



UNIVERSIDAD DE MATANZAS “CAMILO CIENFUEGOS”

FACULTAD DE AGRONOMÍA

MAESTRÍA EN CIENCIA AGRÍCOLA



Tesis de Maestría

“Comportamiento de las plantas de henequén (*Agave fourcroydes* L.) cultivadas en altas concentraciones de metales pesados”

Autora: Ing. Cuc Doan Thi Thu

Tutor: Dr C. Gerardo González Oramas

Matanzas Julio, 2010

“El único camino abierto a la prosperidad constante y
fácil, es el de conocer, el de investigar
infatigablemente la naturaleza”

JOSÉ MARTÍ

NOTA DE ACEPTACION

Presidente del Tribunal

Tribunal

Tribunal

Tribunal

Evaluación

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro que yo, Đoàn Thị Thu Cúc soy la única autora de esta Tesis de Maestría por lo que autorizo a la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” a hacer uso del mismo, con la finalidad que estime conveniente.

Firma: _____

*¡Con mucho amor para mis padres, mi
hermano y mi novio!*

OPINIÓN DEL TUTOR

La estudiante **Đoàn Thị Thu Cúc** ha concluido exitosamente su trabajo de maestría titulado **“Comportamiento de las plantas de henequén (*Agave fourcroydes L.*) cultivadas en altas concentraciones de metales pesados”**.

Durante toda su etapa de maestrante, su trabajo se vinculó al CEBIO de la Facultad de Agronomía, donde mostró elevada seriedad y gran responsabilidad ante las disímiles tareas. En numerosas situaciones mostró iniciativa, autonomía y firmeza en el montaje y evaluación de los ensayos experimentales. La búsqueda de bibliografía actualizada, en la temática sobre la contaminación por metales pesados y la profundización en el estudio de elementos de biotecnología, fisiología, genética y estadística permitieron discutir y presentar los resultados obtenidos en la forma requerida.

La disciplina y habilidad demostrada en la evaluación de los experimentos, la profundización en el dominio de los Softwares profesionales como WORD, EXCEL, STATGRAPHI, y de los conocimientos teóricos requeridos para el análisis del problema planteado y la búsqueda de soluciones, permite considerar que la estudiante Cúc reúne los requisitos para que sea gratificada con el máximo de puntuación y así completar exitosamente los requerimientos para obtener el título de Máster en Ciencias Agrícolas.

Firma: _____

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A mis padres y mi hermano, quienes son mi razón de ser.*
- ❖ *A mis queridos familiares que siempre confían en mí.*
- ❖ *A mi querido novio **Hien Do Tat** quien siempre está a mi lado preocupándose por mí y mis estudios.*
- ❖ *A mi tutor **Dr. Gerardo González Oramas** y su esposa quienes me han enseñado y apoyado no solamente en el estudio y la investigación, sino también en los momentos difíciles de la vida.*
- ❖ *A todos los profesores de la facultad de Agronomía, especialmente a la profesora **Lenia Robledo Ortedga**, a la profesora **Sonia Jardines González**, al profesor **Rolando Hernández Prieto**, y al profesor **Jorge Luis Álvarez Marqués** por su enseñanza y ayuda incansable no solamente en el estudio profesional, sino en la Vida.*
- ❖ *A todas las personas que de una u otra forma me habían ayudado para poder terminar con calidad esta tesis.*

RESUMEN

Se realizó una investigación en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” para evaluar el posible efecto tóxico de altas concentraciones de metales pesados en plantas de henequén (*Agave fourcroydes* L.) cultivadas en condiciones *in vitro*. Los metales pesados utilizados fueron Cobre y Zinc con concentraciones de: 50, 100, 200 y 400 μM . Después de 30 días de cultivadas las plantas en las concentraciones antes mencionadas se evaluaron diferentes parámetros bioquímicos y fisiológicos tales como: la producción de biomasa, la conductividad, el contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores, proteínas solubles totales y la actividad específica de las enzimas antioxidantes catalasa y peroxidasa. Morfológicamente no se observó ningún cambio o síntomas de toxicidad. La biomasa se incrementó en todos los tratamientos, sin embargo este aumento fue inferior en las plantas crecidas en las altas concentraciones de metales pesados. En los análisis bioquímicos se indica que tanto el contenido de azúcares reductores, carbohidratos totales como proteínas solubles se incrementaron con el aumento de las concentraciones de los metales pesados. La conductividad se elevó con relación al testigo y fue incrementada por la presencia de metales pesados en el medio de cultivo. El mayor valor se alcanzó en el tratamiento con 400 μM de Zn^{2+} . Se evidencia que existen diferencias en cuanto al comportamiento de las enzimas catalasa y peroxidasa, pues el contenido de catalasa disminuyó significativamente en los tratamientos con 50, 100, 200 μM de cobre y 50 y 100 μM de zinc, luego se incrementó a nivel de tratamiento control y lo superó en la concentración de 400 μM del último metal, mientras el contenido de peroxidasa solamente decreció en las concentraciones de 50 y 100 μM de cobre, elevándose luego hasta superar el nivel de control en el resto de los tratamientos. Se recomienda evaluar concentraciones superiores a las empleadas en este ensayo así como otros indicadores.

ÍNDICE

Contenido	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
PROBLEMA.....	2
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Definición de metales pesados.....	4
2. Contaminación por metales pesados.....	4
3. Estrés por metales pesados. Consecuencias.....	8
3.1. <i>Estrés por exceso de cobre en las plantas.</i>	11
3.2. <i>Estrés por exceso de zinc en las plantas.</i>	14
4. Mecanismo de tolerancia a metales pesados de las plantas.....	16
4.1. <i>Micorrizas</i>	18
4.2. <i>Pared celular y exudados de la raíz.</i>	19
4.3. <i>Membrana plasmática.</i>	19
4.4. <i>Quelación.</i>	20
4.4.1 <i>Fitoquelatinas (PCs)</i>	20
4.4.2 <i>Metalotioneinas (MTs).</i>	20
4.5. <i>Compartimentalización vacuolar.</i>	21

5. Fitorremediación.	21
5.1. Rizofiltración.	24
5.2 Fitoestabilización.	25
5.3 Fitoextracción.	26
5.4 Fitovolatilización.	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Preparación del material vegetal y condición de crecimiento.	28
1. Evaluación del contenido de Biomasa.	29
2. Medición de la conductividad eléctrica.	30
3. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.	30
3.1. Determinación de la actividad enzimática de catalasa.	30
3.2. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa.	31
4. Contenido de proteínas solubles.	31
5. Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores.	32
6. Análisis estadístico.	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
1. Evaluación del contenido de Biomasa.	33
2. Medición de la conductividad eléctrica.	37
3. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.	41

4. Contenido de proteínas solubles	47
5. Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores	51
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la sociedad humana, una gran cantidad de desechos y contaminantes se incorporan al medio ambiente, entre ellos los metales pesados. Procedentes de diferentes fuentes tales como: la actividad industrial, agrícola o minera, los metales pesados con su anomalía geoquímica se han convertido en una gran amenaza no sólo para el ecosistema sino también para la salud humana por la alta toxicidad y gran resistencia en el suelo, ya que estos pueden incorporarse al hombre a través de la cadena alimenticia o en las aguas (Barceló y Poschenrieder, 2003).

Para limpiar los suelos contaminados con dichos metales se han desarrollado diferentes métodos, tanto físicos, químicos como biológicos. Estos métodos tienen la ventaja de ser rápidos, pero son costosos y no resuelven el problema, solamente lo transfieren a las generaciones futuras (Peuke y Rennenberg, 2005). Por lo tanto, se requiere con urgencia encontrar un método alternativo, barato y eficiente para eliminar o minimizar los contaminantes en suelo.

Con el avance de la ciencia se alcanza un mayor conocimiento sobre los mecanismos y funcionamientos de los organismos vivos, es por eso que en los últimos años se ha desarrollado un método relativamente nuevo, en el que se utilizan plantas capaces de vivir en los suelos contaminados: la fitorremediación. Este método llama mucho la atención por ser muy prometedor, pues permite limpiar grandes extensiones de suelos contaminados, es más barato en comparación con los métodos convencionales y sobre todo compatible con el ecosistema.

El henequén es un cultivo capaz de vivir en suelos pobres y salinos, es una planta micorrizada y además es productora de ácidos orgánicos (Abreu *et al.*, 2007) - características que la hacen promisoría para ser utilizada como fitorremediadora de suelos contaminados con metales pesados.

Los estudios sobre el comportamiento del henequén en condiciones de estrés son escasos, y por eso requieren más atención e investigación para afirmar su posible capacidad como fitorremediadora.

PROBLEMA

El incremento de suelos improductivos, debido a su elevado contenido de metales pesados, consecuencia de una creciente contaminación antropogénica, que impide la recuperación efectiva de estos y que al mismo tiempo incrementan los efectos dañinos a las plantas, a los animales y últimamente a la salud humana ha provocado muchas dificultades en el aprovechamiento de estas áreas en la producción alimentaria.

HIPÓTESIS

Bajo condiciones óptimas de crecimiento no será posible detectar los efectos tóxicos que para el metabolismo de las plantas de henequén que pudieran causar los metales pesados, ello solo sería evidente si sobre plántulas cultivadas *in vitro* actuaran estos metales a concentraciones elevadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia, bajo condiciones *in vitro*, de los metales pesados sobre algunos componentes del metabolismo en henequén (crecimiento, metabolismo del carbono, actividad de enzimas antioxidantes y conductividad eléctrica) cultivado en medios de cultivo con elevadas concentraciones Cobre y Zinc.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar el contenido de la biomasa producida en plantas de henequén sembradas bajo condiciones de elevadas concentraciones de Cobre y Zinc posterior a los 30 días de cultivo.
- ✓ Examinar el metabolismo del carbono a través de la medición del contenido de carbohidratos solubles totales y de azúcares reductores en plantas de henequén sembradas bajo condiciones de elevadas concentraciones de Cobre y Zinc posterior a los 30 días de cultivo.
- ✓ Medir la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasa) y determinar el contenido de proteínas solubles en plantas de henequén sembradas bajo condiciones de elevadas concentraciones de Cobre y Zinc posterior a los 30 días de cultivo.
- ✓ Evaluar el grado de integridad de la membrana plasmática a través de la medición de la conductividad eléctrica en tejido foliar, en plantas de henequén sembradas bajo condiciones de elevadas concentraciones de Cobre y Zinc posterior a los 30 días de cultivo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Definición de metales pesados

Según los autores Gálvez (2003) y Aviñó *et al.* (2007) se definen como metales pesados (MP) aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor de 0,01%.

Aviñó *et al.* (2007) señalaron que junto a estos elementos, hay otros que, aunque son metales ligeros o no metales, se incluyen con ellos por orígenes y comportamientos asociados, en este caso se encuentran los elementos As, B, Ba, Se.

Los metales pesados se clasifican en:

- ✓ Oligoelementos o micronutrientes: los elementos que son necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen: As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- ✓ Los elementos sin función biológica conocida: estos son altamente tóxicos e incluyen: Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

Garbisu y Alkorta (2001), García y Dorronsoro (2001) consideraron que el contenido de los metales pesados en el suelo debería ser únicamente función de la composición de material original y de procesos edafogénicos que dan lugar al suelo; pero la actividad humana ha provocado el incremento del contenido de estos metales en cantidades considerables.

2. Contaminación por metales pesados

La tierra y el agua son los recursos naturales más valiosos sobre los cuales se basa la sustentabilidad de la agricultura y la civilización del hombre. Desafortunadamente estos han sido sujeto de la explotación máxima y se han degradado severamente por las contaminaciones debido a la actividad antropogénica. La contaminación incluye las fuentes tales como la emisión, los efluentes y los desechos sólidos de las industrias, exceso de vehículos y metales de la minería y fundición. Pueden

incluir además las sales solubles, el uso de pesticidas, y el uso excesivo de fertilizantes (McGrath *et al.*, 2001). Cada una de estas fuentes de contaminación poseen sus propios efectos dañinos a las plantas, a los animales y últimamente a la salud humana pero las que agregan los metales pesados a suelos y aguas son de preocupación seria debido a su persistencia en el medio ambiente y carcinogeneidad a la existencia humana (Lone *et al.*, 2008). Los metales pesados no pueden ser destruidos biológicamente, solo son transformados desde un estado oxidado o complejo orgánico a otro (Garbisu and Alkorta, 2001; Gisbert *et al.*, 2003). Por tanto la contaminación por metales pesados es una gran amenaza potencial al medio ambiente y a la salud del hombre.

Según Nriagu (1996), aproximadamente el 90% de las emisiones antropogénicas de metales pesados se produjeron desde 1900. La contaminación de los suelos y las agua por los metales pesados se conoce como un problema en todo el mundo (Jadia y Fulekar, 2009). Todos los países han sido afectados, sin embargo el área y el nivel de contaminación varían enormemente de uno a otro (Lone *et al.*, 2008). Los países como Brasil, China, India, y Perú contribuyen en gran proporción con los elementos minerales. Por ejemplo la producción mundial de hierro es de 1 020 000 t, de ello el 21% se produce en China, 19% en Brasil y 7% en la India (USA National Mining Association, 2002 tomado por Jadia y Fulekar, 2009). Según este reporte el mayor productor de cobre es Chile con el 30% de la producción mundial, mientras que México es el mayor productor de plata con el 16%. Jadia y Fulekar (2009) señalaron que mientras los países desarrollados poseen las megas minas modernas, las minas de pequeña escala o superficial todavía existen en muchos otros. Esto trae como consecuencia una mayor contaminación de metales pesados en estos países. Un reporte de "US environmental action group" indicó que los lugares más contaminados amenazan la salud de más de 10 millones de personas en diferentes países (ENS, 2006). Sólo en Europa se estima que 52 millones de hectáreas de suelo – más del 16% del área total – son afectadas por alguna forma de degradación del suelo (Peuke y Rennenberg, 2005). En el oeste de Europa, 1 400 000 sitios fueron afectados por metales pesados (McGrath *et al.*, 2001); de ellos más de 300 000 fueron contaminados (Gade, 2000). En Rusia, la ciudad industrial Norilsk

presenta la mayor actividad a nivel mundial de fundición de metales, donde la emisión de cadmio, cobre, plomo, níquel, arsénico, selenio y zinc es realizada anualmente. En otras ciudades de este país tales como Dalnegorsk y Rudnaya Pristan, los residentes sufren de envenenamiento serio por plomo debido a una fundición vieja y a la transportación no protegida de este elemento desde la fundición local (ENS, 2006).

En Asia los dos países potenciales más grandes son China e India, los cuales no escapan de la contaminación por metales pesados, en especial China, donde una sexta parte de la tierra arable total ha sido contaminada por metales pesados y más de 40% ha sido degradado a diferentes niveles debido a la erosión y la desertificación (Liu, 2006). En este país, la minería ha generado alrededor de 3,2 millones de ha de tierra degradada al final de 2000, y se está incrementando a un ritmo de 46 700 ha por año (Li, 2006). La contaminación relacionada con las operaciones de la minería ha causado una pérdida económica de alrededor de 1 300 millones de USD de forma directa, y de 4 400 millones de USD indirectamente cada año. La ciudad china de Linfen ubicada en el corazón de la región de carbón mineral es un ejemplo de contaminación severa (ENS, 2006). En la ciudad India de Ranipet 3,5 millones de personas están afectadas por residuales de tenería. La contaminación de los suelos y las aguas también es severa en India, Pakistán y Bangladesh, donde la industria pequeña está dejando sus efluentes no tratados en el drenaje superficial, los cuales se vierten cerca de los campos agrícolas (Lone *et al.*, 2008).

En Estados Unidos hay 600 000 campos que están contaminados por metales pesados (McKeehan, 2000). Según la estadística gubernamental, las minas de carbón han contaminado más de 19 000 km de arroyos y ríos; más de 100 000 ha de tierras cultivables, 55 000 ha de tierra de pastoreo y 50 000 ha de bosques (Ragnarsdottir y Hawkins, 2005).

La situación en América no es diferente. Según el reporte de Blacksmith Institute (tomado por AIPEUC- PS, 2006), La Oroya localizada a 174 kilómetros al este de Lima, Perú es el pueblo más contaminado en América y uno de los diez con mayor contaminación de todo el mundo por la minería. Este reporte revela que el 99,9% de

los niños de menos de 6 años tienen altos niveles de plomo en la sangre, lo que puede causar cáncer o parálisis. Además las personas que viven en La Oroya no solamente están contaminadas con plomo, sino también con cadmio, arsénico, bióxido de sulfuro entre otros.

Una investigación realizada por la Asociación Interamericana de Defensa del Medio Ambiente (2003) (citado por AIPEUC-PS, 2006) reporta que la calidad del medio ambiente de la ciudad de La Oroya se ha deteriorado seriamente. Entre 1995 y 1998 las concentraciones en el aire de plomo se incrementaron en un 1163%, arsénico 606% y cadmio 1990%. El otro lugar más contaminado en América es la zona conocida como Bajos de Haina en República Dominicana. Esta zona densamente poblada sufre altos niveles de contaminación con plomo procedente de una planta de reciclado de baterías de automóviles ya clausurada, donde los residentes padecen de envenenamiento por plomo (Blacksmith Institute tomado por AIPEUC- PS, 2006). En Brasil la contaminación por metales pesados como el mercurio es una nueva amenaza para la población de la Amazonía. Desde 1980 han sido descargadas más de 2 000 toneladas por la industria minera artesanal, una práctica conocida como 'garimpo' (ENS, 2006).

En caso de Cuba un reporte de Centro de Ingeniería y manejo Ambiental de Bahías y Costas (2000) informa la situación de la contaminación en las costas y Bahías de Cuba en la **tabla 1**.

Santiago de Cuba y especialmente La Habana, constituyen las áreas más contaminadas de Cuba. Sin embargo, para los metales Co, Fe, Mn y Ni, la situación es totalmente diferente, siendo las bahías de Cabonico, Nipe y Levisa, las de mayor contaminación, esta situación es provocada por las actividades minero metalúrgicas del níquel.

