las plantas, los síntomas de toxicidad se observan entre 0.19 y 0.85 mmol/g en peso seco de la planta e incluyen la inhibición del crecimiento de la raíz y clorosis entre las venas de la hoja (Krämer *et al.*, 1997). Algunas plantas como *Thlaspi goesingense* son tolerantes a concentraciones elevadas de níquel y pueden acumular concentraciones hasta del 3% en peso seco de la planta (Freeman *et al.*, 2004). Esta tolerancia al níquel se ha reportado que depende de proteínas que transportan este metal a las vacuolas de las células (Persans *et al.*, 2001).

El uso del zinc en productos galvanizados ha contribuido a la contaminación de los suelos, así como su extracción en zonas de minas (Dudka *et al.*, 1996). El zinc es uno de los micronutrientes que se encuentra en las plantas en cantidades de aproximadamente 20 mg/Kg de peso seco (Salisbury y Ross, 1991). Este metal es un constituyente de numerosas enzimas como anhidrasas, oxidasas y peroxidasas y juega un papel importante en regular el metabolismo del nitrógeno, la multiplicación celular, la fotosíntesis y la síntesis de auxinas (Rout y Das, 2003). Una de las funciones importantes del zinc es en la regulación de la expresión de genes al formar parte de factores de transcripción, particularmente en los dominios de las proteínas conocidos como dedos de zinc; varias de estas proteínas han sido implicadas en la regulación de procesos biológicos importantes como desarrollo de la flor, morfogénesis regulada por la luz y respuestas a patógenos (Takatsuji, 1998). Se ha determinado la participación de 3 genes en la captación de zinc en plantas de *Arabidopsis thaliana*, *ZIP1* y *ZIP2* se expresan en raíces cuando existe una deficiencia de zinc y *ZIP4* se expresa tanto en tallos como en raíces (Grotz *et al.*, 1998). Se ha reportado que el exceso de zinc no inhibe la germinación, pero sí el crecimiento de la raíz en concentraciones de 7 mM en plantas de la leguminosa arbustiva *Cajanus cajan*. Otros síntomas de la toxicidad ocasionada por zinc son el enanismo de las plantas, clorosis y una reducción en la producción de biomasa (Rout y Das, 2003).

La contaminación natural por el cobre en el suelo es

relativamente poco común en la naturaleza. Sin embargo, algunas actividades humanas han contribuido al incremento de los niveles de éste y otros metales traza en el agua y el suelo usados para la agricultura. Algunos de los ejemplos son el uso frecuente de fungicidas, pesticidas y herbicidas con elevadas concentraciones de cobre, la aplicación excesiva de fertilizantes que contienen metales para corregir las deficiencias nutricionales del suelo, el uso de abonos orgánicos provenientes de animales alimentados con aditivos metálicos, así como desechos secos y húmedos, aguas residuales industriales y actividades mineras (He *et al.*, 2005). El cobre está presente en diversas enzimas o proteínas implicadas en los procesos de oxidación y reducción, por ejemplo, la citocromo oxidasa una enzima respiratoria que se halla en las mitocondrias y la plastocianina, una proteína de los cloroplastos que cataliza la transferencia de electrones entre el citocromo b6f y el fotosistema I (Rae *et al.*, 1999). El receptor de etileno ETR1, es una proteína transmembranal que requiere la unión de cobre para su funcionamiento (Rodríguez *et al.*, 1999). Además, el cobre junto con el zinc es un cofactor de dos superóxido dismutasas (CDS1, CDS2) de las siete que se han encontrado en *Arabidopsis*; CDS1 es activa en el citosol mientras que CDS2 es activa en el estroma del cloroplasto (Bowler *et al.*, 1992). La entrada de iones de cobre en las plantas depende de transportadores específicos, de los cuales se ha identificado COPT1 y otros 4 homólogos en *Arabidopsis thaliana* (Sancenon *et al.*, 2003). La entrega del cobre al estroma para el funcionamiento de la superóxido dismutasa CSD2 sólo requiere a la proteína transportadora PAA1. Otra proteína similar (RAN1) es requerida para la entrega del cobre a los receptores de etileno (Hirayama *et al.*, 1999).

