

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS METALES PESADOS EN EL DESARROLLO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Canelo, Micaela – LU 1043087

Licenciatura en Biotecnología

Casella, María Franscina – LU 1045357

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Cámara, María de los Milagros, UADE

Colaborador/es:

Pérez, Adriana Alicia, UADE

Octubre 20, 2017



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Primero queremos agradecernos mutuamente, la paciencia, el compañerismo y los momentos vividos, de alegría y angustia.

A Mili por su gran apoyo, los consejos y la paciencia.

Finalmente, queremos agradecer a todos aquellos que formaron parte de este proyecto, tanto a los que nos acompañaron en la parte académica como en la parte emocional:

A Guille, Nacho, Pablo y Nati

A Fede Espinosa

A Santi y Juli

A Adriana Pérez

A la tía Negra

A Leandro Martínez Tosar

A Federico Prada

A nuestros compañeros universitarios

A la familia Casella

A la familia Canelo, especialmente a Juan

A Luciano y Facundo

A nuestros amigos de la vida

Resumen

Hoy en día la contaminación es un grave problema que se encuentra en todos los ámbitos. La contaminación con metales pesados es abundante y creciente. La misma es consecuencia de las industrias, del uso de productos y del tratamiento y deposición de los residuos urbanos e industriales. Las plantas pueden ser utilizadas para evaluar la toxicidad de los metales. En este proyecto se utilizó a *Arabidopsis thaliana* para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de distintos metales pesados (Ni^{+2} , Pb^{+2} y Cr^{+6}) en el desarrollo, crecimiento y morfología de las plantas.

Para ello, se estudió los efectos de los diferentes metales en las siguientes variables: proporción de germinación; cantidad de hojas a los 7 y 14 días post-germinación; longitud de la raíz principal y cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación y tiempo de floración. Además, se evaluó la morfología por microscopía electrónica de barrido.

Los resultados indican que los tres metales afectan el desarrollo de *A. thaliana*. Dependiendo del metal evaluado, se observó una disminución en la longitud de la raíz primaria, en el desarrollo del follaje y/o en la producción de raíces laterales. Sin embargo, no se observó en ninguno de los casos un efecto negativo en el tiempo de floración. Así mismo, ninguna de las micrografías demostró la presencia de cambios morfológicos en los tejidos observados. La toxicidad relativa de los metales analizados fue: $\text{Ni}^{+2} > \text{Cr}^{+6} > \text{Pb}^{+2}$. Este estudio permitió valorar la utilización de *A. thaliana* para bioensayos de toxicidad causada por metales y determinó que las variables: proporción de germinación, cantidad de hojas (14 días post-germinación) y longitud de raíz, son los marcadores más adecuados para evaluar la toxicidad por metales pesados.

Abstract

Nowadays, pollution is a serious problem affecting the entire world. The increasing and abundant heavy metal pollution is the result of industries, the use of products and the treatment and deposition of urban and industrial waste. Plants can be used to evaluate metal toxicity. In this project *Arabidopsis thaliana* was used to evaluate the effect of different heavy metals concentrations (Ni^{+2} , Pb^{+2} y Cr^{+6}) in the development, growth and morphology of those plants.

It was studied the effects of the selected metals in the following variables under different metals concentrations: germination, amount of leaves after germination (7 and 14 days); development and length of the main root, the number of secondary roots (14 days post-germination) and finally flowering time. Besides, morphology was also studied by scanning electron microscopy.

The results show that metals affect the development of *A. thaliana*. Depending on the evaluated metal, it was observed a decrease in the length of the main root, in the growth of foliage and/or the production of secondary roots. Nevertheless, it was not observed in any of the cases a negative effect in the flowering time. Likewise, any of the micrographs evidences the presence of morphological changes in the observed tissues. Taken together all the results, the relative toxicity of the analysed metals was: $\text{Ni}^{+2} > \text{Cr}^{+6} > \text{Pb}^{+2}$. This study made possible to evaluate the use of *A. thaliana* as a model organism for toxicity bioassays caused by metals and determined which variables are the most appropriate to evaluate heavy metal toxicity (germination proportion and amount of leaves and length of root at 14 days post-germination).

Contenidos

Estructura del informe	7
Introducción y objetivos	8
Objetivos.....	8
Relevancia del tema.....	8
<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo	10
Antecedentes	12
Ciclo de vida	13
Metales	17
Efectos de los metales pesados en el desarrollo de <i>A. thaliana</i>	19
Salinidad	24
Variables de estudio	25
Microscopía electrónica de barrido	30
Hipótesis	33
Metodología	34
Lugar de trabajo	34
Material biológico y condiciones de crecimiento.....	34
Análisis de las variables	39
Preparación y análisis de muestras mediante microscopio electrónico de barrido	41
Análisis estadístico	42
Tratamiento de los residuos.....	43
Resultados	44
Puesta a punto de las condiciones de cultivo de <i>A. thaliana</i>	44
Puesta a punto del protocolo de fijación para MEB.....	46
Puesta a punto de la técnica para la medición de raíces	47
Ensayo con sulfato de níquel (NiSO ₄)	48

Ensayo con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).....	63
Ensayo con cloruro de plomo ($PbCl_2$)	79
Discusión de los resultados	95
Bibliografía.....	104
Anexos.....	109

Estructura del informe

Este Proyecto final incluye varias secciones. La primera es la introducción donde se detalla el objetivo y sus objetivos específicos, así como también, la relevancia del tema en estudio. La siguiente sección, está dedicada a los antecedentes ya publicados sobre el tema. En el apartado hipótesis, se plantea el interrogante que buscamos validar con los resultados obtenidos. Seguidamente, se podrá encontrar el apartado de metodología, donde se describen los protocolos y técnicas experimentales empleadas. A continuación, se presentan los resultados y los análisis estadísticos; seguido de la discusión de los mismos y las conclusiones. Por último, en la sección bibliografía se citan los trabajos consultados para la realización de este proyecto.