Por tanto, el grado de contaminación general es:

La Habana > Santiago de Cuba > Cienfuegos > Matanzas > Levisa > Nipe > Cárdenas > Cabonico.

Tabla 1: Concentraciones de metales pesados (mg.g-1; Fe en %) en sedimentos de áreas cubanas (Chabalina y Gonzalez, 2000)

Area	Cu	Pb	Zn	Co	Fe	Mn	Ni
La Habana	65 - 260	65 - 334	80 - 497	<3,0-14	1,41 - 4,09	137 - 465	24 – 228
Matanzas	15 - 60	20 - 56	20 - 152	8,0 - 28	0,53 – 4,10	54 - 325	42 – 229
Zona Varadero-Cárdenas	1,6 - 67	<2,5 -30	4,5 -125	<2,5-9,0	0,38 – 2,69	61 - 496	5,0 – 97
Nipe	9,6 - 40	2,5 - 28	28 - 96	12 - 154	1,68 -17,58	237 -1689	120 -2178
Levisa	1,0 - 91	4,6 - 46	2,0 -174	7,7- 881	0,04 -34,34	125 -3719	30 -11215
Cabonico	13 - 66	6,0 - 35	22 - 68	11 - 79	2,65 -14,45	307- 1208	346 -1090
Stgo. de Cuba	35 - 194	7,7 -213	102-603	6,4 – 8,6	1,60 – 4,39	158 - 472	6,0 – 15
Cienfuegos	32 - 144	6,8 -103	57 - 195	6,4 - 16	1,75 – 5,60	300 - 997	22 – 46

Este trabajo se inicia por la necesidad existente en la provincia de Matanzas de recuperar áreas utilizadas como vertederos de desechos sólidos, las cuales presentan alto contenido de metales pesados, los que potencialmente pueden pasar al manto freático y el problema sería más grave.

3. Estrés por metales pesados. Consecuencias

Se habla de contaminación por los metales pesados cuando el contenido de los mismos excede considerablemente los valores habituales en el tipo de suelo que se está considerando. Estas anomalías geoquímicas pueden alcanzar valores que suponen un grave peligro para las plantas y animales que habitan en el suelo así como para los consumidores primarios (herbívoros) y los carnívoros que pueden incorporar niveles tóxicos de metales a partir del consumo de herbívoros contaminados.

Los metales pesados representan el mayor componente de la contaminación inorgánica (Ghosh y Singh, 2005). Ellos presentan un problema mayor que los contaminantes orgánicos ya que los microorganismos pueden degradar los últimos, mientras los metales pesados no son degradados en los suelos y muchos son considerados como toxinas bioacumulativas persistentes (Aviñó *et al.*, 2007). Según Lone *et al.* (2008), los metales que se identifican como contaminantes del medio ambiente incluyen: As, Cu, Cd, Pb, Cr, Ni, Hg y Zn. La alta concentración de metales pesados en el suelo pueden afectar negativamente el crecimiento de los cultivos al modificar la función metabólica de los mismos, alterando procesos como la fotosíntesis y la respiración que conducen a la apoptosis celular y en mayor grado la muerte de las plantas (Schmidt, 2003). La contaminación de los suelos por metales pesados también puede provocar cambios en la composición de población de microorganismos afectando desfavorablemente al suelo (Kurek y Bollag, 2004). Por otra parte, Jadia y Fulekar (2009) mencionaron que excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y del medio ambiente, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia hasta llegar al hombre, afectando la nutrición y provocando enfermedades agudas o crónicas.

Aviñó *et al.* (2007) señalaron que los metales pesados son considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad debido a su elevada tendencia a bioacumularse. Esta toxicidad está causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado de mantener los niveles necesarios de excreción. El proceso se agrava durante el paso por las distintas cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación experimentan un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes.

Según Hall (2002), la causa del elevado nivel de toxicidad de los metales pesados está dada porque estos poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. En este sentido, se destaca la gran afinidad de los metales pesados como principales “ligandos” por grupos sulfhídrico, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones metales pesados – ligando

puede ser muy perjudicial para la célula ya que inhiben las actividades de las proteínas y enzimas o provocan la disrupción en la estructura de los mismos. Por otra parte, según Van Assche y Clijsters (1990), el exceso de los metales pesados en la célula provoca el desplazamiento de elementos esenciales en su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia. Además, los metales pesados pueden estimular la formación de los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno que inducen el estrés oxidativo (Dietz *et al.*, 1999; Aviñó *et al.*, 2007). Este fenómeno, según Aviñó *et al.* (2007), provoca daños a distintos niveles, donde se destacan:

- ✓ Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfhidrilo, dando lugar a puentes disulfuro que causan la desnaturalización y en consecuencia la pérdida de sus funciones biológicas.
- ✓ Peroxidación lipídica de membranas, que provoca rupturas y generan subproductos en las cadenas hidrocarbonadas.
- ✓ Daños sobre ADN. Estos pueden ser desperfectos genotóxicos: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteración en la síntesis y reparación de los ácidos nucleicos y transformaciones celulares.

Algunos metales pueden ocasionar una reducción de la elasticidad y de la extensibilidad de las paredes celulares (Gunsé *et al.*, 1997). Vargas (2006) planteó que estas alteraciones fisicoquímicas de las paredes celulares pueden deberse a trastornos enzimáticos en la biosíntesis de los constituyentes macromoleculares de la pared, cambios en la distribución de cargas y en el ensamblaje de los polímeros, cambios en la distribución de los microtúbulos y del sistema endomembranoso (aparato de Golgi) y/o cambios en la adhesión entre pared y membrana citoplasmática.

Los metales pesados, según lo planteado por Dietz *et al.* (1999) y Vargas (2006), tienen efectos negativos en la fotosíntesis. Los metales pesados inhiben el flujo de electrones de la cadena de transporte o del Ciclo de Calvin, por tanto cuando la intensidad de la luz es alta, el aparato fotosintético absorbe más energía lumínica que la que suele utilizar en las reacciones normales. Como consecuencia, el

aparato fotosintético transfiere la energía a los únicos aceptores disponibles en los cloroplastos: los radicales de oxígeno, donde sucede la reacción de Mehler, cuyo producto es el radical anión superóxido, que forma peróxido de hidrógeno.

El exceso de peróxido de hidrógeno fomenta la formación de radicales hidroxilo (OH^\cdot) - fuerte oxidante de ácidos orgánicos que pueden iniciar la formación en cadena de otros nuevos radicales altamente tóxicos para la planta. Además, la inhibición de la cadena de transporte electrónico fotosintético también puede favorecer la transferencia de energía, desde la clorofila excitada por la luz hacia el oxígeno, formándose oxígeno en estado de singlete (O^\cdot), el cual, debido a su elevada reactividad es altamente tóxico para las células.

También se ha observado la inhibición de la asimilación de CO_2 tanto por aumento en la resistencia estomática como de la resistencia mesofílica provocados por los metales pesados. Plantas expuestas a Cd, Al, Cu y Cr mostraron cierre estomático por déficit hídrico inducido por los metales, a causa de sus efectos tóxicos iniciales en las raíces y su interferencia con la absorción y traslocación de agua (Vargas, 2006).

El metabolismo del carbono se evaluará en este trabajo a través de la medición del contenido de carbohidratos solubles totales y de azúcares reductores, ya que la síntesis, la degradación o traslocación de estos compuestos pueden variar en las plantas expuestas a metales pesados.

3.1. Estrés por exceso de cobre en las plantas

El cobre es un metal de transición, involucrado en muchos procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta pues puede existir en múltiples estados de oxidación *in vivo* (Wang *et al.*, 2004). Bajo condiciones fisiológicas, el cobre existe como Cu^+ y Cu^{2+} (Yruela, 2005). Según Raven *et al.* (1999) el cobre actúa como un elemento estructural en las proteínas reguladoras; participa en el transporte de electrones en la fotosíntesis y la respiración mitocondrial, en el metabolismo de la pared celular, en la señalización hormonal, y en respuesta al estrés oxidativo, mientras que el ión Cu actúa como cofactor en muchas enzimas tales como Cu/Zn superóxido dimutasa (SOD), citocromo oxidasa, amino oxidasa.

A nivel celular, el cobre posee una función esencial en la señal de transcripción y el mecanismo de tráfico de proteína (Yruela, 2005). Por tanto, las plantas requieren este elemento como un micronutriente esencial para lograr un crecimiento y desarrollo normal. Sin embargo, bajo concentraciones superiores a la requerida produce una inhibición del crecimiento e interferencia en los procesos celulares importantes.

Las plantas crecidas en condiciones de alto contenido de cobre muestran una reducción de la biomasa. Los autores Bouazizi *et al.* (2007) encontraron en el cultivo de *Zea mays* L. una disminución significativa en el crecimiento tanto de la raíz como del tallo en 50-100 μmol de CuSO_4 . Según ellos, altas concentraciones de cobre inhiben la elongación de raíces y tallos, además provoca una reducción de la masa seca y de un 40% a 75% de la masa fresca. En plantas de *Hordeum vulgare* L. después de cinco días sometidas a tratamiento con 20 mg/kg de CuSO_4 se observó clorosis y necrosis en las hojas, la masa seca disminuyó un 69% y el área de las hojas en un 56% (Vassilev, Lindon, Ramalho, Do Céu Matos, Da Graca, 2003). En el trabajo realizado con *Elsholtzia haichowensis* los autores Qian *et al.* (2005) encontraron que en 100 y 200 μmol de CuSO_4 , la masa seca de la raíz decreció significativamente, pero esta concentración no tuvo efecto significativo en la masa seca de los tallos.

El exceso de cobre provoca una reducción en el contenido de clorofila, alteraciones de la estructura de los cloroplastos y composición de la membrana tilacoidal. El cultivo de *Eichhornia crassipes* después de someterse en condiciones estresantes de 1,0 mg/l de Cu^{2+} o niveles más altos mostró que la concentración relativa de pigmentos disminuyó rápidamente hasta menos del 40% con relación a plantas control en un corto período de tiempo (tres días después de estresar) (Hu *et al.*, 2007). En *Hordeum vulgare* L. se observó que la concentración de 20 mg/kg de Cu^{2+} provocó la disminución del contenido de clorofilas a y b en un 53% y 41% respectivamente en comparación con el control, y en el mismo tratamiento, el exceso de cobre induce una disminución de un 35% de carotenoides (Vassilev *et al.*, 2003). Experimentos realizados por Peng *et al.* (2005) en plantas de *Elsholtzia splendens* sometidas a concentración de 250 μmol Cu^{2+} mostraron cloroplastos no

esféricos, las filas de tilacoides son más pequeñas y dañadas fuertemente; las mitocondrias también se dañan y el citoplasma adquiere forma en zigzag. En 500 μmol la membrana de cloroplastos, de mitocondrias y la membrana citoplasmática se deterioran, las filas de tilacoides se desmontan y las clorofilas son afectadas negativamente.

El cobre induce la peroxidación lipídica, disminuyendo el contenido de lípidos y ácidos grasos. Los autores Hu *et al.* (2007) midieron indirectamente el daño de membrana en el cultivo de *Eichhornia crassipes* a través del nivel de Malondialdehído (MDA) - un producto de peroxidación lipídica - y encontraron que el contenido de MDA se incrementó con el aumento de cobre en concentración de 1 mg/l, lo que sugiere que el exceso de cobre afecta la integridad de la membrana. En un trabajo con *Brassica juncea* L. Wang *et al.* (2004) encontraron un incremento de la peroxidación lipídica al aumentar la cantidad de cobre aplicado, especialmente a la concentración de 16 μmol . En el trabajo con *Hordeum vulgare* L. los autores Vassilev, Lidon, Scotti Campos, Ramalho, Barreiro, Yordanov (2003) mostraron que en el tratamiento de 20 mg/kg de cobre se provoca la peroxidación lipídica de los cloroplastos y una disminución del 57% del contenido de ácido graso total de la membrana de los mismos.

El cobre cataliza la formación de radicales libres altamente tóxicos (Yruela, 2005). De acuerdo con este planteamiento, Bouazizi *et al.* (2007) encontraron en *Zea mays* L. un incremento significativo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (50% en tallos y 60% en raíz) en 100 μmol de CuSO_4 . En el cultivo de *Brassica juncea* L., Wang *et al.* (2004) apreciaron un incremento marcado del nivel de H_2O_2 cuando se aplicó 8 μmol de CuSO_4 en el medio de cultivo.

El aumento de H_2O_2 provoca el incremento de los radicales libres del oxígeno (reacción de Haber-Weiss, tomado por Arora *et al.*, 2002) y por tanto causa el estrés oxidativo en la planta. Este proceso provoca el incremento de la respuesta antioxidante (Yruela, 2005). En *Zea mays* L. se observó que el exceso de cobre induce cambios en la actividad de la enzima peroxidasa: con 100 μmol de CuSO_4 la estimulación de guayacol, alcohol coniferyl y ascórbico peroxidasa fue de 46, 49 y

77% respectivamente (Bouazizi *et al.*, 2007). Wang *et al.* (2004) también observaron una serie de cambios en un grupo de enzimas antioxidantes tales como: ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa y guayacol peroxidasa, con exceso de cobre aplicado en *Brassica juncea* L.

Por último, el cobre afecta el transporte de electrones en la fotosíntesis y se considera que el fotosistema II (PSII) es más sensible al exceso de cobre que el fotosistema I (PSI). El efecto más relevante de la toxicidad del cobre en el PSII es la inhibición de la evolución del oxígeno (Yruela, 2005). La interacción entre el exceso de cobre y la fotoinhibición fue investigada. Pätsikkä *et al.* (1998) demostraron que el cobre aumenta el efecto adverso de la luz. La actividad fotosintética disminuye cuando el organismo oxigénico está expuesto a una iluminación prolongada con una alta intensidad luminosa. Este fenómeno, que incluye el daño funcional en el transporte electrónico de PSII y el deterioro estructural en el centro de reacción de PSII, se conoce como la fotoinhibición. El cobre provoca un incremento de susceptibilidad de la fotoinhibición en tilacoides aislados (Pätsikkä *et al.*, 2001).

No se tienen antecedentes del posible efecto del exceso de cobre sobre el metabolismo del henequén, el cual será utilizado, para dilucidar bajo las condiciones del cultivo *in vitro*, las alteraciones que se pudieran manifestar.

La evaluación de la actividad enzimática de catalasa y peroxidasa se tomará en cuenta en este trabajo, para valorar la posible tolerancia del henequén a metales pesados.

3.2. Estrés por exceso de zinc en las plantas

Al igual que el cobre, el zinc es un micronutriente esencial requerido para un desarrollo óptimo de la planta. Según Casierra-Posada y Poveda (2005), el zinc es un componente esencial de varios sistemas de enzimas para la producción de energía, la regulación y síntesis de proteínas y el mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Sin embargo, por ser un metal pesado, el exceso de zinc causa alteración en los procesos vitales de crecimiento tales como la fotosíntesis, la síntesis de clorofila y la integridad membranal.

Los síntomas de la toxicidad en las plantas tratadas con exceso de zinc incluyen la clorosis generalizada en las hojas y el crecimiento reducido de la planta. En *Raphanus sativus* L. Dube *et al.* (2003) encontraron que después de 10 a 12 días las plantas tratadas con exceso de zinc (de 0,1 a 0,2 mM) evidenciaron una clorosis intervenal irregular en las hojas tiernas. Con el tiempo, el crecimiento casi se detuvo y la clorosis se intensificó cubriendo la lámina entera. En el estudio con *Fragaria sp.* cv. Camarosa, los autores Casierra-Posada y Poveda (2005) señalaron que el exceso de zinc (350 mg/kg) induce en las hojas jóvenes una clorosis generalizada. Estas hojas mostraron también la aparición de puntos rojizos a lo largo de las nervaduras. Además, en algunos frutos se encontró que el receptáculo floral no se desarrolló en toda su magnitud, sino por sectores con apariencia anormal. Respecto al crecimiento, estos autores encontraron una reducción de 70% de área foliar en las plantas tratadas con exceso de zinc.

Reducción en el crecimiento, hojas necrosadas, decrecimiento del sistema radical y una disminución en la actividad mitótica fueron encontrados en diferentes plantas tales como en *Helianthus annuus* L. tratadas con 65 mg/l ZnSO₄ (Khurana y Chatterjee, 2001); en *Saccharum spp.* con 130 mg/l Zn²⁺ (Jain *et al.*, 2010) y en *Salix alba* y *Salix viminalis* con 100 µM (Vassilev *et al.*, 2007).

Según Cvetanovska y Spasenoski (2000) la necrosis en las hojas es la expresión morfológica de una alteración en la síntesis de clorofilas y de carotenoides provocada por exceso de zinc. En su trabajo con *Lycopersicon esculentum* Mill., encontraron que la concentración de los pigmentos se disminuyó en más de 50% en las plantas tratadas con más de 500 µM de Zn²⁺ en comparación con el control. En cultivo de *Brassica napus* tratado con 0,07-1,12 mM de Zn²⁺ durante siete días, Wang *et al.* (2009) reportaron una inhibición del crecimiento y una reducción en el contenido de clorofilas a y b. Este mismo comportamiento se reportó en el estudio con los dos clones de *Salix*, los cuales, al someterse a tratamientos con zinc en diferentes concentraciones (50, 100 y 150 µM) se redujo significativamente el contenido de los pigmentos (Vassilev *et al.*, 2007).

Aunque el zinc no posee propiedad redox, el exceso de este elemento puede provocar un aumento del contenido de las especies reactivas del oxígeno y traer como consecuencia la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Mishra y Prakash, 2009). Este planteamiento se evidencia en el trabajo con el cultivo de *Brassica juncea* donde Prasad *et al.* (1999) encontraron un incremento de más de 2,5 veces en el contenido de MDA – el producto final de la peroxidación lipídica de la membrana. Un aumento notable en el contenido de MDA también fue encontrado en las posturas de *Glycine max* L. cv. Merrill tratadas con exceso de zinc en diferentes niveles de pH y el porcentaje del incremento fue máximo en los tejidos tratados con 2000 μM de zinc a pH de 3,0; 6,0 y 8,0 donde el aumento fue de dos a tres veces en comparación con el control (Mishra y Prakash, 2009).