A. thaliana se ha utilizado para evaluar la toxicidad producida por algunos metales en medios sólidos en condiciones *in vitro*. En estos trabajos las plantas fueron germinadas y crecidas primeramente en medios MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suplementos de metales y posteriormente trasplantadas a medios con diferentes concentraciones de metales. Ortiz-Castro (2005) reportó que el dicromato de potasio inhibe el crecimiento total de la raíz primaria en concentraciones de 200 mM y asimismo inhibe la actividad mitótica del meristemo de la raíz. Sántiz-Gómez (2006) reportó en las mismas condiciones, que el cloruro cúprico inhibe el crecimiento de la raíz primaria en concentraciones de 90 mM. Se determinó que el níquel, plomo y zinc afectan el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*, primero inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y a concentraciones mayores afectando el desarrollo del follaje y producción de raíces laterales (Vargas, 2007). Asimismo, determinó que la toxicidad relativa de los metales analizados se encuentra en el siguiente orden: Ni \neq Pb \neq Zn y se confirmó que el bioensayo utilizado tiene mayor sensibilidad que los reportados con anterioridad en otras plantas. Además, el crecimiento de la raíz primaria se correlacionó con la actividad mitótica del meristemo.

En este trabajo se abordó el análisis de la toxicidad de tres micronutrientes, zinc, níquel y cobre, mediante un sistema de crecimiento de plantas de *A. thaliana* germinadas y crecidas en condiciones de cultivo *in vitro*, directamente en los medios de cultivo con los metales, para simular otro tipo de condiciones

a las que las plantas se pueden enfrentar cuando las semillas llegan a suelos contaminados.

Materiales y métodos

Material biológico

Las semillas que se utilizaron fueron de *A. thaliana* *CycB1;1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), que contiene el promotor del gen que codifica para la ciclina mitótica de *A. thaliana* *CycB1;1* fusionado al gen *uidA* y una caja de destrucción de ciclina para la enzima β -glucuronidasa, por lo que la proteína se degrada después de cada ciclo celular. Esta línea permite monitorear la actividad del ciclo celular de manera temporal y espacial. Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 96% durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 500 μ l de cloro comercial (Cloralex® diluido al 20% con agua desionizada estéril) durante 8 minutos y se realizaron 3 lavados con agua desionizada estéril. Finalmente, se dejaron en 700 ml de agua estéril a 4 °C durante 72 horas para que la germinación fuera más uniforme. Todo el procedimiento se llevó a cabo en la campana de flujo laminar.

Preparación de medios de cultivo para plantas suplementados con metales

Para preparar medio nutritivo basal MS, se utilizó un volumen de 100 ml de agua destilada, a la cual se le agregó 2.2 g de sales MS y 2 g de sacarosa y se disolvió con agitación. Se agregó 1.0 g de agar para plantas y posteriormente se le agregaron los metales para obtener las diferentes concentraciones. El níquel se utilizó a 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M y 75 μ M; el zinc a 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M y 300 μ M; el cobre a 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M y 75 μ M. Se ajustó el pH a 5.7- 5.8 y se esterilizó por 20 minutos. Posteriormente se vació en cajas de petri.

Condiciones de crecimiento de plantas

Las semillas se germinaron directamente en medios de cultivo con los metales y sus controles respectivos sin metales; la siembra se llevó a cabo el mismo día cuando se prepararon los medios de cultivo. Las cajas con las semillas en germinación se incubaron en una cámara de crecimiento de manera vertical para favorecer el crecimiento de las raíces sobre la superficie del medio y medir el crecimiento de la raíz primaria. Las condiciones de crecimiento fueron: temperatura 22 °C, fotoperiodo de 18 h de luz (300 μ M $m^{-2} s^{-1}$) y 6 h de oscuridad, con una humedad de 70-75 %. A los 8 días después de la germinación se hicieron las mediciones de las raíces y la observación al microscopio compuesto.