El exceso de zinc, afecta además, negativamente, la nutrición mineral. En el trabajo realizado por Wang *et al.* (2009) donde las posturas de *Brassica napus* fueron tratados con 0,07 – 1,12 mM de Zn^{2+} durante siete días, encontraron que el contenido de zinc aumentó en las plantas bajo exceso de este elemento, mientras la concentración de fósforos, cobre, hierro, magnesio y manganeso se redujo significativamente, especialmente en las raíces. Un comportamiento similar fue observado en el cultivo de *Pisum sativum* L., cv. Citrine, donde en la concentración de 70 μM de Zn^{2+} disminuyó dramáticamente el contenido de Mg en la raíz y hasta un 40% del contenido de Ca (Stoyanova y Doncheva, 2002).

Al igual que con el Cu, no se tienen antecedentes del posible efecto del exceso de zinc sobre el metabolismo del henequén, otro metal que se utilizará, para dilucidar bajo las condiciones del cultivo *in vitro*, las alteraciones que se pudieran manifestar.

4. Mecanismo de tolerancia a metales pesados en las plantas

Según los autores Lázaro *et al.* (2002) las plantas tienen diferentes estrategias para tolerar los metales pesados (**Figura 1**). La mayoría de estas están relacionadas con la restricción de la absorción y/o translocación de los mismos hacia las hojas (estrategia de exclusión). Sin embargo, existen especies que los absorben y acumulan activamente en su biomasa aérea (estrategia acumuladora).

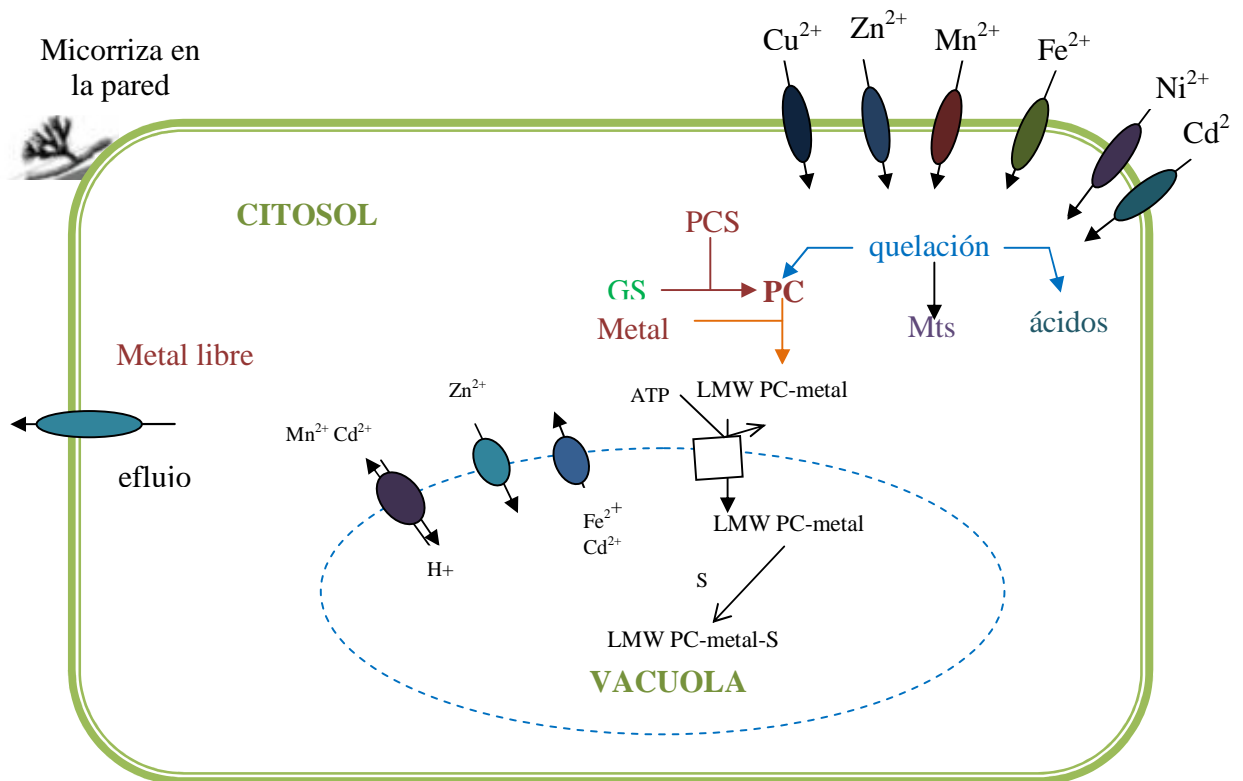


Figura 1: Mecanismos de tolerancia a metales pesados de la célula vegetal

Vargas (2006) planteó que las adaptaciones específicas de las plantas al estrés por los metales pesados se basan en mecanismos de resistencia los cuales reducen la entrada de los mismos a la planta o que una vez absorbidos, permiten su almacenamiento en lugares no perjudiciales para las células. Coincidiendo con este planteamiento, Hall (2002), consideró que a nivel celular el mecanismo de adaptación a los metales pesados consiste en evitar el almacenamiento de concentraciones tóxicas en las zonas sensibles dentro de la célula y de esta forma prevenir los efectos dañinos, siendo esta estrategia más importante que sintetizar las proteínas que puedan resistir los efectos de los metales pesados.

Las estrategias para evitar la acumulación de los metales pesados son diversas. Extracelularmente, se incluye el papel de las micorrizas, de la pared celular y los exudados extracelulares (Hall, 2002; Vargas, 2006; Aviñó *et al.*, 2007). La membrana plasmática también desempeñar un papel importante en la tolerancia a los metales

pesados, reduciendo la absorción de los mismos o estimulando el bombeo del eflujo de los metales pesados que habían entrado al citosol (Hall, 2002).

Según Hall (2002) y Vargas (2006) dentro de protoplastos existen diferentes mecanismos potenciales para reducir los daños por metales pesados tales como: la reparación de proteínas dañadas por estrés involucrando proteínas de choque térmico; la quelación de los metales pesados por ácidos orgánicos, aminoácidos o péptidos, o la compartimentalización lejos de sitios donde ocurren los procesos metabólicos, por el transporte hacia dentro de la vacuola y el incremento de las actividades enzimáticas tolerantes. A continuación se presentan detalladamente cada uno de estos mecanismos.

4.1. Micorrizas

Las micorrizas son ciertos hongos del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con la raíz de las plantas. Estas y particularmente las ectomicorrizas pueden ser efectivas en el mejoramiento de los efectos de los metales pesados en plantas hospedantes (Jentschke y Godbold, 2000), debido a la capacidad de inmovilizar los metales pesados en la raíz, impidiendo que estos pasen a la parte aérea de la planta (Hall, 2002).

Una primera barrera a la entrada de metales pesados lo constituye la pared celular del hongo, que tiene gran capacidad de adsorber cationes sobre su superficie, puesto que ésta se encuentra cargada negativamente (Aviñó *et al.*, 2007). Además, con la relación a la función de las ectomicorrizas en la tolerancia a los metales pesados de las plantas hospedantes, estas restringen el movimiento de metales hacia la raíz de la planta hospedante por diferentes mecanismos que varían según la especie de hongo, planta y metal (Hall, 2002; Aviñó *et al.*, 2007).

Se conoce que el henequén es una planta asociada a micorrizas lo que pudiera favorecer la tolerancia a metales pesados. El empleo del cultivo *in vitro* impide en este ensayo evaluar los efectos de esta asociación ante la presencia de concentraciones elevadas de metales pesados en los medios de cultivos.

4.2. Pared celular y exudados de la raíz

Vargas (2006) consideró que la absorción de metales pesados puede disminuir por la propiedad de ligamiento a los ácidos orgánicos localizados en la pared celular. Aunque la pared está directamente en contacto con metales pesados en la solución del suelo, la adsorción hacia la pared celular debe ser de capacidad limitada, por esto hay un efecto limitado de actividad de metales pesados en la superficie de la membrana plasmática (Hall, 2002). Este autor también planteó que los exudados de raíz tienen una variada función incluyendo la de unirse a metales, por ello se reduce la absorción de ciertos metales. Además, según Vargas (2006) los metales pesados tienen afinidad por los fenoles y ciertos aminoácidos tales como los sideróforos de origen microbiano y los fitosideróforos exudados por las plantas, impidiendo la entrada de estos iones tóxicos al ápice radicular.

4.3. Membrana plasmática

La función de la membrana plasmática se ve rápidamente afectada por los metales pesados. Sin embargo, los autores Hall (2002), Vargas (2006) y Aviñó *et al.* (2007) plantearon que ésta puede estar involucrada en la tolerancia a los metales pesados a través de la reducción de la captación de los mismos, o la estimulación de las bombas de eflujo de metales que promueven la entrada al citosol. Según Meharg, (1993) la protección de la integridad de la membrana contra el daño provocado por metales pesados puede producir disminución de la fuga de los solutos celulares. Otro factor que puede estar involucrado en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática en presencia de los metales pesados puede ser el incremento de la reparación de la membrana después del daño provocado (Salt *et al.*, 1998). Esta reparación se basa en el choque térmico proteico o metalotioneinas (Hall, 2002).

La evaluación indirecta del grado de integridad de la membrana plasmática, se realizará en este ensayo a través de la medición de la conductividad eléctrica en vitroplantas de henequén mantenidas en medios de cultivo con altas concentraciones de zinc y cobre.

4.4. Quelación

Según Hall (2002) la quelación de los metales en el citosol por los quelantes altamente afinados es un mecanismo potencialmente importante de la desintoxicación y tolerancia a los metales pesados. La planta utiliza el mecanismo de complejación uniendo los ligandos a los metales pesados para formar complejos (Aviñó *et al.*, 2007), de esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que le mantiene en equilibrio electrónico, pero no lo deja fuera del metabolismo, no se elimina del citoplasma y por ello, sigue siendo potencialmente tóxico. Los ligandos potenciales incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioninas (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Entre los aminoácidos y ácidos orgánicos se encuentran los ácidos cítricos, málicos, la histidina y la cisteína (Aviñó *et al.*, 2007).

4.4.1. Fitoquelatinas (PCs)

Son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados (Hall, 2002). La estructura general de las PCs es $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ (donde $n=2-11$, Glu: glutámico, Cys: cisteína, Gly: Glicina) y son inducidos rápidamente en las plantas tratadas con metales pesados, especialmente con Cd (Aviñó *et al.*, 2007).

Es importante señalar, que a pesar del evidente papel de las PCs en la desintoxicación, este péptido tiene otras funciones importantes en la célula, incluyendo la homeostasis de metales esenciales, el metabolismo de sulfato, o como antioxidante (Dietz *et al.*, 1999; Cobbett, 2000). Su participación en la desintoxicación de metales pesados puede ser la consecuencia de estas funciones (Steffens, 1990 tomado por Hall, 2002).

4.4.2. Metalotioneinas (MTs)

Son polipéptidos de unos 70 a 75 aminoácidos con alto contenido de cisteína - aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo que poseen como radical (Aviñó *et al.*, 2007).

Aunque las MTs se inducen por tratamiento con cobre, el papel de estas en la tolerancia a metales pesados en hongos y animales quedó evidenciado, (Hamer,

1986, tomado por Hall, 2002) no siendo así en la desintoxicación de metales en plantas (Schat et al., 2000). Estos compuestos pueden jugar un papel importante en el mecanismo de los metales, pero su función precisa no está esclarecida, además de que pueden tener distintas funciones con diferentes metales (Hamer, 1986 tomado por Hall, 2002). Alternativamente pueden funcionar como antioxidantes (Dietz et al., 1999).

4.5. Compartimentalización vacuolar

El eflujo de los iones en la membrana plasmática y el transporte de los mismos al interior de la vacuola son dos vías para reducir el nivel de toxicidad de los metales pesados en el citosol, y por esto son los mecanismos importantes en la tolerancia a los mismos (Hall, 2002; Aviñó *et al.*, 2007). La diferencia entre ambos radica en que en el primer caso no es una garantía de que el problema de la toxicidad esté resuelto, mientras que en el segundo sí (Aviñó *et al.*, 2007).

El proceso de acumulación de los complejos PCs-Cd en la vacuola está bien documentado y hay evidencias de la acumulación de otros metales, involucrando diferentes transportadores. El mecanismo de procesamiento en el citoplasma y almacenamiento en la vacuola es un proceso sofisticado y complejo que requiere un mejor conocimiento (Aviñó *et al.*, 2007).

5. Fitorremediación

La limpieza de suelos contaminados por metales pesados constituye una tarea difícil particularmente, a gran escala (Lone *et al.*, 2008). Para remediar los suelos contaminados por metales pesados existen diferentes formas. Según Ghosh y Singh (2005), ellas se pueden agrupar en dos categorías:

Ex situ: requiere extraer el suelo contaminado para el tratamiento en o de sitio y luego se devuelve el suelo tratado al lugar donde fue extraído. Los métodos *ex situ* convencionales aplicados para la remediación de los suelos contaminados incluyen la excavación, detoxificación o/y destrucción física o química del contaminante. Convencionalmente el método *ex situ* se basa en excavar los suelos contaminados con metales pesados y enterrarlos en sitios basureros, pero este método no es

apropiado ya que solamente cambia el problema de contaminación de un lugar al otro y tiene además el riesgo asociado con el transporte del suelo contaminado (Lone *et al.*, 2008).

In situ: es la remediación sin excavación de sitio contaminado. Se define como la destrucción o transformación de contaminantes desde el suelo.

Se plantea que casi todos los métodos convencionales son costosos para implementar (Cunningham y Ow, 1996; Barceló y Poschenrieder, 2003; Peuke y Rennenberg, 2005). Según la estimación de EC (2002) (tomado por Peuke y Rennenberg, 2005), el costo para remediar el suelo contaminado en Europa oscila entre 59 y 109 mil millones de euros. Además, los métodos convencionales son técnicamente limitados en áreas relativamente pequeñas (Barceló y Poschenrieder, 2003) y no resuelven realmente el problema, solo lo transfieren a las generaciones futuras (Peuke y Rennenberg, 2005). Por otra parte, la remediación de metales pesados en el suelo por método fisicoquímico originan suelos inútiles para el crecimiento de las plantas ya que remueven todas las actividades biológicas incluyendo los microorganismos útiles tales como bacterias nitrificadoras, micorrizas, hongos y la fauna en el proceso de descontaminación (Ghosh y Singh, 2005). Es por esto que encontrar un método alternativo, barato, y eficiente para limpiar las áreas contaminadas es una necesidad urgente.

La idea de usar las plantas **hiperacumuladoras** para eliminar los metales pesados y otros compuestos contaminantes fue introducida por la primera vez en 1983 por Chaney (Lázaro *et al.*, 2002; Hamlin s.f.), pero el concepto se definió hace 300 años (Ghosh y Singh, 2005).

Actualmente se reconoce que las técnicas de fitorremediación basadas en el uso de las plantas son alternativas prometedoras a las técnicas clásicas de descontaminación (Barceló y Poschenrieder, 2003; Peuke y Rennenberg, 2005) y en los últimos años los intereses científicos y sociales en la tecnología de fitorremediación han aumentado considerablemente por varias razones, entre estas: la contaminación extensiva del suelo, el avance de los conocimientos científicos sobre los mecanismos y funciones de los organismos vivos y el ecosistema, el

empuje de opinión de las poblaciones y los intereses políticos y económicos (Barceló y Poschenrieder, 2003). Esta tecnología puede ser aplicada para ambos contaminantes, inorgánicos y orgánicos presentes en el suelo, el agua o el aire (Salt *et al.*, 1998) y que comparado con los métodos convencionales, el uso de plantas tiene numerosas ventajas (Peuke y Rennenberg, 2005). En primer lugar, la fitorremediación es más barata. Según William (1988), el costo de la remediación convencional es de 10 a 1 000 USD/m³, mientras que el costo de la fitoextracción es estimado en menos de 0,05 USD/m³. Se plantea que después de sembrar se incurre en costos insignificantes, por ejemplo: la cosecha, el manejo de campo y el control de malas hierbas. De acuerdo con los autores Berti y Cunngingham (2000) el promedio de costos por hectárea de suelo contaminado, empleando los métodos convencionales, es de 0,27 a 1,6 millones de dólares; mientras el costo de fitorremediación es aproximadamente de 10 a 1 000 veces menor. En el período de 1998 - 2005 el mercado de fitorremediación en USA estimó un incremento que osciló de 16 - 29 millones de dólares a 214 - 370 millones de dólares (Barceló y Poschenrieder, 2003).

En segundo lugar la fitorremediación es una tecnología neutral de CO₂: si la biomasa cosechada es quemada, no hay CO₂ adicional que se incorpora a la atmósfera. Por otra parte Peuke y Rennenberg (2005) plantearon que en dependencia del tipo de contaminación, las plantas pueden ser usadas en algunos procesos alternativos como quema para la producción energética. Meagher (2000, tomado por Peuke y Rennenberg, 2005) consideró que es posible recoger algunos metales del tejido de la planta.

La mayor desventaja de la fitorremediación radica en que esta es relativamente lenta, porque requiere años o hasta décadas para reducir a la mitad los metales presentes en el suelo (McGrath y Zhao, 2003). Por otra parte, durante el proceso de fitorremediación el suelo contaminado no se puede rentar o vender, esto puede traer como consecuencia problemas para el desarrollo económico (SRU, 2004 tomado por Peuke y Rennenberg, 2005).

El término fitorremediación es una palabra formada por el prefijo griego “phyto” que significa planta, y el sufijo del latín “*remidium*” que significa limpiar o rehabilitar (Prasad y Freitas, 2003). Según Betancourt *et al.* (2005) fitorremediación es un proceso donde se utilizan plantas para eliminar, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. La tecnología de fitorremediación se aplica adecuadamente en las áreas con niveles de contaminación de bajos a moderados y no en aquellos lugares donde el nivel de contaminación es alto, porque en condiciones difíciles las plantas no pueden desarrollarse (Hamlin s.f.). La profundidad a la cual el suelo puede ser limpiado está restringida a la zona de la raíz. Esta profundidad depende de la planta, puede oscilar desde varios centímetros hasta muchos metros (Schonoor *et al.*, 1995 tomado por Hamlin s.f.).

La fitorremediación consiste en una colección de diferentes tecnologías, basadas en la planta, cada una tiene un mecanismo distinto de acción para la recuperación de los suelos, sedimento o agua contaminados con metales. En la siguiente tabla se presenta esquemáticamente los procesos de fitorremediación.

Procesos	Mecanismos	Contaminantes
Rizofiltración	Acumulación rizoférica	Orgánico/inorganico
Fitoestabilización	Complejación	Inorgánico
Fitoextracción	Hiperracumulación	Inorgánico
Fitovolatilización	Volatilización por las hojas	Orgánico/inorganico

5.1. Rizofiltración: Se define como el uso de las plantas terrestres y acuáticas para absorber, concentrar y precipitar los contaminantes de medio acuático (Lone *et al.*, 2008). La rizofiltración puede ser utilizada para tratar parcialmente la descarga industrial, la escorrentía agrícola o el drenaje de las minas y se puede usar para limpiar los metales: plomo, cadmio, cobre, cinc, níquel, los cuales son retenidos primariamente en las raíces (Ghosh y Singh, 2005). Por otra parte, el autor Hamlin (s.f.) planteó que

los exudados radicales y cambios de pH en la rizosfera también pueden causar la precipitación de metal en la superficie de la raíz.

Dushenkov y Kapulnik (2000) describen las características de plantas ideales para la rizofiltración. Estas deben ser capaces de acumular y tolerar a una cantidad significativa de metales con un manejo simple, bajo costo de mantenimiento y el mínimo requerimiento de depósito secundario. También son deseables las plantas que producen una cantidad significativa de biomasa radical y área superficial grande de las raíces.

Algunas especies acuáticas poseen la capacidad de remover los metales pesados en agua por ejemplo: *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Hydrocotyle umbellata* L. y *Lemna minor* L. (Hamlin, s.f.). Por otra parte Lone *et al.* (2008) indicaron que las diferentes especies hiperacumuladoras también son utilizadas, por ejemplo el girasol (*Helianthus annuus*), la mustasa india (*Brassica juncea* Czern.) y el arroz (*Oryza sativa*). Las ventajas de la rizofiltración son la capacidad de ser usada tanto *in situ* como *ex situ* y el hecho de ser una tecnología competitiva de bajo costo en los tratamientos de agua superficial con alta concentración de metales pesados como Cr, Pb, Zn (Ensley, 2000).

5.2 Fitoestabilización: Según Hamlin (s.f.) a veces no hay un esfuerzo para remediar inmediatamente sitios contaminados por metales ya que estos no son de alta prioridad en la agenda. El método tradicional por el cual la toxicidad de metal es reducida en estos sitios es la inactivación *in situ*, una técnica de remediación que emplea las enmiendas de los suelos para inmovilizar o fijar los metales en el suelo. Aunque la migración de metales será minimizada, los suelos están normalmente sujetos a la erosión o aún poseen los riesgos para humanos y otros animales.

La fitoestabilización es la técnica basada en el uso de las plantas para estabilizar los residuos, prevenir la erosión tanto por el viento como por el agua, evitar la migración vertical de contaminantes hacia el manto freático e inmovilizar física y químicamente los contaminantes (Ghosh y Singh, 2005). La fitoestabilización puede ocurrir a través de la absorción, precipitación, complejación o reducción de valencia de metales. La

efectividad de este método depende de la capacidad de las raíces para limitar la movilidad y biodisponibilidad de contaminantes en el suelo (Lone *et al.*, 2008).

Diferente de las otras técnicas de fitorremediación, el objetivo de la fitoestabilización no es remover contaminantes metálicos de un sitio sino es estabilizar y reducir los peligros para la salud humana y para medio ambiente.

Las plantas escogidas para la fitoestabilización deben translocar muy poco los contaminantes (metal) hacia los tejidos aéreos de la planta, los cuales pueden ser consumidos por el hombre o los animales (Ghosh y Singh, 2005). La escasez de una cantidad apreciable de metales en los tejidos de las ramas también elimina la necesidad de tratamientos de los residuos después de la cosecha. Además, las plantas empleadas en este método de fitorremediación debe ser fácil para el manejo y cuidado, de rápido crecimiento, poseer un sistema radical denso y tolerar los metales contaminantes y otras condiciones del sitio, las cuales pueden limitar el crecimiento de la planta. Las dos especies de *Agrostis tenuis* Sibth y *Festuca rubra* L. actualmente se comercializan para la fitoestabilización de suelos contaminados con Pb, Zn o Cu (Hamlin, s.f.).

5.3 Fitoextracción: Es el mejor método para eliminar los contaminantes y por otra parte no se destruye la estructura y la fertilidad de los suelos. Según Halmin (s.f.), el proceso de fitoextracción implica el uso de las plantas para facilitar la remoción de los metales contaminantes en la matriz del suelo. Existen dos estrategias básicas de fitoextracción (Ghosh y Singh, 2005) que son:

✓ *Fitoextracción con ayuda de quelantes (fitoextracción inducida):* donde la disponibilidad de los metales en el suelo no es adecuado para la absorción suficiente de las plantas, pues los quelantes artificiales o agentes acidificantes pueden ser agregados para incrementar la movilidad y absorción de metales.

✓ *Fitoextracción continua:* en esta, la extracción de metales depende de la capacidad natural de las plantas para absorberlos, solo el número de repeticiones de siembra es controlado.

Muchos factores influyen en la efectividad de la fitoextracción. En primer lugar se encuentra la selección del sitio donde se emplea este método, pues la fitoextracción es aplicable solo en los lugares que contienen de bajo a moderado nivel de contaminación de metales (Hamlin, s.f.). Además los metales en el suelo deben ser biodisponibles o sujetos a la absorción por las raíces de las plantas. Por otra parte, el rango de crecimiento, la resistencia a las enfermedades de la planta, el grado de selectividad, los métodos de cosecha también son factores que influyen en el resultado de la fitoextracción.

En cuanto a las plantas empleadas en la fitoextracción, ellas deben ser capaces de acumular grandes cantidades de metales en sus tejidos, traslocarlos desde el sistema radical hacia parte aérea “cosechable” de la planta y tener una alta y rápida producción de biomasa. Ebbs y Kochian (1997) reportaron que *Brassica juncea*, la cual contiene una tercera parte de concentración de Zn en sus tejidos, es más efectiva en la remoción de este metal del suelo que *T. caerulescens* la cual es conocida como hiperacumuladora de Zn. Esta ventaja se debe primeramente a que *B. juncea* producen una biomasa diez veces mayor que *T. caerulescens*.

5.4 Fitovolatilización: Algunos metales tales como As, Hg y Se pueden existir como especies gaseosas en el medio ambiente (Hamlin, s.f.). En los años recientes los investigadores han estudiado las plantas capaces de absorber los metales de forma elemental del suelo, que lo convierte biológicamente en estado gaseoso dentro de la planta y exudarlos hacia atmósfera. Este proceso se denomina fitovolatilización y constituye el método más controversial de todas las técnicas de fitorremediación, ya que existe la duda sobre si la volatilización de estos elementos a la atmósfera es segura (Ghosh y Singh, 2005). Sin embargo, los sitios que se limpia con este método no requieren mucho manejo después de la siembra original. Además, la fitovolatilización posee beneficios adicionales tales como: sitios mínimos de alteración, menos erosión y no es necesario tratar a los materiales vegetales de la cosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo desde Enero de 2007 a Mayo de 2010 en el laboratorio del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”.

Preparación del material vegetal y condiciones de crecimiento

Plantas seleccionadas en campo de la variedad Sac Ki o henequén blanco, procedentes del germoplasma de la Empresa Henequenera de Matanzas “Eladio Hernández”, se utilizaron como fuente de explante. Estas plantas se caracterizaron por mostrar un óptimo estado fisiológico y fitosanitario.

Se aislaron ápices con un tamaño de 7 cm de longitud, los cuales se emplearon en el proceso de desinfección. Antes de iniciar el proceso de esterilización del material vegetal se eliminó cualquier porción de suelo a través de un lavado con agua y detergente (1% p/v) por espacio de 30 minutos.

El tejido vegetal se desinfectó superficialmente por inmersión en solución de alcohol al 70% (v/v) durante un minuto, a continuación se flameó hasta la extinción del fuego. El material vegetal se introdujo de inmediato en solución de hipoclorito de sodio 2,5% (v/v) durante 20 minutos. A continuación se realizaron tres lavados, durante 25 minutos (5 – 10 – 10 minutos) con agua destilada estéril. Posterior a los lavados, con la ayuda de un cuchillo se eliminaron las partes del vegetal dañado por el cloro. Todas estas acciones se realizaron en condiciones controladas pero no asépticas.

En la cámara de flujo laminar se sumergieron nuevamente los explantes en solución de hipoclorito de sodio al 2,5% (v/v) durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados, durante 15 minutos (5 – 5 – 5 minutos) con agua destilada estéril. Posteriormente, con la ayuda de pinzas y bisturí se eliminaron las partes del vegetal dañadas por el cloro. Este paso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar sobre platos y papel absorbente previamente esterilizados.

Los explantes aislados, con talla de 4 cm de longitud, se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con las sales portadoras de nitrógeno ligeramente

modificadas por Robert *et al.* (1992), suplementado con 0,1 mg/l de tiamina; 0,5 mg/l de piridoxina; 0,5 mg/l de ácido nicotínico; 2,0 mg/l de glicina, 100 mg/l de myo-inositol y 30 g/l de sacarosa. Se empleó como balance hormonal 0,025 mg/l de 2,4-D y 10,0 mg/l de 6-BAP.

El medio fue solidificado con 10 g/l de Agar Técnico Agar 3 (Biocen). El pH fue ajustado a 5,7 antes de autoclavarse a 121°C y 1,2 kg/cm². En frascos de vidrio, empleado en las biofabricas cubanas (12 cm alto y 8 cm de diámetro) se añadieron 30 ml de medio, estos fueron cerrados con tapas de polypropileno. Todos los explantes se cultivaron a 26 ± 2°C en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad en habitaciones iluminadas naturalmente (37,5 μmol.m².s⁻¹ de luminosidad como promedio).

Después de una semana del establecimiento de los explantes y eliminado los contaminados, se resembraron en el medio basal antes descrito pero agregando diferentes concentraciones de cobre y zinc como se presenta en la tabla siguiente:

Tratamientos	Cantidad de CuSO ₄ añadido (μM)	Tratamientos	Cantidad de ZnSO ₄ añadido (μM)
Control	0	Control	0
1	50	5	50
2	100	6	100
3	200	7	200
4	400	8	400

El trabajo se realizó según un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas por tratamientos y 15 frascos con una planta por réplica. Después de 40 días de la resiembra, se seleccionó el material para realizar las evaluaciones siguientes:

1. Evaluación del contenido de Biomasa

Con el propósito de valorar el efecto de los metales pesados en la acumulación de biomasa y usarlo como referencia del crecimiento de plántulas de henequén, se

pesaron todos los explantes al inicio de la resiembra, pasado 40 días de cultivo, se pesaron de nuevo. La diferencia de peso (peso final –peso inicial) representó el incremento del crecimiento en todos los tratamientos. El valor que se obtuvo en el control representó el 100% y a partir de este se determinó cuanto porcentaje representó del control, el incremento del crecimiento de cada tratamiento. Los datos de porcentaje se transformaron según la fórmula $\log_{10} \%$

2. Medición de la conductividad eléctrica

Con el objetivo de evaluar el grado de integridad de la membrana plasmática se realizó una evaluación indirecta consistente en la medición de la conductividad eléctrica en vitroplantas de henequén, crecidas en medios de cultivo con altas concentraciones de zinc y cobre. Para ello se tomó la hoja más desarrollada (expandida completamente) de 5 plántulas proveniente de cada tratamiento. Con un perforador de diámetro de 2 mm² se realizaron 5 grupos de 1 g de tejido por tratamiento, los que posteriormente se colocaron en vasos de precipitados que contenían 10 ml de agua destilada (relación peso/volumen = 1/10). A continuación se procedió a medir la conductividad eléctrica para cada tratamiento.

3. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes

Se pesaron 0,5 g de muestra foliar (hoja más desarrollada) en tres plántulas de cada tratamiento. Después de ser maceradas en 2 ml de solución tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) en frío, las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante para la medición inmediata de la actividad enzimática de **catalasa** y **peroxidasa**.

3.1. Determinación de la actividad enzimática de catalasa

La actividad de catalasa fue determinada por medición de la velocidad de la descomposición del H₂O₂ previamente ajustada a una absorbancia de 240 nm (0,040-0,045) utilizando como blanco agua destilada, en una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0 conteniendo 3% (v/v) de H₂O₂ (Havir y McHale, 1987). El volumen final del ensayo fue de 3 ml. La lectura fue realizada a 240 nm en un espectrofotómetro (Ultrospect 2000).

Se tomaron tres mediciones por muestra. La actividad enzimática catalasa se determinó según la siguiente fórmula:

$$V(U/ml) = \frac{A \cdot 4 \cdot V_t \cdot f}{\delta \cdot V}$$

V_t : volumen total (3 ml)
 V : volumen de la muestra (0,2 ml)
 f : factores de dilución (5)
 δ : 25,5 cm²/μM

3.2. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa

La actividad de peroxidasa se midió por el método guaiacol peroxidasa. El ensayo de actividad enzimática se realizó en un volumen final de 3 ml. Para la reacción se adicionó en una cubeta de cuarzo 2,80 ml de solución tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0; 50 μL de solución guaiacol 0,018 M; 50 μL solución de peróxido de hidrógeno ajustado a una absorbancia a 240 nm (0.040-0.045) utilizando agua como blanco. A la mezcla reaccionante se adicionaron 100 μL del extracto vegetal. La actividad enzimática se realizó a 25°C y a una longitud de onda de 436 nm. Se tomaron tres mediciones por muestra en un Espectrofotómetro (Ultrospect 2000). La actividad enzimática peroxidasa se determinó según la siguiente fórmula:

$$V(U/ml) = \frac{A \cdot 3.01 \cdot V_t \cdot 1000 \cdot f}{\delta \cdot V}$$

V_t : volumen total (3 ml)
 V : volumen de la muestra (0,1 ml)
 f : factores de dilución (15)
 δ : 43,6 cm²/μM

4. Contenido de proteínas solubles

Para el cálculo del contenido de proteínas solubles se pesaron 0,5 g de muestra foliar (hoja más desarrollada) en cinco plántulas de cada tratamiento. Después de ser maceradas en 2 ml de solución tampón de fosfato de sodio 50 mM, (pH 7,0) en frío, las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se extrajo el sobrenadante para la medición inmediata del contenido de proteínas solubles. La concentración de proteínas solubles fue medida por el método de Bradford (1976).

5. Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares reductores y carbohidratos solubles totales a partir de la extracción realizada para la evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes (Epigrafe 3). Siguiendo la metodología modificada del Fenol-Sulfúrico se determinó el contenido de carbohidratos solubles totales. Los azúcares reductores se determinaron según la técnica del Dinitrosalisílico (Sumner, 1921). Para ambas determinaciones se establecieron curvas patrones ($y = 5,3909x - 0,0194$. $R^2 = 0,9796$ para azúcares reductores: $y = 4,6241x - 0,0692$. $R^2 = 0,999$). A partir de los valores obtenidos de azúcares reductores y carbohidratos solubles totales se obtuvieron los valores de azúcares no reductores más polisacáridos por la diferencia del valor de carbohidratos totales menos el valor de azúcares reductores. Se obtuvo el porcentaje de azúcares reductores según carbohidratos totales por la multiplicación del valor de azúcares reductores por 100 entre el valor de carbohidratos totales para cada tratamiento.

6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron según un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas para cada tratamiento. Los datos se procesaron según paquete Statgraphic Versión 5.0 (2000), sobre WINDOW, determinándose si los datos cumplían con una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov - Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett (Sigarroat, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial así como la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, según correspondiera. Para los datos que no cumplan con estas premisas serán comparadas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación del contenido de Biomasa

Generalmente para el estudio de la tolerancia de las plantas a los metales pesados los parámetros de crecimiento de rápida y fácil medición tales como: número de los raíces, longitud de las mismas son preferibles (Watson *et al.*, 2003), sin embargo la biomasa vegetal, tal como la masa fresca y masa seca son muy buenos indicadores para evaluar el crecimiento vegetal. Según Abreu *et al.* (2007), esta variable (biomasa vegetal) es muy importante pues en muchas ocasiones se evalúan indicadores como área foliar, altura de la planta y número de hojas, las cuales no tienen en cuenta la biomasa producida.

Tabla 2: Acumulación de biomasa fresca en función de la concentración de Cobre y Zinc presente en medios de cultivo en plantas de henequén sembradas durante 30 días Cada valor representa el promedio de 5 plántulas por tratamiento. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según Dócima de Comparación de Duncan ($\alpha= 0,05$). Los datos de porcentaje se transformaron según la fórmula $\log_{10} \%$.

Tratamientos (μM)	Masa fresca (mg)	Porciento (%)
0	4,56 ^c	100
Tratamientos con Cu^{2+}		
50	4,94 ^d	108,333
100	4,14 ^c	90,789
200	2,03 ^{ab}	44,517
400	1,784 ^{ab}	39,123
Tratamientos con Zn^{2+}		
50	4,99 ^d	109,429
100	4,29 ^c	94,079
200	2,4 ^b	52,632
400	0,9 ^a	19,737

En la **Tabla 2** se puede observar que la masa fresca acumulada en plantas de henequén tratadas con cobre y zinc presentó un porcentaje de crecimiento positivo en todas las concentraciones. En el tratamiento de 50 μM de Cu y Zn, se observa un crecimiento muy favorable pues el porcentaje del incremento de crecimiento se elevó en un 109% y 108% respectivamente con relación al control y decreció gradualmente hasta la concentración de 400 μM en ambos metales.