Análisis histoquímico de la actividad de β -glucuronidasa

La actividad de la β -glucuronidasa se determinó mediante el sustrato x-gluc (Phytochemistry laboratories X877) que produce una coloración azul al dimerizarse. El procedimiento fue el siguiente: a) las plantas se incubaron por 24h en una solución al 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil, β -D-glucurónido (x-gluc), en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH = 7) conteniendo 2 mM (0.59 g/l) de ferrocianuro de potasio (0.59 g/l) y 2 mM (0.65 g/l) de ferrocianuro de potasio.

Microscopía

Las raíces de *A. thaliana* fueron observadas en un microscopio compuesto Axiostar Zeiss Plus a 40 X. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Sony Cybershot DSC-S75 adaptada al microscopio y procesadas con el software Zeiss AxioVision 4AC.

Resultados

Para evaluar la toxicidad ocasionada por el níquel, zinc y cobre en *A. thaliana* se utilizó un sistema *in vitro*, germinado y creciendo las plantas en medios MS con diferentes concentraciones de los metales.

Crecimiento de *A. thaliana* en medios con níquel

Para determinar las concentraciones tóxicas de níquel, se utilizaron concentraciones iniciales de 0, 100, 200 y 300 μ M, determinándose una inhibición completa en 100 μ M (datos no mostrados). Posteriormente se utilizaron las concentraciones de 0, 25, 50 y 75 μ M, para analizar el crecimiento. Las plántulas fueron crecidas directamente en el medio suplementado con el metal (Figura 1). La inhibición de la raíz primaria fue del 50% en 50 μ M y del 90% en 75 μ M; en estos casos hubo clorosis en el follaje y poco crecimiento de raíces laterales, mientras que en la concentración de 0 y 25 μ M hubo crecimiento normal de la raíz primaria, crecimiento de raíces laterales y crecimiento de pelos radiculares (Figura 1). También pudo observarse que en la concentración de 75 μ M no hubo crecimiento de pelos radiculares. La clorosis de las hojas se presentó hasta la concentración de 75 μ M. Por lo que respecta a la actividad mitótica, se observó que a 50 mM disminuye y prácticamente se pierde a 75 mM (Figura 1), lo que se correlaciona con los datos de crecimiento de la raíz primaria, ya que en 50 mM persiste un crecimiento de la raíz primaria.

Crecimiento de plántulas en medios con zinc

Para determinar la toxicidad de zinc se utilizó una concentración de 0, 100, 200 y 300 μ M, las plántulas fueron crecidas directamente en medios suplementados con el metal. La inhibición del crecimiento de la raíz primaria se observó desde 200 y 300 μ M, aunque no fue total (Figura 2). En las concentraciones de 100, 200 y 300 μ M, se observó clorosis del área foliar, pero también se observó que si hubo crecimiento de raíces laterales y de pelos radiculares en todas las concentraciones (Figura 2). Por lo que respecta a la actividad mitótica, ésta se observó en todas las concentraciones utilizadas (100, 200 y 300 μ M), no obstante que el crecimiento de la raíz primaria en la mayor concentración fue del 25% con respecto al control sin metal (Figura 2).

Crecimiento de plántulas y raíz primaria en medios con cobre

Para determinar las concentraciones tóxicas del cobre se utilizaron concentraciones iniciales de 0, 100, 200 y 300 μ M, determinándose una inhibición completa en 100 μ M (datos no mostrados). Posteriormente se utilizaron las concentraciones de 0, 25, 50 y 75 μ M para analizar el crecimiento. Las plántulas fueron crecidas directamente en medios suplementados con el metal. La inhibición de la raíz primaria se observó desde 50 μ M y fue mayor a 75 μ M. En 50 μ M del metal el