Coincidiendo con el resultado en las primeras concentraciones, Gao *et al.* (2008) encontraron que en la concentración de 200 ppm de cobre en el cultivo de *Jatropha curcas*, se estimuló la producción de biomasa; Auda y Ali (2010) encontraron un incremento de biomasa de *Daucus carota* al añadir 75 $\mu\text{g/g}$ zinc al suelo. Se debe mencionar que en el medio *in vitro*, la disponibilidad de iones metales para la absorción de la planta es mayor que en medio *in vivo* (Santos-Díaz *et al.*, 2007), lo cual favorece el incremento de la absorción de iones al interior de la planta.

El zinc y el cobre son micronutrientes esenciales los cuales en concentración óptima estimulan el crecimiento de la planta. Yruela (2005) planteó que el cobre actúa como elemento estructural en las proteínas reguladores, participa en el transporte de electrones en la fotosíntesis y la respiración, además se desempeña como cofactor en muchos enzimas tales como: Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD), citocromo oxidasa, amino oxidasa. A nivel celular, Cu posee una función esencial en la ruta de señalización de transcripción y mecanismo de tráfico de proteínas. Con relación a los resultados obtenidos con el tratamiento de zinc, se plantea que aunque no tiene actividad redox influye en procesos fisiológicos (Mishra y Prakash, 2009), siendo un componente esencial de varios sistemas de enzimas para la producción de energía, la regulación y la síntesis de proteínas, mantenimiento de la integridad de la membrana (Casierra-Posada y Poveda, 2005). Además el zinc juega un papel importante en la resistencia y tolerancia a los organismos patógenos (Webb, 1994 citado por Casierra-Posada y Poveda, 2005).

En un estudio de la toxicidad del cobre en el cultivo *in vitro* de *Prunus cerasifera*, Lombardi y Sebastiani (2005) encontraron que en la concentración de 50 μM del cobre en medio, la concentración de este elemento que se encontró en el tejido de esta

planta fue 180 ppm y la planta fue tolerante a esta cantidad, mientras Gupta (1979) y Stevenson (1986) (citado por Lombardi y Sebastiani, 2005) indicaron que casi todos los cultivos toleran entre 20 y 30 ppm solamente.

Por otra parte, Bernal *et al.* (2006) plantearon que las plantas crecidas en exceso de cobre (de 3 a 100 μM) presentaron una reducción de biomasa y síntomas de clorosis. En este estudio las plántulas de *Agave fourcroydes* L. crecidas en presencia de metales pesados no se mostraron síntomas de toxicidad tales como necrosis de las hojas y muerte de las mismas en ningún tratamiento. Lo que se sugiere al menos, que el *Agave fourcroydes* L. es tolerante a tales concentraciones de cobre y zinc ensayadas.

A partir de la concentración de 200 μM de ambos metales se observó una reducción ligera del tamaño de las plántulas de *Agave fourcroydes* L. valor que disminuye aún más en la concentración de 400 μM . Sin embargo la reducción de tamaño más marcada se nota en 400 μM de zinc. Paralelamente con esta observación se obtuvo que la biomasa de *Agave fourcroydes* L. disminuyó en un 39,1% y 19,7% en 400 μM de Cu y Zn respectivamente en comparación con el control.

Aunque el Cu y Zn se conocen como micronutrientes esenciales (Ascón-Bieto y Talón, 2002) a su vez son metales pesados, por lo tanto en exceso son tóxicos para la planta. La reducción del crecimiento pudiera ser, por un lado, debido al efecto de la disminución de la tasa de asimilación neta, como resultado de afectaciones al proceso de fotosíntesis causados por ambos metales en concentraciones tóxicas, y por otro lado, a las alteraciones en el metabolismo de la planta, provocados por los daños en la estructura y función de los componentes básicos como proteínas, enzimas y el ADN.

Los dos metales Cu y Zn por diferentes vías (el contenido, la estructura de clorofila y cloroplastos o el transporte de electrones) afectan negativamente la fotosíntesis. Ellos pueden, en primer lugar, reemplazar el Mg en la estructura de clorofila (Küpper *et al.*, 2003; Ernst, 1996 citado por Casierra-Posada y Poveda, 2005; Vassilev *et al.*, 2007) y/o interfieren a la síntesis de esta última por inducir a una deficiencia de hierro (Ebbs y Kochian, 1997; Pätsikkä *et al.*, 2002).

El cobre en exceso causa una alteración en la estructura de los cloroplastos (Quartacci *et al.*, 2000) tal como la degradación de las pilas de la grana y laminilla del estroma, el incremento del número y tamaño de plastoglobulina (Bernal *et al.*, 2006) y también afecta a composición de la membrana tilacoidal por la peroxidación lipídica (Quartacci *et al.*, 2000). Sin embargo en este estudio no se observó clorosis en las de *Agave fourcroydes* L. ni en el tratamiento de 400 μ M.

Esta respuesta sugiere que la estructura de los cloroplastos del *Agave fourcroydes* L. en este tratamiento no se afecta fuertemente y que el efecto del cobre sobre la fotosíntesis si se produjera pudiera estar relacionado con el transporte de electrones. De acuerdo con este planteamiento Yruela *et al.* (1993) indicaron que ambos sitios, el aceptor y el donador de electrones en el fotosistema II son sitios fuertemente atacados por la toxicidad del cobre.

El zinc por su parte pudiera afectar la fotosíntesis en diferentes sitios (Vassilev *et al.*, 2007), limitando la fijación de CO₂ y el flujo de electrones desde momento en que sucede la fotólisis del agua hasta cuando los electrones alcanzan el fotosistema II (Casierra-Posada y Poveda, 2005) interfiriendo también con la actividad de la RubisCo (Vassilev *et al.*, 2007), por lo tanto la reducción de la biomasa en las plantas tratadas con exceso de zinc pudiera ser consecuencia de la irregularidad en el funcionamiento del aparato fotosintético.

Como se mencionó anteriormente, los dos metales cobre y zinc afectan otros procesos y estructuras en la célula que alteran el metabolismo normal de la planta, reduciendo de esta manera su biomasa. En el caso del cobre, según Yruela (2005) es capaz de ligarse con el grupo sulfidrilo de las proteínas causando cambios en la estructura y función de las mismas que conllevan a cambios en actividad enzimática, en la estructura y función de los ácidos nucleicos y aminoácidos. También puede provocar una deficiencia de los elementos esenciales por el desplazamiento de ellos de su metabolismo estándar (Aviñó *et al.*, 2007).

El zinc por su parte puede afectar al sistema homeostático normal de iones por interferir en la absorción, transporte, osmosis y regulación de los iones esenciales que trae como consecuencia una interrupción de los procesos metabólicos dentro

de la célula (Rout y Das, 2003; Broadley *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2009). Además Yang *et al.* (2004) indicaron que los iones de zinc interfieren en los movimientos estomáticos, perturbando el flujo de agua a través de la membrana. Por otro lado la reducción del crecimiento de las plantas tratadas con exceso de zinc puede justificarse según los autores Ernst *et al.* (1992); Prasad *et al.* (1999); Wallnöfer y Engelhardt (1995, citado por Casierra-Posada y Poveda, 2005), pues el exceso de zinc disminuye la biosíntesis de giberelina y de triptófano (el precursor primario de auxina AIA) responsables en gran parte la división y elongación celular.

Por último pero no menos importante, estos metales en exceso perjudican a otras estructuras celulares y procesos metabólicos, resultado de su capacidad de generar las especies reactivas del oxígeno (ROS) provocando el estrés oxidativo en la planta (Aviñó *et al.*, 2007; Hall, 2002). Este fenómeno y los daños asociados al estrés oxidativo se sugiere como responsables también de la reducción de biomasa.

2. Medición de la conductividad eléctrica

En la **figura 2** se puede apreciar que la conductividad eléctrica se elevó gradualmente con el incremento de la concentración de cobre y todos los tratamientos diferenciaron entre ellos y con relación al testigo, que presentó la menor conductividad. En el caso del ensayo con Zn no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos 50 y 100 μM , sin embargo, se encontró un aumento significativo en 200 y 400 μM , siendo el valor reportado para este último estadísticamente superior a todos los tratamientos incluyendo los de cobre.

Se conoce que la membrana plasmática es la envoltura de la célula, caracterizada como una barrera semipermeable (Meharg, 1993), que regula a través de ella la entrada y la salida de determinadas sustancias (agua, iones minerales, azúcares, etc.) para mantener el metabolismo normal dentro de la célula. En tal condición, el agua se mueve a través de las membranas plasmáticas en forma pasiva, no ocurriendo lo mismo con el resto de las moléculas, las que presentan permeabilidad diferencial. Por tal motivo, la cuantificación de metabolitos desprendidos por una célula hacia el medio puede ser una buena aproximación para determinar su grado

de selectividad o ser el reflejo de alguna alteración que ésta haya experimentado (Yuri *et al.*, 2009).

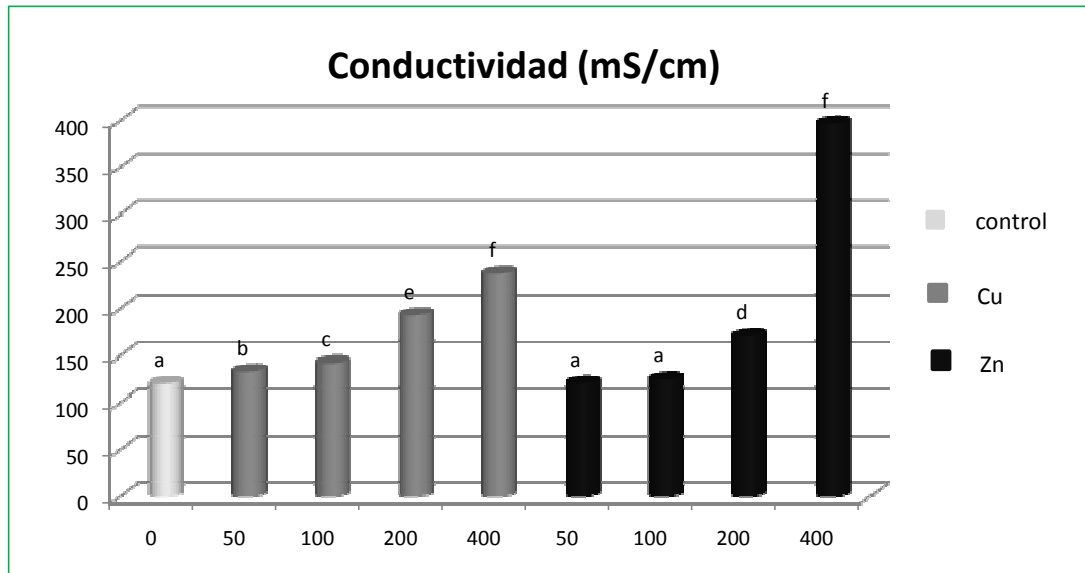


Figura 2: Medición de la conductividad eléctrica (mS/cm) en función de la concentración de Cobre y Zinc presente en medios de cultivo en plantas de henequén sembradas durante 30 días. Cada columna representa el valor promedio de 5 plántulas por tratamiento. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según Dócima de Comparación de Duncan ($\alpha=0.05$).

Una vez dañada, la permeabilidad de la membrana se altera y trae como consecuencia un cambio en el flujo de los solutos entre la célula y el medio que la rodea, cambiando la conductividad de este último. Por eso la conductividad eléctrica de un volumen de agua (desionizada), donde se ha sumergido previamente un tejido es un indicador para evaluar la permeabilidad, así como de la estabilidad de la membrana plasmática de ese tejido (Yuri *et al.*, 2009). Según Chen *et al.* (2000) y Janicka-Russak *et al.* (2008), aunque los metales pesados pueden alterar diferentes procesos fisiológicos, el primer sitio afectado por la toxicidad de ellos es probablemente a nivel de membrana.

Fodor *et al.* (1995) plantearon que el primer síntoma del daño por los metales pesados en la membrana, es un incremento de la permeabilidad con la interrupción consecuente de balance iónico en la célula.

Según los planteamientos anteriores, se evidencia en este estudio, que cuando se eleva la concentración de metales (Cu^{2+} , Zn^{2+}) la conductividad se incrementa, a partir de 50 μM en el caso de Cu^{2+} y de 200 μM en caso de Zn^{2+} lo que sugiere un posible daño de la membrana plasmática de las plantas de *Agave fourcroydes* L. de tal manera que se modifica su permeabilidad o selectividad afectando su integridad, y como consecuencia una fuga de los iones al medio que se verifica en el incremento de la conductividad eléctrica.

La alteración de la integridad funcional de la membrana, pudiera estar relacionado por los efectos consecuentes de la interacción compleja entre los metales pesados y los grupos funcionales de esta.

En primer lugar, según Breckle y Kahle (1991) citado por Janicka-Russak *et al.* (2008), los metales pesados pueden reemplazar al ión calcio (Ca^{2+}) en los sitios esenciales de la membrana plasmática.

En segundo lugar, se conoce que los metales pesados tienen capacidad de unirse con las moléculas orgánicas (Aviñó *et al.*, 2007), especialmente con grupos sulfidrilos de proteínas y los grupos hidroxilos de fosfolípidos en las membranas (Devi y Prasad, 1999).

En tercer lugar, los metales pesados por la formación de los ligandos con las moléculas orgánicas, provocan un aumento en el nivel de los radicales libres, los cuales interrumpen el balance redox de la célula induciendo el estrés oxidativo (Aviñó *et al.*, 2007; Hall, 2002). Una de las consecuencias de este fenómeno en la célula es la peroxidación lipídica de la membrana plasmática causando cambio físicoquímicos que aumentan la solubilidad de las membranas (Halliwell y Gutteridge, 1984 citado por Quartacci *et al.*, 2001).

Todos los eventos antes mencionados dan lugar a un incremento de la permeabilidad no específica de la membrana y a una disminución paralela de actividad del transporte específico, que originan la interrupción de la homeostasis de iones y una reducción de la actividad de muchas enzimas importantes para el metabolismo básico de la célula (Janicka-Russak *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo antes mencionado, Yuri *et al.* (2009) indicaron que los cambios en la composición lipídica (disminución de ácidos grasos insaturados, determinantes de su fluidez) y proteínas, son los eventos de mayor relevancia en la mantención de la selectividad funcional de la membrana.

En cuanto a las proteínas, la acción de los metales pesados es muy compleja incluyendo: la oxidación y entrecruzamiento de proteínas dando lugar a una inhibición de las proteínas claves en la membrana (Harm *et al.*, 1994). También los metales pesados interfieren en la expresión de genes específicos.

Una de las enzimas de la membrana, la cual se altera en plantas tratadas con metales pesados parece ser H⁺-ATPasa, la única operadora de la bomba de protones en la membrana plasmática, la cual es esencial en la regulación de la homeostasia iónica (Van Assche y Clijsters, 1990; Janicka-Russak *et al.*, 2008).

Existen trabajos donde se demuestra que la actividad hidrolítica de la H⁺-ATPasa y el transporte de iones dependiente de ATP fueron inhibidos en presencia de metales tales como Cd (Fodor *et al.*, 1995), Cu (Burzýnski y Kolano, 2003), Cd, Cu, Ni (Janicka-Russak *et al.*, 2008).

Por otra parte, en las plantas expuestas a estrés por metales pesados, el incremento de la actividad lipooxigenasa acelera la producción de especies reactivas del oxígeno, que a su vez inducen la peroxidación lipídica, especialmente en los ácidos grasos no saturados que conduce a una degradación de la estructura de la membrana (DeVos y Schat, 1981 citado por Yurekli y Porgali, 2006). En concordancia con lo anteriormente planteado Dixit *et al.* (2000) indicaron que la peroxidación lipídica puede ser una consecuencia de la actividad generada por las especies reactivas del oxígeno (ROS). Ambos iones redox activos (Cu y Fe) y los iones no redox activos como Zn y Cd han sido reportados como generadores de la peroxidación lipídica por vía de la generación de los ROS en la planta (Gallego *et al.*, 1996 y Chaoui *et al.*, 1997).

Por otra parte Ros *et al.* (1992) y Fodor *et al.* (1995) plantearon que la saturación de los ácidos grasos en la membrana plasmática de las plantas tratadas con metales pesados se incrementa mientras que el nivel de esteroles disminuye

significativamente. Estos cambios pueden afectar la fluidez y también la actividad de las proteínas integrales de membrana, como resultado de la alteración del medio lipídico en el cual están embebidas (Quartacci *et al.*, 2000).

A diferencia de este estudio, donde se evaluó de forma indirecta el grado de integridad de la membrana en plantas crecidas bajo condiciones de alto contenido de metales pesados, en la mayoría de los trabajos realizados se utiliza la cuantificación de Malondialdehído (MDA) como un indicador de estrés fisiológico y envejecimiento (Quariti *et al.*, 1997) ya que es el producto final de la peroxidación lipídica (Yurekli y Porgali 2006).

El incremento de la conductividad que se aprecia en este trabajo pudiera estar afectando el crecimiento de las plantas, pues a las mayores concentraciones tanto de Cobre como de Zinc (200 y 400 μM), se obtuvieron los menores porcentajes del incremento de crecimiento siendo más pronunciado en 400 μM de Zinc, lo que sugiere que este metal a esta concentración, no favorece el metabolismo del henequén ya que este último debe modificarse para estimular mecanismos de tolerancia.

3. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes

En la **figura 3** se observan los valores de actividad enzimática catalasa y peroxidasa en plántulas de *Agave fourcroydes* L. sometidas a distintas concentraciones de cobre y zinc. En cuanto a catalasa, se produjo una reducción significativa de su actividad en los tratamientos de 50 μM , 100 μM y 200 μM de cobre en comparación con el control, mientras que en 400 μM se obtuvo un incremento significativamente superior al control. Por otra parte, en los tratamientos con 50 μM y 100 μM de zinc se observó una reducción significativa en la actividad de esta enzima con respecto al control, incrementándose en 200 μM y 400 μM , aunque no llegó a superar de manera significativa la actividad reportada en el tratamiento control.

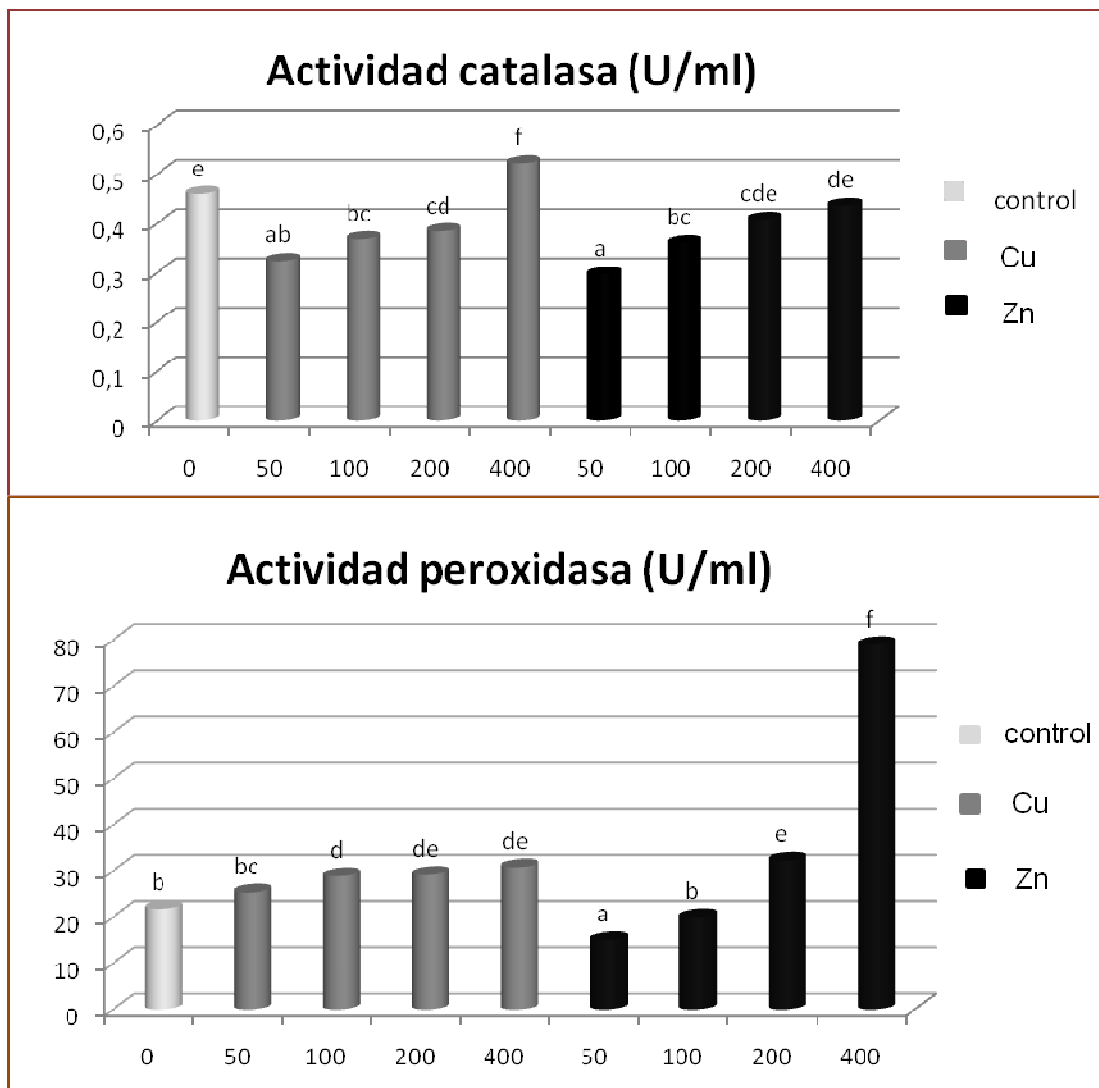


Figura 3: Medición de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa y peroxidasa) en función de la concentración de Cobre y Zinc presente en medios de cultivo en plantas de henequén sembradas durante 30 días. Cada columna representa el valor promedio de 3 plántulas por tratamiento. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según Dócima de Comparación de Duncan ($\alpha=0.05$).

En el caso de la peroxidasa, la actividad no se diferencia al comparar el tratamiento control con los de 50 μM de cobre y 100 μM de zinc, pero sí se incrementó en el resto de los tratamientos de cobre y en los tratamientos de 200 μM y de 400 μM de zinc. En este último tratamiento, la actividad peroxidasa se incrementó notablemente en comparación con el resto de los tratamientos. En 50 μM de zinc, se produjo una reducción significativa de este indicador.

Los metales pesados tales como el cobre y el zinc, por sus propiedades, son capaces de estimular la formación de las especies reactivas de oxígeno (Dietz *et al.*, 1999), los cuales en alta concentración pueden dar lugar a una oxidación incontrolable de las estructuras de la célula, incluyendo ADN, proteínas y lípidos de membrana, lo que favorece la interrupción del metabolismo y la destrucción de la estructura celular (Desikan *et al.*, 2005). Las ROS incluyen los radicales libres y los peróxidos tales como: O_2^- ; HO_2 ; H_2O_2 ; $\cdot OH$; y oxígeno singlete 1O_2 .

Las plantas generan ROS continuamente como productos de un metabolismo aeróbico normal (Desikan *et al.*, 2005), por eso no es sorprendente que ellas también poseen el sistema de defensa antioxidante integral que contiene componentes tanto enzimáticos como no enzimáticos, para controlar en niveles no tóxicos los dichos radicales, manteniendo el balance redox celular (Luo *et al.*, 2010). De hecho, algunos de los procesos antioxidantes son inducibles respondiendo a la alta concentración de las ROS, lo que sugiere que los mecanismos celulares evolucionan para reconocer y mejorar su acción ante el alto contenido de tales compuestos (Desikan *et al.*, 2005). Uno de ellos es la estimulación de la formación de las enzimas antioxidantes.

Las plantas contienen diferentes enzimas antioxidantes capaces de eliminar de manera rápida y eficientemente las ROS, y entre las más importantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); acorbatoperoxidasa (APX) (Mittler y Poulos, 2005). Passardi *et al.* (2005) plantearon que el balance entre la actividad de la SOD y APX (y/o CAT) es considerado crucial para el mantenimiento de los niveles de O_2^- y H_2O_2 y que este balance junto al secuestro de los iones metálicos tales como Fe y Cu por la ferritina o proteínas-ligando-metales, son considerados muy importantes para prevenir la formación del radical altamente tóxico $\cdot OH$ por el mecanismo de Haber–Weiss o reacción de Fenton.

En este estudio se evaluó la actividad de dos enzimas: catalasa y peroxidasa. Es bien conocido que estas dos enzimas juegan un papel importante en la prevención de estrés oxidativo por catalizar la reducción de H_2O_2 . La peroxidasa (POX, EC1.11.1.7) pertenece a una familia grande de enzimas capaces de oxidar

diferentes donores de electrones tales como el guaiacol y el ascorbato en presencia de H_2O_2 y son nombrados según el tipo de donador utilizado (guaiacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa) (Fang y Kao, 2000; Yurekli y Porgali, 2006).

Se plantea que la POX parece ser la única enzima que se encuentra en abundancia en las plantas y algas (Raven, 2003). Estas enzimas están implicadas en muchos procesos bioquímicos y fisiológicos tales como el crecimiento y expansión celular, desarrollo y diferenciación, catabolismo de auxinas, lignificación y en las respuestas al estrés abiótico y biótico (Mac Farlane y Burchett, 2001; Passardi *et al.*, 2005).

La actividad de POX se considera como un biomarcador útil de estrés ambiental en plantas (Agawal y Pandey, 2004, tomado por Meng *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010) porque esta se afecta por los metales pesados, la salinidad, y otras condiciones (Gao *et al.*, 2009).

La Catalasa (CAT, EC1.11.1.6) por su parte es la enzima oxidoreductasa más universal, la cual descompone el H_2O_2 a O_2 y H_2O (Meng *et al.*, 2007) y su actividad no depende de ningún reductor adicional como el caso de la peroxidasa (Feierabend, 2005). En las plantas superiores la catalasa se localiza predominantemente o exclusivamente en peroxisomas y ocasionalmente en mitocondria (Feierabend, 2005).

La variación en la respuesta de las enzimas antioxidantes evaluadas en *Agave fourcroydes* L. puede ser posible por la diferencia de propiedades entre los dos iones metálicos, así como entre las enzimas. Además se debe destacar que en las plantas estudiadas la respuesta del sistema antioxidante enzimático es muy compleja, como en todos los organismos superiores, y es el resultado de una interacción entre las diferentes enzimas y otros metabolitos reductores. Por lo tanto no se debe asumir una conclusión sin analizar integralmente los resultados.

Los resultados que se alcanzan en este estudio difieren de los empleados en la discusión de estos. Se plantea en primer lugar, que la actividad catalasa siempre aumenta en condición de estrés de cobre (Draobzkiewicz, *et al.*, 2004). En este sentido, se asume que en *Agave fourcroydes* L. se produce este estrés a partir de concentración de 400 μ M.

Por otra parte, para explicar la disminución en la actividad de catalasa en los tratamientos de alta concentración de metales en comparación con el control, se plantea que la alta cantidad de H_2O_2 producida por metales vuelve a inactivar la actividad de catalasa (Mashoudi *et al.*, 1997) y que la capacidad de eliminar las ROS de esta enzima es limitada (Meng *et al.*, 2007).

Los resultados aquí obtenidos parecen contradictorios con este planteamiento, porque la actividad de catalasa obtenida en el estudio se disminuye en los primeros tratamientos, o sea, en las concentraciones más bajas de los metales y luego se incrementó en las más altas. El comportamiento de esta enzima en *Agave fourcroydes* L. fue similar en ambos metales.

Se supone que con el aumento de la concentración de estos metales se produce más H_2O_2 , especialmente en el caso del cobre, un metal de transición que cataliza la formación de peróxido (Yruela, 2005). En este sentido se propone que en henequén, la catalasa juega el papel protector cuando hay un aumento de H_2O_2 .

El bajo contenido de peróxido de hidrógeno en los primeros tratamientos podría ser debido a que los mecanismos de secuestro de los iones o bien por ácidos orgánicos, o bien por proteínas como se plantean anteriormente son eficientes a bajas concentraciones de metal, por lo tanto la cantidad de H_2O_2 generada es pequeña.

La catalasa es una enzima que su actividad es independiente de los donores de iones pero posee baja afinidad por el sustrato H_2O_2 (Mitler y Poulos, 2005; Feierabend, 2005), y como se señaló previamente, el sistema antioxidante en la planta lo integran muchas enzimas diferentes, por eso no es sorprendente que las pequeñas cantidades de H_2O_2 no induzcan la actividad catalasa.

Diferente de la actividad de catalasa, el comportamiento de la peroxidasa varía entre los tratamientos de Cobre y Zinc. Las evidencias acumuladas señalan que el Cobre induce la actividad peroxidasa en plantas como por ejemplo el arroz *Oryza sativa* (Fang y Kao, 2000); en el ajo *Allium sativum* (Meng *et al.*, 2007) o en el frijol *Phaseolus vulgaris* L. cv. Akman (Yurekli y Porgali, 2006). Pero en el caso del Zinc

resulta muy interesante porque en los primeros tratamientos, la actividad peroxidasa disminuye pero se eleva en las concentraciones de 200 μM y en 400 μM .

En el caso de la peroxidasa, específicamente la ascorbato peroxidasa la afinidad de ella por los sustratos es mucho más alta que la catalasa (Mitler y Poulos, 2005), y por ende es mucho más sensible que esta última. Por otra parte, como se indicó anteriormente, el Cobre difiere del Zinc, pues posee la propiedad de catalizar la formación de H_2O_2 , por lo tanto se supone que la cantidad de esta sustancia generada en los tratamientos con Cobre será más alta que con Zinc, y como consecuencia la actividad de peroxidasa en los primeros debe ser más alta. Esta hipótesis se cumple en las tres primeras concentraciones de los iones metálicos.

Para comprender la baja actividad de la peroxidasa en los primeros tratamientos con Zinc se hace referencia al planteamiento de De Vos *et al.* (1992), quienes indicaron que la formación de las fitoquelatinas requiere glutatión, y por ello, el aumento del contenido de las primeras significa una disminución del donador de electrones para la activación de peroxidasa y como consecuencia, la actividad peroxidasa se ve afectada negativamente.

Aparentemente el resultado es contradictorio pues se produjo un aumento enorme de la actividad peroxidasa en 400 μM . La respuesta sugiere que en esta concentración, el mecanismo de secuestro ya no es suficiente para reducir la cantidad de zinc en el citoplasma por lo tanto se incrementa la formación de los ROS y estas últimas se convierten en la señal de activación de la peroxidasa (Desikan *et al.* 2005).

De acuerdo con esta hipótesis, Wozny y Krzeslowska (1993, citado por Yurekli y Porgali, 2006) reportaron que la inducción de la actividad de peroxidasa es el resultado de la presencia de los iones metales libres, los cuales no pueden unirse con los ligandos orgánicos en la célula o no son evacuados a la vacuola. Además este resultado confirma el papel de la peroxidasa como un bioindicador útil para evaluar el estrés ambiental en la planta, ya que en esta concentración (400 μM de Zn) los otros indicadores tales como la conductividad y biomasa se corresponden con la actividad peroxidasa.

4. Contenido de proteínas solubles

En la **figura 4** se puede apreciar el contenido de proteínas solubles totales de las plántulas de *Agave fourcroydes* L. sembradas en diferentes concentraciones de metales pesados, donde a las concentraciones de 50 μM tanto para Cu como para Zn y en 100 μM de Cu, no se observaron diferencias entre ellas y estos tratamientos y el control; sin embargo, a la concentración más elevada (400 μM) para ambos metales se cuantificó el mayor contenido de proteínas totales, valor que no los diferenció pero fueron superiores estadísticamente al resto de los tratamientos.

Se conoce que tanto el Cu como el Zn son microelementos que favorecen la síntesis de proteínas. El Cu forma parte de ciertas enzimas oxido-reductoras y la deficiencia de este reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, el Zn es un componente de enzimas deshidrogenasas, aunque el mayor efecto de este elemento se relaciona con la producción de la auxina ácido indol acético (AIA), fitorregulador natural que tiene muchos y variados efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Azcon-Bieto y Talón, 2002).

Existen trabajos donde se plantea que las condiciones de estrés ambiental afectan adversamente al metabolismo normal de la planta (Bouazizi *et al.*, 2007; Vassilev *et al.*, 2007) y una de sus consecuencias es la reducción del contenido de proteínas totales. Esta reducción se debe a un decremento de su síntesis o a un aumento en su hidrólisis (Perezmolphebalch *et al.*, 1996). Por ejemplo, Bouazizi *et al.* (2007) encontraron una reducción significativa de contenido de proteínas cuando las plantas de maíz se sometieron a estrés con cobre. Vassilev *et al.* (2007) indicaron un decrecimiento del contenido de proteínas en *Salix* cuando estas plantas crecieron en condiciones estresantes por zinc.

Por el contrario, hay pocos trabajos que reportan un incremento del contenido de proteínas en la plantas bajo condición de estrés ambiental, y en los que se reporta, por ejemplo en el caso de la germinación de semillas bajo estrés salino o de humedad, indican que el incremento es aparente a nivel de proteínas en endospermos bajo condición de estrés y que no es el resultado de un aumento de síntesis de proteína (Dubey y Rani, 1990); o en caso de estrés de metales pesados

se obtuvo un incremento en contenido de proteínas pero solamente en la concentración baja de metal, pero disminuye al aumentar la concentración (Hu *et al.* 2007).

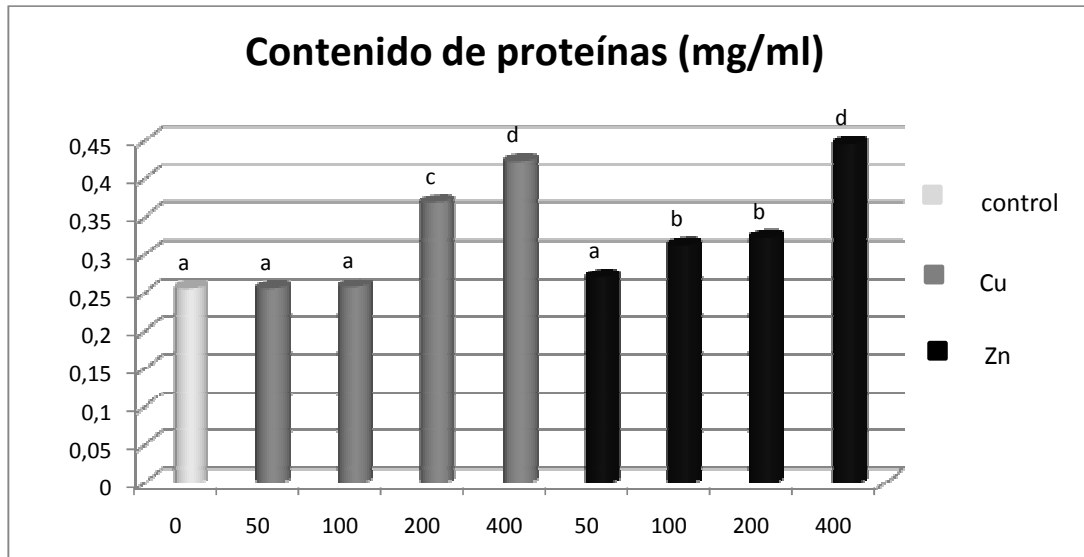


Figura 4: Contenido de proteínas solubles en función de la concentración de Cobre y Zinc presente en medios de cultivo en plantas de henequén sembradas durante 30 días. Cada columna representa el valor promedio de 5 plántulas por tratamiento. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según Dócima de Comparación de Duncan ($\alpha=0.05$)

Según los planteamientos previos, el resultado de este trabajo es contradictorio pues se produce un incremento significativo del contenido de proteínas solubles totales con el incremento de la concentración de los metales en estudio. Sin embargo, esta diferencia se puede explicar pues la reacción de las plantas ante una determinada condición ambiental es diferente entre especies y variedades (Meharg, 1993) lo que justifica la diversidad biológica y el efecto del proceso evolutivo.