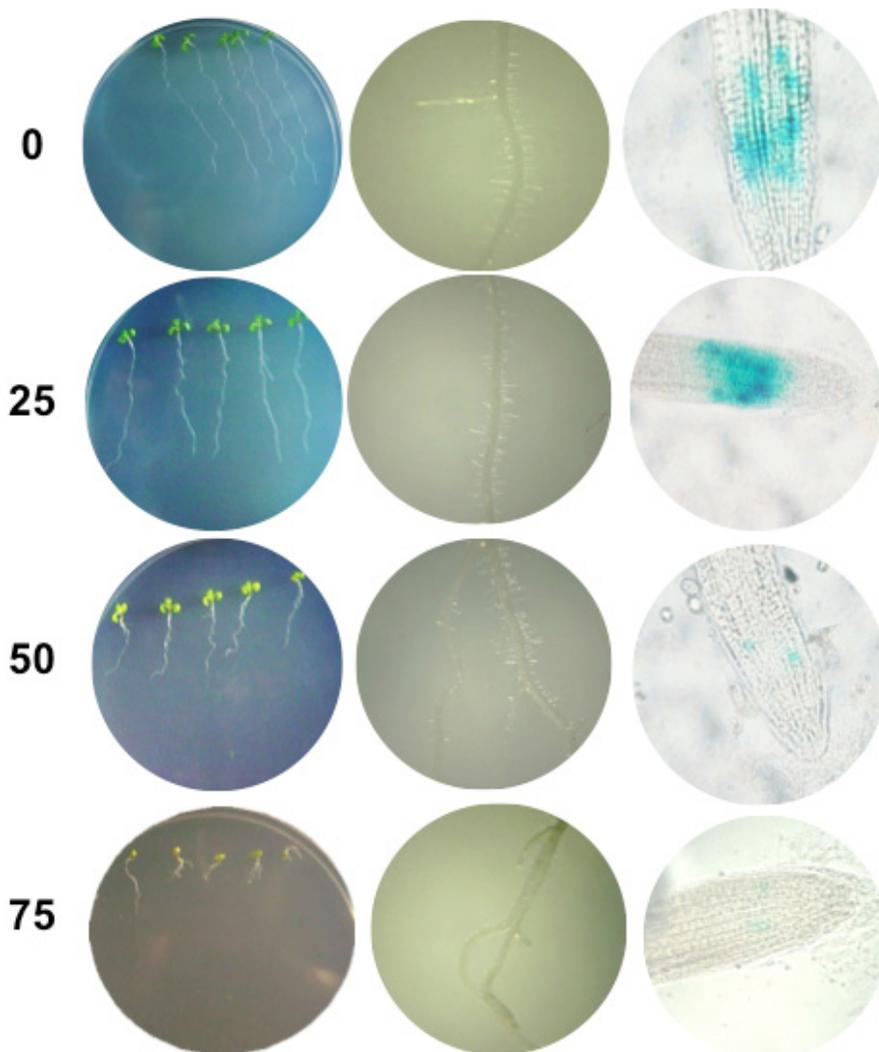


Figura 1. Plantas de *A. thaliana CycB1;1::uidA* germinadas y crecidas en medios de cultivo *in vitro* con níquel. Las semillas fueron germinadas directamente con el metal y se dejaron crecer por 8 días. Las concentraciones fueron utilizadas fueron 0 μM , 25 μM , 50 μM y 75 μM . Las fotografías en la segunda columna fueron tomadas en el microscopio estereoscópico a 20X. Las fotografías en la tercera columna fueron tomadas en el microscopio compuesto a 400X.

crecimiento fue del 50% con respecto al control y en 75 μM fue del 20% con respecto al control sin metal (**Figura 3**). La clorosis en el follaje se observó en la concentración de 75 μM . En las

concentraciones de 25, 50 y 75 μM , no hubo crecimiento de raíces laterales, también se observó que en estas mismas concentraciones si hubo crecimiento de pelos radiculares (**Figura 3**). Por lo

que respecta a la actividad mitótica, se presentó en las plantas crecidas en todos los medios con metal, no obstante que hubo reducción del crecimiento de la raíz primaria (**Figura 3**).