Las plantas no siempre son capaces de expresar completamente y de forma idéntica o similar, su potencialidad genética para la producción de metabolitos cuando son sometidas a diferentes condiciones de estrés (Ziegler, 1990). En el caso de *Agave fourcroydes* L. se sugiere que el aumento de contenido de proteínas es el resultado de un incremento de su síntesis, específicamente de nuevas proteínas

inducidas por exceso de cobre y/o zinc, y que esta respuesta podría ser uno de los mecanismos de tolerancia a metales pesados en plántulas de esta especie.

Este planteamiento se basa en que las condiciones ambientales estresantes causan importantes modificaciones de expresión genética (Vierling, 1991). Estas pueden conducir la acumulación o la reducción de metabolitos, alteraciones en el comportamiento de muchas enzimas, cambios en la síntesis de proteínas y síntesis de nuevas proteínas, las cuales son específicas para cada tipo particular de estrés y posiblemente contribuyen al aumento de nivel de supervivencia de las plantas (Dubey, 1999).

Una de las posibles nuevas proteínas sintetizadas con la presencia de metales pesados en *Agave fourcroydes* L. pudiera ser la fitoquelatina. Este compuesto constituye un polipéptido rico en ligando metal-cisteína, cuya síntesis es inducida en presencia de elevadas concentraciones de metales pesados (Shah y Dubey, 1998).

De acuerdo con este planteamiento, De Vos *et al.* (1992) señalaron que las fitoquelatinas son los principales y no únicos compuestos ricos en tiol, inducidos en plantas expuestas a metales pesados. Según Rausser (1990) y Salt *et al.* (1989), las fitoquelatinas representan un mecanismo importante de tolerancia muy extendido en la filogenia.

Los metales pesados pierden su toxicidad al ser quelados con fitoquelatinas y es casi seguro que los átomos de azufre de la cisteína son esenciales para unirse a los metales (Dubey, 1999). Salisbury y Ross (1994) plantearon que la formación de fitoquelatinas representa una verdadera respuesta adaptativa a un estrés ambiental, según ellos, en el caso específico del cobre y el zinc, la producción de fitoquelatinas en presencia de cantidades excesivas de estos metales se hace evidente.

Otra variante de nuevas proteínas sintetizadas en presencia de metales como el cobre y el zinc pueden ser las proteínas llamadas metalotioneínas. Estos compuestos proteicos actúan de forma semejante a las fitoquelatinas pero presentan una masa molecular mayor (Salisbury y Ross, 1994).

Según Guo *et al.* (2008), las metalotioneínas y las fitoquelatinas comprenden las dos clases mayores de “péptidos ligando-metal” encontrados en muchos organismos eucariotas. Autores como Zhou y Goldsbrough (1994); Roosens *et al.* (2004) señalaron que en muchas plantas incluidas *Arabidopsis*, arroz (*Oryza sativa*) y la hiperacumuladora de metal *Thlaspi caerulescens*, la expresión del gen de metalotioneínas es fuertemente inducida por tratamiento con cobre y en un menor grado por zinc y cadmium.

La expresión de los genes que codifican las metalotioneínas se han correlacionado íntimamente con la tolerancia a Cobre entre ecotipos de *Arabidopsis* y entre la población de *Silene vulgaris* y *Silene paradoxa* (Van Hoof *et al.*, 2001; Mengoni *et al.*, 2003).

La síntesis de nuevas proteínas transportadoras también puede ser la explicación del aumento en contenido de proteínas en nuestro resultado. Según Küpper *et al.* (2004) la tolerancia a los metales pesados debe ser mediante el bombeo activo del metal a su sitio de almacenamiento, logrado por un incremento de la expresión de proteínas transportadoras en las hoja de las plantas.

Shah y Dubey (1998) plantearon que cuando las plantas crecen en presencia de metales pesados, la síntesis de muchas proteínas, cuyo peso molecular es más alto que las fitoquelatinas también se hace evidente. Por ejemplo, un complejo de la raíz de lupino expuesto a cobre mostró un incremento en la acumulación del polipéptido de 16-kDa (Przymusinski *et al.*, 1995). También se conoce el estímulo de la síntesis de proteínas para restablecer los daños a la membrana a través del incremento de las proteínas de choque térmico.

De lo anterior discutido se evidencia que la función principal de las nuevas proteínas mencionadas es ligarse a los metales pesados por el enlace a grupos sulfidrilos, de esta manera los iones quedan inmersos en una interacción química que los mantiene en equilibrio electrónico perdiendo su toxicidad.

En general, es posible que *Agave fourcroydes* L. presente mecanismos de tolerancia al cobre y el zinc semejantes a los descritos para las especies tolerantes, con el objetivo de impedir la intervención de los mismos en el metabolismo.

5. Contenido de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores

Los azúcares son considerados compuestos muy importantes del metabolismo de las plantas, no solo porque son los primeros complejos orgánicos producidos como resultado de la fotosíntesis, sino que aportan la mayor fuente de energía respiratoria y se emplean en la protección contra heridas, infecciones, etc.

La cantidad de azúcares reductores, azúcares no reductores más polisacáridos, carbohidratos totales y porcentaje de azúcares reductores según carbohidratos solubles totales se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3: Efecto de diferentes concentraciones de metales pesados en el metabolismo del carbono. Cada valor representa el promedio de 5 plántulas por tratamiento. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según Dócima de Comparación Student-Newman-Kewls (SNK). ($\alpha=0.05$). Los datos de porcentaje se transformaron según la fórmula $\log_{10} \%$.

Tratamientos	Concentración μM	Azúcares reductores. $\mu\text{g/ml}$	Azúcares no reductores y polisacáridos	Carbohidratos totales $\mu\text{g/ml}$	% de Azúcares reductores según carbohidratos totales
Control	0	39,7 e	47,3 f	87 e	45,63 b
Cobre	50	34,8 f	66,2 d	101 d	34,45 d
	100	53,6 d	75,4 c	129 c	41,55 bc
	200	116,2 b	119,8 b	236 b	49,23 a
	400	165,1 a	169,9 a	335 a	49,25 a
Zinc	50	34,2 f	55,8 e	90 de	38,00 c
	100	53,2 d	72,8 c	126 c	42,22 bc
	200	97,2 c	120,8 b	218 b	44,58 b
	400	168,9 a	153,1 a	322 a	52,45 a

Todas las porciones de carbohidratos evaluadas se incrementaron con relación al aumento de las concentraciones de los metales pesados (tanto Cu como Zn), sin embargo el contenido de azúcares reductores y porcentaje de azúcares reductores según carbohidratos totales presentaron una disminución significativa con relación al control, en la concentración de 50 μM .

Este resultado puede ser la consecuencia de un mayor consumo de los azúcares reductores lo que favorece un mayor crecimiento, para ambos metales a esa concentración, o una menor actividad de las enzimas amilolíticas.

El incremento de azúcares indican una mayor actividad de la enzima amilolítica por la presencia de concentraciones elevadas de Cu y Zn. Mohamed (1986) sugirió que la acumulación de azúcares reductores en hojas de plantas de tomate se debió a la presencia de metales pesados como Mn, Zn y Fe, los que estimularon la actividad amilolítica y como resultado condujo a un incremento de azúcares solubles más que de polisacáridos.

De manera similar se ha reportado una fuerte correlación entre la acumulación de azúcares y la tolerancia al estrés en numerosas plantas incluyendo experimentos con transgénicos (Taji *et al.*, 2002; Parida *et al.*, 2002).

Numerosos estudios fisiológicos han sugerido que bajo condiciones de estrés los carbohidratos no estructurales (sacarosa, hexosas y polioles) se acumulan aunque con variaciones en dependencia de la especie (Bartels y Sunkar, 2005).

La hipótesis actual sobre la función protectora de los azúcares en las plantas sometidas a estreses abióticos incluye aspectos tales como:

- Protección a macromoléculas y estabilización de estructuras membranosas (Bartels y Sunkar, 2005).
- Reducción de procesos de fusión de membranas a partir de la interacción entre los grupos polares de los azúcares con las cabezas hidrofílicas de los lípidos de membrana (Bartels y Sunkar, 2005).
- Ajuste osmótico (Parvaiz y Satyawati, 2008).
- Reservorio de carbono (Parvaiz y Satyawati, 2008).
- Eliminación de radicales libres (Parvaiz y Satyawati, 2008).

Liu *et al.* (2004) han referido que el estrés abiótico reduce las concentraciones de sacarosa y almidón en las hojas, pero incrementa la concentración de hexosas. Trouvirie *et al.* (2003) y Bartels y Sunkar (2005) reportaron que la acumulación de

azúcares simples como glucosa y fructosa está dada a un incremento en la actividad de enzimas hidrolíticas como la α y β amilasas, hechos que fueron corroborados por (Zeid, 2004).

Existen trabajos que indican que el incremento de la conductividad favorece la pérdida de potasio, sin embargo, a pesar de que en las concentraciones más altas se observaron las mayores lecturas de conductividad, no deben haber inducido tal pérdida, de lo contrario sería imposible explicar los valores obtenidos, significativamente superiores al control, de concentración de carbohidratos y proteínas a las mayores concentraciones de Cu y Zn. Según Ascón-Bieto y Talón (2002) la insuficiencia de K^+ en la nutrición de los vegetales induce inhibición en la síntesis de proteínas y disminución de la producción de carbohidratos.

Al analizar los resultados en conjunto se aprecia que las concentraciones de metales pesados empleadas no afectaron severamente el metabolismo del henequén, pues no se observó en ningún tratamiento ni clorosis ni necrosis, lo que sugiere la activación de un grupo de mecanismos que favorecen su tolerancia a las posibles condiciones adversas.

El incremento de la síntesis de compuestos carbonados, estimulados por la presencia de metales pesados indica que este cultivo eleva la fijación y asimilación de CO_2 bajo estas condiciones adversas, al mismo tiempo se evidencia el papel protector de esta especie sobre el medio ambiente al contribuir a la reducción de uno de los gases de efecto de invernadero.

Por último se hace necesario tener en cuenta, que *Agave fourcroydes* L. es una planta CAM en la cual, la producción de ácido orgánico (ácido málico) es muy elevada (Lehninger, 1988). Este ácido posee la capacidad de ligarse con los metales pesados a través de los enlaces débiles de oxígeno. (Küpper *et al.* 2009) plantearon que este tipo de enlace es esencial en la tolerancia de las plantas hiperacumuladoras de metales pesados.

Wang *et al.* (2002) y Küpper *et al.* (2004) indicaron que en las plantas hiperacumuladoras de metales pesados casi todos estos son ligados por ácidos orgánicos, los cuales se encuentran comúnmente en vacuola. Además de los

posibles mecanismos de tolerancia a los metales pesados mencionados durante toda la discusión del trabajo, *Agave fourcroydes* L. posee este recurso que evidencia la estabilidad de su metabolismo a altas concentraciones de zinc y cobre, y por lo tanto, podría significar uno de los mecanismo que justifican la tolerancia a metales pesados.

CONCLUSIONES

- Se concluye que las concentraciones de metales pesados empleadas no afectaron severamente el metabolismo de las plantas lo que sugiere la tolerancia de estas, dada la activación de posibles mecanismos que sustentan esta respuesta.
- El incremento de la biomasa fresca se estimuló por encima del control a la concentración de 50 μM para ambos metales (108 % para Cu y 109 para Zn), sin embargo se produjo disminución del incremento, a concentraciones superiores a 200 μM , el cual fue inferior al 50% del control.
- El contenido de carbohidratos solubles totales y de azúcares reductores se elevó en proporción con el incremento de las concentraciones de metales pesados, así como la síntesis de proteínas solubles y la conductividad eléctrica.
- La respuesta de la actividad catalasa y peroxidasa por la acción del Cobre se diferencia de la del Zinc y dentro del mismo metal tendió a la diferencia, a pesar de ello la actividad de ambas enzimas contribuyeron a contrarrestar la acción oxidativa inducida por ambos metales.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el empleo de mayores concentraciones de estos y de otros metales pesados.
- Plantar posturas de henequén en condiciones de suelos contaminados por metales pesados.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS, G.; KHAN, M.Q.; JAMIL, M.; TAHIR, M.; HUSSAIN, F. 2009. Nutrient uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum*) as affected by zinc application rates. *Int. J. Agric. Biol.* **11**: 389–396
2. ABREU E.; G. GONZALEZ; P. RODRÍGUEZ; R. DOMECH Y M. GARRIGA. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes*) durante fase de aclimatización. ITEA- Producción Vegetal 103 (2) 65-75.
3. AIPEUC-PS. 2006. Perú: la contaminación ambiental en Oroya. Biodiversidad en América Latina y El Caribe. [en línea] noviembre, 2006. Disponible en : <http://www.biodiversidadla.org> [Consulta abril, 22, 2010]
4. ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science* **82(10)**: 1227-1238.
5. ASCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. 2002. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid.
6. AUDA, M.A.; ALI, E.E.S. 2010. Cadmium and zinc toxicity effects on growth and mineral nutrients of carrot (*Daucus carota*). *Pak. J. Bot.* **42(1)**: 341-351
7. AVIÑÓ, J.P.N.; ALONSO, I.A.; LÓPEZ-MOYA, J.R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* **16 (2)**: 10-25, mayo.
8. BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. (2003) Phytoremediation: Principles and perspectives. *Contributions to Science* **2(3)**: 333-344.
9. BARTELS, D.; SUNKAR, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1): 23-58.
10. BERNAL, M.; RAMIRO, M.V.; CASES, R.; PICOREL, R.; YRUELA, I. 2006. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiologia Plantarum.* **127**: 312–325

11. BERTI, W.R.; CUNNINGHAM, S.D. 2000. Phytostabilization of metals. En: I. Raskin and B.D. Ensley (ed.) Phytoremediation of toxic metals - using plants to clean-up the environment. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 71-88.
12. BETANCUR, L.M.A.; MAZO, K.I.M.; MENDOZA, A.J.S. 2005. Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Lasallista de Investigación* **2(1)**: 57-60.
13. BOUAZIZI, H.; JOUILI, H.; FERJANI, E.E. 2007. Effects of copper excess on growth, H₂O₂ production and peroxidase activities in maize seedlings (*Zea mays* L.) *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **10(5)**: 751-756.
14. BRADFORD, M-M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
15. BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I.; LUX, A. 2007. Zinc in plant. *New Phytol.* **173**: 677–702
16. BURZYŃSKI, M.; KOLANO, E. 2003. *In vivo* and *in vitro* effects of copper and cadmium on the plasma membrane H⁺-ATPase from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots. *Acta Physiologiae Plantarum*. **25**: 39–45.
17. CASIERRA-POSADA, F.; POVEDA, J. 2005. La toxicidad por exceso de Mn y Zn disminuye la producción de materia seca, los pigmentos foliares y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). *Agronomía Colombiana*. **23(2)**: 283-289
18. CHABALINA, L.; GONZALEZ, J.B. 2000. Contaminación marina en bahías y zonas costeras de cuba y del gran caribe. *Centro de Ingeniería y manejo Ambiental de Bahías y Costas*. [en línea] noviembre, 2006. Disponible en : <http://www.biodiversidadla.org> [**Consulta abril, 22, 2010**]
19. CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; EL FERJANI, E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme actitities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant science*. **127**: 139-147

20. CHEN, L.M.; LIN, C.C.; KAO, H.C. 2000. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level in cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **41**: 99 – 103.
21. CLEMENS, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486.
22. COBBETT, C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 211-216.
23. CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* **110(3)**: 715-719.
24. CVETANOVSKA, L.; SPASENOSKI, M. 2000. Effect of various zinc concentrations on some morphological parameters at tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) *Ekol. Zašt. Život. Sred.* **7(1-2)**: 61-66, enero
25. DE VOS, C.H.R.; VONK, M.J; VOOIJS, R.; SCHAT, H. 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* **98**: 853-858
26. DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; NEILL, S. 2005. Reactive oxygen species as signalling molecules. En: SMIRNOFF, N. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing. Oxford. p. 169-196
27. DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. En: Prasad, M.N.V.; Hagemeyer, J. editors. *Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems*. Berlin: Springer; p. 99–116.
28. DIETZ, K- J; BAIER, M.; KRÄMER, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En: Prasad, M.N.V.; Hagemeyer, J, eds. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, 73-97
29. DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM. R. 2000. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of experimental botany*. **52(358)**: 1101-1109, mayo.