Discusión

La toxicidad ocasionada por los metales en concentraciones mayores a las que las plantas necesitan puede ser evaluada de diferentes maneras mediante bioensayos. Khosravi *et al.* (2005) han utilizado la planta *Azolla filicoides* en soluciones acuosas y han determinado la biomasa como peso fresco como un indicador para medir la toxicidad. Wang (1987) utilizó al mijo y la lechuga para determinar la toxicidad de metales mediante la inhibición del crecimiento de la raíz primaria al 50%; de igual manera Ivanov *et al.* (2003) utilizaron plántulas de maíz. Considerando la facilidad en el manejo de *A. thaliana* en condiciones de laboratorio, se han realizado bioensayos utilizando como marcador fenotípico el crecimiento de la raíz primaria para determinar la toxicidad. En este trabajo se utilizaron plantas de *A. thaliana* germinadas y crecidas directamente en medios de cultivo *in vitro* con níquel, zinc o cobre. Los aspectos que se consideraron para determinar la toxicidad fueron el crecimiento de la raíz primaria, la clorosis de las hojas, la presencia de pelos radiculares y la actividad mitótica de la raíz primaria.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que el níquel y el cobre son los más tóxicos, con algunas variantes en los cambios fenotípicos, ya que en 75 mM en ambos casos se presenta la clorosis de las hojas. La actividad mitótica se pierde con níquel y casi desaparece con cobre. Los pelos radiculares se pierden en medios con níquel pero no en los medios con cobre. En cambio, el zinc resultó ser un metal que se tolera mejor por *Arabidopsis*, ya que la raíz primaria sigue creciendo aun a concentraciones de 300 μM , la actividad mitótica se conserva aunque disminuida, la clorosis de las hojas es notable sólo a partir de 200 μM y se presenta el desarrollo de raíces laterales y pelos radiculares de manera normal (**Tabla 1**).

Tabla 1. Análisis comparativo de las alteraciones fenotípicas causadas por níquel, zinc y cobre en *A. thaliana*, para determinar la toxicidad en plantas germinadas y crecidas directamente en medios MS suplementados con los metales

	Inhibición del crecimiento de raíz primaria	Actividad Mitótica	Clorosis	Pelos radiculares
Níquel	Inhibición al 50% en 50 μM	Pérdida total a 75 μM	Presente a 75 μM	Pérdida a 75 μM
Zinc	Inhibición a partir de 200 μM	Reducción al 25% en 300 μM	Presente desde 200 μM	Presentes a 300 μM
Cobre	Inhibición al 50% en 50 μM	Presente pero reducida a 75 μM	Presente a 75 μM	Presentes a 75 μM

Orden de Toxicidad: Ni>Cu>Zn

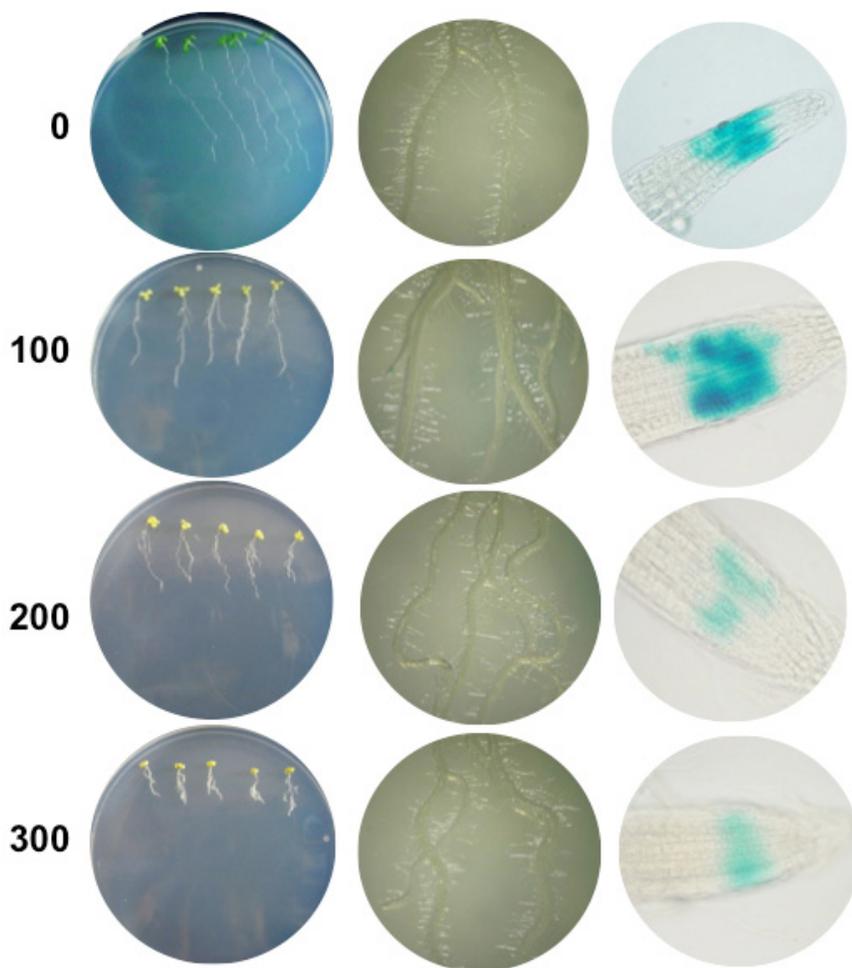


Figura 2. Plantas de *A. thaliana CycB1;1::uidA* germinadas y crecidas en medios de cultivo *in vitro* con zinc. Las semillas fueron germinadas directamente con el metal. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 0 μM, 100 μM, 200 μM y 300 μM del metal. Las fotografías en la segunda columna fueron tomadas en el microscopio estereoscópico a 20X. Las fotografías en la tercera columna fueron tomadas en el microscopio compuesto a 400X.

La toxicidad del níquel, zinc y plomo fue evaluada por Vargas (2007) y encontró que con base en los cambios de crecimiento de la raíz primaria y actividad

mitótica, el níquel fue más tóxico que el zinc. Por otro lado, Sántiz (2006) analizó los efectos tóxicos del cobre, incluyendo las variables mencionadas y encontró una alta toxicidad, similar a la reportada por el níquel por Vargas (2007). Los trabajos

anteriores fueron realizados con plantas germinadas y crecidas durante 6 días en medios sin metal y posteriormente transferidas a medios con los respectivos metales.

Aunque el orden de la toxicidad reportada en estudios de plantas crecidas en medios sin metal y trasplantadas a medios con metal es la misma con relación a lo reportado en este trabajo, en que las plantas se germinan y crecen directamente en los medios con el metal, existen diferencias de magnitud o intensidad. Las plantas de *Arabidopsis* toleran mejor la concentración de níquel cuando se germinan directamente en medios con el metal con relación a cuando son germinadas en medios sin el metal y posteriormente trasplantadas a medios con el metal, tanto en la actividad mitótica como en el crecimiento de la raíz primaria. En lo referente al zinc, las plantas toleran mejor el trasplante con relación a la germinación y crecimiento directo en el metal y respecto al cobre el comportamiento es muy similar (Tabla 2). Podría pensarse que en todos los casos las plantas se adaptarían mejor iniciando su crecimiento en el medio con el metal, pero esto sólo se encontró para el níquel, mientras que en el zinc se presentó el efecto opuesto y en el cobre no hubo diferencias notables. El porqué existen las diferencias anteriores es un aspecto que debe ser analizado considerando las funciones de estos metales, la internalización y las interacciones con otros compuestos en el interior celular.