30. DRAOBZKIEWICZ, M.; SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* **17**: 379–387.
31. DUBE, B. K.; SINHA, P.; GOPAL, R.; CHATTERJEE, C. 2003. Modulation of radish metabolism by zinc phytotoxicity. *Indian Journal of Plant Physiology* **8(3)**: 302-306.
32. DUBEY, R.S. 1999. Protein synthesis by plants under stress. En: Pessarakli, M. *Handbook of plant and crop stress*. New York. Marcel Dekker. p. 365- 397
33. DUBEY, R.S.; RANI, M. 1990. Influence of NaCl salinity on the behaviour of protease, aminopeptidase and carboxypeptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance. *Aust J Plant Physiol.* **17**:215–221,
34. DUSHENKOV, S.; KAPULNIK, Y. 2000. Phytoremediation of metals. En: I. Raskin and B.D. Ensley (ed.) *Phytoremediation of toxic metals - using plants to clean-up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York. . p. 89-106.
35. EBBS, S.D.; KOCHIAN, L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to *Brassica species*. Implications to phytoremediation. *J. Environm. Qual.* **26**: 776-781.
36. ENSLEY, B.D. 2000. Rational for use of phytoremediation. En: I. Raskin and B.D. Ensley (ed.) *Phytoremediation of toxic metals - using plants to clean-up the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 3-12
37. Environment News Service (ENS), (October 18, 2006), New York.
38. ERNST, W. H. O.; VERKLEIJ, J. A. C.; SCHAT, H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* **41 (3)**: 229-248.
39. FANG, W-C.; KAO, C.H. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science.* **158**: 71–76
40. FEIERABEND, J. 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. En SMIRNOFF, N. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing. Oxford. p. 101-140

41. FODOR, E.; SZABO-NAGY, A.; ERDEI, L. 1995. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology*. **147**: 87–92.
42. GADE, L.H. 2000. Highly polar metal—metal bonds in “early-late” heterodimetallic complexes. *Angewandte Chemie-International Edition*. **39(15)**:2658–2678
43. GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant science*. **121**: 151-159
44. GÁLVEZ, A.P.M. 2003. Fitorremediación de los suelos contaminados con metales pesados. México. 111h. Tesis (en opción al título de Master en Biotecnología) -- Universidad de las Américas Puebla, México.
45. GAO, S.; LI, Q.; OU-YANG, C.; CHEN, L.; WANG, S.; CHEN, F. 2009. Lead toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. radicles. *Fresenius Environ. Bull.* **5**: 811–815
46. GAO, S.; YAN, R.; CAO, M.; YANG, W.; WANG, S.; CHEN, F. 2008. Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant Soil Environ.* **54 (3)**: 117–122
47. GARBISU, C.; ALKORTA, I. 2001. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Review paper: Bioresource Technol.* **77(3)**: 229-236
48. GARCÍA, I.; DORRONSORO, C. Contaminación por metales pesados. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada (España) [en línea] junio, 2002. Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/> [**Consulta: noviembre, 15, 2008**]
49. GHOSH, M.; SINGH, S.P. 2005 A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products. *Applied ecology and environmental research* **3(1)**: 1-18.

50. GISBERT, C.; ROS, R.; DE HARO, A.; WALTER, D.J.; PILAR BERNAL, M.; SERRANO, R.; AVIÑO, J.N. 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem Biophys Res Commun.* **303(2)**:440–445
51. GUNSÉ, B.; GARZÓN, T.; BARCELÓ, J. 1997. Study of aluminium toxicity by means of vital staining profiles in four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **160(12)**: 1447-1450.
52. GUO, W.; MEETAM, M.; GOLDSBROUGH P.B. 2008. Examining the Specific Contributions of Individual Arabidopsis Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance. *Plant Physiology.* **146**: 1697-1706, abril.
53. HALL, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53(336)**: 1-11
54. HAMLIN, R.L. s.f. Phytoremediation literature review. [en línea]. Disponible en: <http://www.umass.edu/umext/soilsandplant/PDF%20Files/Barker%20PDF/Phytoremediation%20PDF/PhytoLitReview.pdf> [Consulta: noviembre, 15, 2008]
55. HARMS, K.; WOHNER, R.V.; SCHULZ, B.; FROMMER, W.B. 1994. Isolation and characterization of P-type H⁺-ATPase genes from potato. *Plant Molecular Biology.* **26**: 978–988.
56. HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. 1987. Biochemical and developmental characterisation of multiple form of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* **84**: 450-455.
57. HU, C.; ZHANG, L.; HAMILTON, D.; ZHOU, W.; YANG, T.; ZHU, D. 2007. Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* Mart. *Hydrobiologia* **579**: 211-218
58. JADIA, C.D; FULEKAR, M.H. 2009. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African Journal of Biotechnology.* **8 (6)**: 921-928, marzo.
59. JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; CHANDRA, A. 2010. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient

- accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.) *Acta Physiologiae Plantarum*, marzo.
60. JANICKA-RUSSAK, M.; KABALA, K.; BURZYŃSKI, M.; KLOBUS G. 2008. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. *Journal of Experimental Botany*. **59(13)**: 3721–3728, octubre.
61. JENTSCHKE, G.; GODBOLD, D.L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia plantarum* **109**: 107-116.
62. KHURANA, N.; CHATTERJEE, C. 2001. Influence of variable zinc on yield, oil content, and physiology of sunflower. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. **32(19 & 20)**: 3023 – 3030, diciembre.
63. KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. 1952. Use of ranks in one criterion analysis of variance. *J. Amer. Statis. Assoc.* 47: 583-621.
64. KÜPPER, H.; GÖTZ, B.; MIJOVILOVICH, A.; KÜPPER, C.F.; MEYER-KLAUCKE, W. 2009. Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation, and toxicity in *Crassula helmsii* as a new copper accumulator. *Plant Physiology*. **151**: 702–714, octubre.
65. KÜPPER, H.; MIJOVILOVICH, A.; MEYER-KLAUCKE, W.; KRONECK, P.M.H. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by x-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol* **134**: 748–757
66. KÜPPER, H.; ŠETLIK I.; ŠETLIKOVÁ, E.; FERIMAZOVA, N.; SPILLER, M.; KÜPPER, F.C. 2003. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedemus quadricauda*. *Funct Plant Biol.* **30**: 1187–1196
67. KUREK, E.; BOLLAG, J.M. 2004. Microbial immobilization of cadmium released from CdO in the soil. *Biogeochemistry*. **69(2)**:227–239.

68. LÁZARO, J.D.; KIDD, P.; MONTERROSO, C. 2002. Biodisponibilidad de metales en suelos y acumulación en plantas en el área de tras-os-montes (Ne Portugal): Influencia del material original. *Edafología* **9(3)**: 313-328.
69. LEHNINGER, A.L. 1988. Ruta C₄ o de Hatch-Slack de formación de la glucosa. En su: Bioquímica, tomo II. Ciudad de La Habana – Cuba. Editorial Revolucionaria. p. 649-651
70. LI, M.S. 2006. Ecological restoration of mineland with particular reference to the metalliferous mine wasteland in China: A review of research and practice. *Sci. Total Environ.* **357**: 38–53
71. LIU, F., JENSEN, CH.R.; ANDERSEN, M.N. 2004. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research.* **86**: 1-13.
72. LIU, Y. 2006. Shrinking Arable Lands Jeopardizing China's Food Security. [en línea] 2006. Disponible en: <http://http://www.worldwatch.org/node/3912>. [Consulta: mayo, 15, 2010]
73. LOMBARDI, L.; SEBASTIANI, L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science.* **168**: 797–802
74. LONE, M.I.; HE, Z.; STOFFELLA, P.J.; YANG, X. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B.* **9(3)**: 210-220, marzo.
75. LUO, Z-B.; HE, X-J.; CHEN, L.; TANG, L.; GAO, S.; CHEN, F. 2010. Effects of Zinc on Growth and Antioxidant Responses in *Jatropha curcas* Seedlings. *Int. J. Agric. Biol.* **12 (1)**: 119-124.
76. Mac FARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin* **42**: 233–240.

77. MASHOUDI, S.; CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; AND FERJANI, E.E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Sci.* **127**: 129-137.
78. McGRATH, S.P.; ZHAO, F.J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* **14**:277-282.
79. McGRATH, S.P.; ZHAO, F.J.; LOMBI, E. 2001. Plant and rhizosphere process involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant Soil.* **232(1-2)**:207–214
80. McKEEHAN, P. 2000. Brownfields: The Financial, Legislative and Social Aspects of the Redevelopment of Contaminated Commercial and Industrial Properties [en línea] junio, 2000. Disponible en: <http://md3.csa.com/discoveryguide/brown/overview.php?SID=05c43ivvp4r0detrha3d9r5g>). [Consulta: mayo, 15, 2010]
81. MEHARG, A.A. 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum.* **88**: 191- 198
82. MENG, Q.; ZOU, J.; ZOU, J.; JIANG, W.; LIU, D. 2007. Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica.* **49(1)**: 95–101.
83. MENGONI, A.; GONNELLI, C.; HAKVOORT, H.W.J.; GALARDI, F.; BAZZICALUPO, M.; GABBRIELLI, R.; SCHAT, H. 2003. Evolution of copper-tolerance and increased expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. populations. *Plant Soil.* **257**: 451–457
84. MISHRA, P.K.; PRAKASH, V. 2009. Antioxidant modulation in response to zinc induced oxidative stress at different pH in *Glycine max* L. cv. Merrill. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* **6 (4)**: 485-493
85. MITLER, R.; POULOS, T.L. 2005. Ascorbate peroxidase. En: SMIRNOFF, N. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing. Oxford. p. 86-100.

86. MOHAMED, S.I. 1986. Growth and yield of tomato and squash in soil treated with Mn. *Hort. Sci.* **29**: 723-730.
87. NRIAGU, J.O. 1996. Toxic metal Pollution in Africa. *Science*. p. 223: 272.
88. PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; DAS, P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* **45**: 28–36.
89. PARVAIZ, A.; SATYAWATI, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *PLANT SOIL ENVIRON.* **54 (3)**: 89–99.
90. PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**: 255–265
91. PÄTSIKKÄ, E.; ARO, E-M.; TYYSTJÄRVI, E. 1998. Increase in the Quantum Yield of Photoinhibition Contributes to Copper Toxicity in Vivo. *Plant Physiol* **177(2)**: 619-627
92. PÄTSIKKÄ, E.; ARO, E-M.; TYYSTJÄRVI, E. 2001. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. *Physiol Plant.* **113**: 142-150.
93. PÄTSIKKÄ, E.; KAIRAVUO, M.; ŠERŠE, F.; ARO, E-M.; TYYSTJÄRVI, E. 2002. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol.* **129**: 1359–1367.
94. PENG, H.; YANG, X.; TIAN, S. 2005. Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. *Journal of Zhejiang University Science* **6(5)**: 311-318
95. PEREZMOLPHEBALCH, E.; GIDEKEL, M.; SEGURANIETO, M.; HERRERAESTRELLA, L.; OCHOAALEJO, N. 1996. Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different levels of drought tolerance. *Physiol Plant.* **92**: 284–290

96. PEUKE, A.D.; RENNENBERG, H. 2005. Phytoremediation Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. *EMBO reports*. **6 (6)**: 497-501
97. PRASAD, K.V.S.K.; PARADHA SARADHI, P.; SHARMILA, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot.* **42**: 1–10, agosto.
98. PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H.M.O. 2003. Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6(3)**: 286-321
99. PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; GWOZDZ, E.A. 1995. The stress-stimulated 16 kDa polypeptide from lupin roots has properties of cytosolic Cu-Zn-superoxide dismutase. *Environ Exp Bot.* **35**: 485–495
100. QIAN, M.; LI X.; SHEN, Z. 2005. Adaptive copper tolerance in *Elsholtzia haichowensis* involves production of Cu induced thiol. *Journal Plant Growth Regulation* **47(1)**: 65-73
101. QUARITI, O.; BOUSSAMA, N.; ZARROUK, M.; CHERIF, A.; GHORBAL, M.H. 1997. Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*. **45**: 1343–1350.
102. QUARTACCI, M.F.; COSI, E.; NAVARI-IZZO, F. 2001. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *Journal of Experimental Botany*. **52(354)**: 77-84, enero.
103. QUARTACCI, M.F.; PINZINO, C.; SGHERRI, C.L.M.; DALLA VECCHIA, F.; NAVARI-IZZO, F. 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia plantarum*. **108**: 87-93
104. RAGNARSDOTTIR, K.V.; HAWKINS, D. 2005. Trace metals in soils and their relationship with scrapie occurrence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **69(10)**:A196–A196.

105. RAUSER, W.E. 1990. Phytochelatin. *Annual Review of Biochemistry*. **59**: 61-86.
106. RAVEN, E.L. 2003. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases; what can we learn from ascorbate peroxidase? *Natural Product Reports*. **20**: 367–381.
107. RAVEN, J.A.; EVANS, M.C.W.; KORB, R.E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* **60**:111-149.
108. ROBERT, M.L.; HERRERA-HERRERA, J.L.; CHAN-RODRIGUEZ, F. 1992. Contreras, Micropropagation of *Agave spp.* En: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. **19**: 306-329.
109. ROOSENS, N.H.; BERNARD, C.; LEPLAE, R.; VERBRUGGEN, N. 2004. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett.* **577**: 9–16
110. ROS, R.; COOKE, D.T.; MARTINEZ-CORTINA, C.; PICAZO, I. 1992. Nickel and cadmium related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) shoots. *Journal of Experimental Botany*. **43**: 1475–1481.
111. ROUT, G.R.; DAS, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agron.* **23**: 3–11
112. SALISBURY F.B.; ROSS C.W. 1994. Toxicidad y resistencia a metales. En su *Fisiología vegetal*. México. Grupos Editoriales Iberoamérica, S.A. de C.V. p.138
113. SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **49**: 643-668.
114. SALT, D.E.; THURMAN, D.A.; TOMSETT, A.B.; SEWELL, A.K. 1989. Copper phytochelatin of *Mimulus guttatus*. *Proc R Soc Lond.* **236**: 79-89

115. SANTOS-DIAZ, M.S.; BARRÓN-CRUZ, M.C.; ALFARO-DE LA TORRE, M.C. 2007. Induction of *in vitro* roots cultures of *Thypha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. *Electronic Journal of Biotechnology*. **10(3)**: 417-424, julio.
116. SCHAT, H.; LLUGANY, M.; BERNHARD, R. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes
117. SCHMIDT, U. 2003. Enhancing phytoremediation: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J Environ Qual*. **32**:1939–1954
118. SHAH, K.; DUBEY, R.S. 1998. A 18 kDa cadmium inducible protein complex: its isolation and characterization from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *J Plant Physiol* **152**: 448–454
119. SIGARROA, A. 1985. Biometría y Diseño Experimental. La Habana. Editorial Pueblo y Educación, p. 743
120. STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. 2002. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Braz. J. Plant Physiol*. 14 (2): agosto
121. SUMNER, J.B. 1921. Dinitrozalicylic acid: a reagent for the estimation of suger in normal and diabetic. *J. Biol. Chem*. **47**: 5-9
122. TAJI, T.; OHSUMI, C.; IUCHI, S.; SEKI, M.; KASUGA, M.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. 2002. Important roles of drought- and coldinducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsisthaliana*. *Plant J*. **29**: 417–426
123. TROUVERIE, J., THE'VENOT, C., ROCHER, J.P., SOTTA, B. AND PRIOUL, J.L. 2003. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf, *J. Exp. Bot.*, 54: 2177-2186.

124. VAN ASSCHE, F.; CLIJSTER, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**: 195-206.
125. VAN HOOFF, N.A.L.M.; HASSINEN, V.H.; HAKVOORT, H.W.J.; BALLINTIJN, K.F.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C.; ERNST, W.H.O.; KARENLAMPI, S.O.; TERVAHAUTA, A.I. 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* **126**: 1519–1526
126. VARGAS, D.G. 2006. Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo. Barcelona 131 h. Tesis (en opción a título de Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad Autónoma de Barcelona.
127. VASSILEV, A.; LIDON, F.; RAMALHO, J.C.; DO CÉU MATOS, M.; DA GRACA; M. 2003. Effects of excess Cu on growth and photosynthesis of Barley plants. Implication with a screening test for Cu tolerance. *Journal of Central European Agriculture* **4(3)**: 225-236.
128. VASSILEV, A.; LIDON, F.; SCOTTI CAMPOS, P.; RAMALHO, J.C.; BARREIRO, M.G.; YORDANOV, I. 2003. Cu-induced changes in chloroplast lipids and photosystem 2 activity in Barley plants. *Bulg. J. Plant Physiol* **29(1-2)**: 33-43.
129. VASSILEV, A.; PEREZ-SANZ, A.; CUYERS, A.; VANGRONSVELD, J. 2007. Tolerance of two hydroponically grown *Salix* genotypes to excess zinc. *Journal of Plant Nutrition.* **30(9)**: 1471-1482.
130. VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. 1991. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **42**: 579–620
131. WANG, C.; ZHANG, S.H.; WANG, P.F.; HOU, J.; ZHANG, W.J.; LI, W.; LIN, Z.P. 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere.* **75(11)**:1468-76, marzo.

132. WANG, J.; ZHAO, F.J.; MEHARG, A.A.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MCGRATH, S.P. 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*: uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.* **130**: 1552–1561
133. WANG, S.H.; YANG, Z.M.; YANG, H.; LU, B.; LI, S.Q.; LU, Y.P. 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica Juncea* L. *Bot. Bull. Acad. Sin* **45**: 203-212
134. WATSON, C.; RULFORD, I.D.; RIDDELL-BLACK, D. 2003. Screening of willow species for resistance to heavy metals: comparison of performance in a hydroponics system and field trials. *Int. J. Phytorem.* **5** (4): 361-365.
135. WILLIAMS, G.M. 1988. Land Disposal of Hazardous waste. *Engineering and Environmental issues* 37-48.
136. YANG, H.M.; ZHANG, X.Y; WANG, G.X. 2004. Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. *J. Plant Physiol.* **51(4)**: 464-468.
137. YRUELA, I. 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* **17(1)**: 145-156.
138. YRUELA, I.; ALFONSO, M.; ORTIZ DE ZARATE, I.; MONTOYA, G.; PICOES, R. 1993. Precise location of the Cu-inhibitory binding site in higher plant and bacterial photosynthetic reaction centers as probed by light-induced absorption changes. *J Biol Chem.* **268**: 1684–1689
139. YUREKLI, F.; PORGALI, B.Z. 2006. The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica.* **48(2)**: 7–13.
140. YURI, J.A.; ALVARO SEPÚLVEDA, L.; NEIRA, A. E. 2009. Permeabilidad de membranas celulares en su: *Fisiología vegetal experimental. Guía teórico – práctico*. Chile. Universidad de Talca Facultad de Ciencias Agrarias. p. 11
141. ZEID, I.M. 2004. Response of Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Exogenous Putrescine Treatment under Salinity Stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* **7 (2)**: 219-225.

142. ZHOU, J.M.; GOLDSBROUGH, P.B. 1994. Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell*. **6**: 875–884.
143. ZIEGLER, H. 1990. Role of plant physiology in assessing productivity potential under stress environment. Proceedings of the International Congress of Plant Physiology'88, New Delhi. p.10 – 17.