El análisis de la toxicidad utilizando *A. thaliana* en condiciones de germinación y crecimiento directo en medios de cultivo con metales, permite simular las condiciones naturales en las que las semillas al dispersarse llegan a los suelos contaminados con metales y se enfrentan al estrés de germinar y crecer en esos suelos. Por otro lado, cuando las plantas se germinan en medios de cultivo sin metal y se trasplantan a medios con metal, se simulan las condiciones en las que las plantas germinadas y crecidas en vivero se trasplantan a los suelos contaminados con metales, ya sea con propósitos de biorremediación o de reforestación. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo, y los reportados por Vargas (2006) y Sántiz

Tabla 2. Comparación semicuantitativa de la intensidad del daño ocasionado por los metales en *A. thaliana* dependiendo de su crecimiento directo en medios suplementados con éstos con relación al crecimiento en medios sin el metal y posterior trasplante a medios suplementados con el metal

	Crecimiento de raíz primaria		Actividad Mitótica		Clorosis		Pelos radiculares	
	GD	T	GD	T	GD	T	GD	T
Níquel	>		>		<		<	
	El Ni es más tóxico cuando hay trasplante							
Zinc	<		<		>		=	
	El Zn es más tóxico en la germinación directa							
Cobre	=		=		=		=	
	La toxicidad del Cu es la misma en ambas condiciones							

GD= plantas crecidas en germinación directa con el metal
 T= Plantas germinadas y crecidas en MS y transferidas a medios con el metal

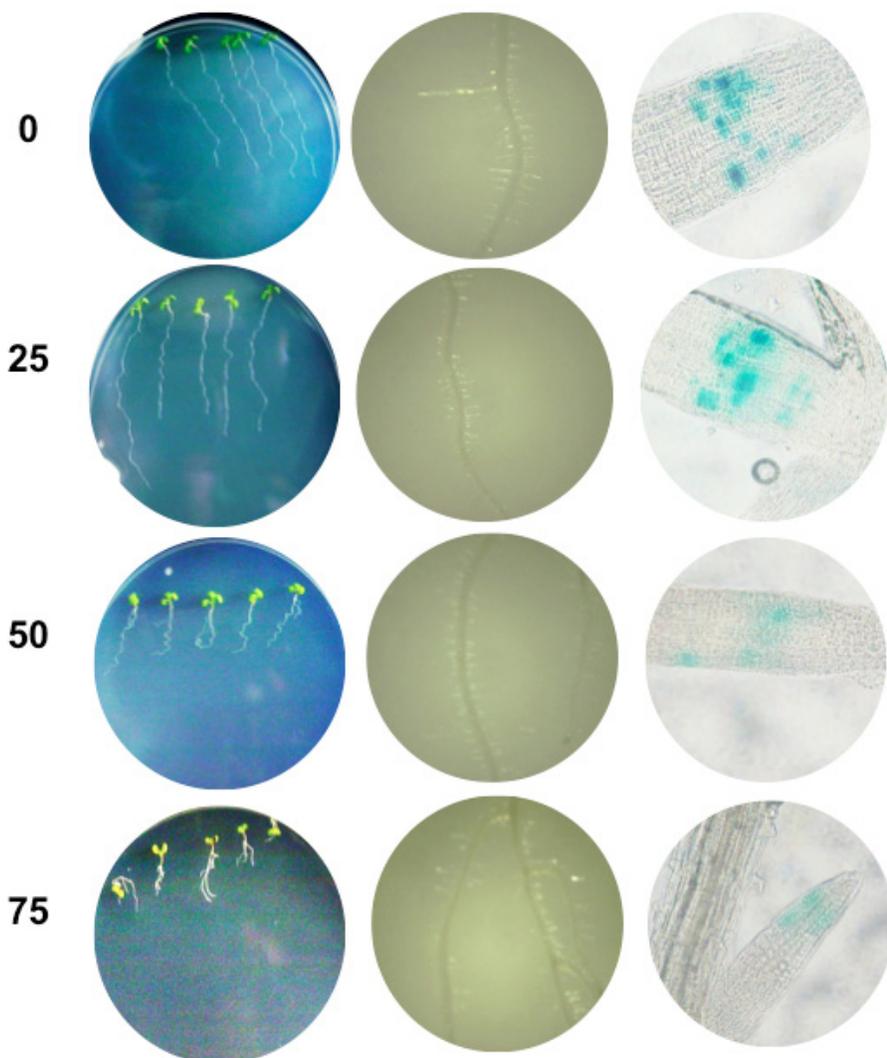


Figura 3. Plantas de *A. thaliana* *CycB1;1::uidA* germinadas y crecidas en medios de cultivo *in vitro* con cobre. Las semillas fueron germinadas directamente con el metal y se dejaron crecer por 8 días. Las concentraciones utilizadas fueron 0 μM , 25 μM , 50 μM y 75 μM del metal. Las fotografías en la segunda columna fueron tomadas en el microscopio estereoscópico a 20X. Las fotografías en la tercera columna fueron tomadas en el microscopio compuesto a 400X.

(2006), serán de utilidad en los trabajos de campo que se puedan realizar con otras plantas en suelos contaminados con metales,

Conclusiones

La toxicidad ocasionada por níquel, zinc y cobre puede ser evaluada en plantas germinadas y crecidas en medios de cultivo *in vitro* suplementados con cada uno de los metales.

La toxicidad causada en *A. thaliana* es similar con níquel y cobre y mayor con respecto al zinc.

La toxicidad causada por metales puede variar en su magnitud dependiendo de si las semillas se germinan directamente en los medios con el metal

con relación a si se germinan y crecen en medios sin el metal y su posterior trasplante a medios con el metal.

El uso de *A. thaliana* para evaluar la toxicidad de metales puede ser de utilidad en la propuesta de estrategias en la biorremediación o reforestación de suelos contaminados, ya que refleja condiciones utilizadas en el campo.

Referencias

Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:83-

116.

Brown PH, Welch RM, Cary EE (1987) Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiology* 85: 801-803.

Buat-Menard PE (1984) Changing metal cycles and human health. In *Nriagu (ed). DablenKonferenzen. Berlin, Springer-Verlag.*

Cañizales-Villanueva RO (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:131-143

Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20: 503-508.

Dudka S, Piotrowska M, Terelak H (1996) Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environmental pollution* 94: 181-188.

Eskew DL, Welch RM, Norvell WA (1984)+ Nickel in higher plants. *Plant Physiology* 76: 691-693.

Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi nickel hyper accumulators*. *Plant Cell* 16: 2176-2191.

Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7220-7224.

He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19:125-140.

Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey P, Dancis A, Ecker Jr (1999) Responsive to antagonist1, a Menkes/Wilson

- disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97: 383-393.
- Ivanov VB, Bystrova EI, Seregin IV** (2003) Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity. *Russian Journal of Plant Physiology* 50: 398-406.
- Krämer U, Smith RD, Wenzel WW, Raskin I, Salt DE** (1997) The role of metal transport and tolerance in nickel hyper accumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiology* 115: 1641-1650.
- Khosravi M, Taghi MG, Rakhshae R** (2005) Toxic effect of Pb, Cd, Ni, and Zn on *Azolla filiculoides* in the Internarional Anzali Wetland. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2: 35-40.
- Moffat AS** (1999) Engineering plants to cope with metals. *Science* 285: 369-370.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ortiz-Castro R** (2005) Modificaciones en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *por efecto del cromosoma*. Tesis Profesional de Biólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Passow HA, Rothstein, Clarkson TW** (1961) The general pharmacology of heavy metals. *Pharmacol. Rev.* 13:185-224.
- Persans MW, Nieman K, Salt DE** (2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyper accumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9995-10000.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV** (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Rodriguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleeker A** (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* 283:996- 998.
- Rout GR, Das P** (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. *Zinc Agronomie* 23: 3-11.
- Salisbury F, Ross C** (1991) Plant Physiology. Third edition. *John Wiley and Sons. New York NY.* 656 pp.
- Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Penarrubia L** (2003) Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 51: 577-587.53
- Sántiz-Gómez M** (2006) Efecto del cobre en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis Profesional. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Takatsuji H** (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell Mol Life Sci* 54: 582-596.
- Vargas PL** (2007) Determinación de la toxicidad causada por zinc, níquel y plomo mediante el análisis del crecimiento y actividad mitótica de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. Tesis Profesional de Bióloga. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México
- Wang W** (1987) Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry ETOCDK* 6: 409-414.