Introducción y objetivos

Objetivos

Hoy en día la contaminación industrial, con metales pesados, es un grave problema a nivel mundial. La peligrosidad de estos reside en que no pueden ser degradados ni química ni biológicamente y, además, tienden a bioacumularse y biomagnificarse. Evaluar los efectos de la contaminación por metales pesados es necesario. Con el fin de evaluar los riesgos y el efecto de esta contaminación en el desarrollo de los cultivos nos planteamos el siguiente objetivo:

Evaluar el efecto de los metales pesados, plomo, cromo y níquel en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Para cumplir el objetivo, nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto del plomo, cromo y níquel en el proceso de germinación.
- Estudiar el efecto del plomo, cromo y níquel en la morfología del plantín mediante observación morfológica general y técnicas de microscopía electrónica de barrido.
- Estudiar el efecto del plomo, cromo y níquel en el proceso de floración de *A. thaliana*.

Relevancia del tema

Contaminación del agua

El volumen de agua utilizado por la industria es bajo: constituye menos de un 10% del total de extracciones de agua. Sin embargo la industria ejerce una acusada presión sobre los recursos hídricos, no tanto por la cantidad de agua consumida en la propia producción, sino más bien por los impactos derivados de los vertidos de aguas residuales y de su potencial contaminante.

Gran parte de las aguas residuales industriales se vierten sin tratamiento en los cursos de agua abiertos, lo cual reduce la calidad de grandes volúmenes de agua y, a veces, se

infiltran en los acuíferos y contaminan los recursos hídricos subterráneos. Más del 80% de las aguas residuales en los países en vías de desarrollo se descarga sin tratamiento, contaminando ríos, lagos y zonas costeras (www.unesco.org).

Entre los contaminantes más importantes del agua se encuentran microbios patógenos, nutrientes, sustancias que consumen el oxígeno del agua, metales pesados y materia orgánica persistente, así como sedimentos en suspensión y pesticidas, los cuales, en su mayoría, provienen de fuentes difusas (no localizadas). Generalmente, los contaminantes son la causa más importante de la pérdida de calidad del agua en todo el mundo (www.unesco.org).

Principales fuentes de contaminación

Las industrias que utilizan materias primas orgánicas son las principales contribuyentes a la contaminación orgánica, mientras que las industrias del petróleo, el acero y la minería representan el mayor riesgo en la liberación de metales pesados (www.unesco.org).

Los principales componentes de los efluentes según su origen son (www.cricyt.edu.ar/enciclopedia):

- Industria metalúrgica: metales tales como cobre, níquel, plomo, zinc, cromo, cobalto, cadmio; ácidos clorhídricos, sulfúricos y nítricos; detergentes.
- Industrias del cuero (curtiembres): cromo, sulfuros, compuestos nitrogenados, tinturas, microorganismos patógenos.
- Industria petroquímica: hidrocarburos, plomo, mercurio, aceites, derivados fenólicos y nafténicos, residuos semisólidos.
- Industrias químicas (en general): amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos, sales, metales pesados.

Principales conceptos

Se entiende por contaminación a la aparición de una nueva sustancia en un sistema natural o al aumento de la concentración de una sustancia del sistema superando las variaciones típicas y naturales (www.cricyt.edu.ar/enciclopedia).

En las ciencias ecológicas, cualquier metal o metaloide que no puede ser biológicamente degradado y cause problemas medioambientales, es considerado, como un metal pesado. Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, pero en algunos ecosistemas las concentraciones de muchos de ellos han alcanzado niveles tóxicos como consecuencia de actividades antropogénicas. Cincuenta y tres elementos caen dentro de esta categoría hasta la fecha y son definidos como el grupo que posee una densidad mayor a 5 g/cm³ y son reconocidos como contaminantes ubicuos en las sociedades industrializadas (Padmavathiamma y Loretta, 2007). La contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por metales pesados es generada principalmente por los efluentes de industrias metalúrgicas, petroquímicas, del cuero (curtiembres) y químicas.

***Arabidopsis thaliana* como modelo**

Las plantas son organismos complejos que poseen ciclos de vida extensos, dificultando los estudios genéticos, lo que llevo a la búsqueda de una especie de ciclo de vida corto y fácil manipulación con el fin de utilizarla como organismo modelo.

Arabidopsis thaliana ha resultado ser un modelo de experimentación muy conveniente, con un impacto más allá del reino vegetal (Meinke, Cherry *et al.*, 1998). *Arabidopsis* es una dicotiledónea perteneciente a la División Magnoliophita, clase Magnoliopsida, orden Brassicales (brasicáceas o crucíferas). Crece naturalmente en regiones de Asia, Europa y el norte de África, y se ha introducido en otras áreas como Norteamérica y Australia (Koornneef *et al.*, 2004). Esta planta no tiene valor económico alguno. Sin embargo, presenta varias ventajas que agilizan su investigación (Anderson y Wilson, 2000). Se

caracteriza por tener un ciclo de vida corto que abarca entre seis a ocho semanas y un tamaño pequeño, cerca de 30 centímetros, por lo que es posible crecer un gran número en un espacio reducido permitiendo realizar estudios en el laboratorio en cámaras con condiciones de luz y temperatura controladas, así como ensayos bioquímicos y moleculares. Se han identificado varios ecotipos, variantes que viven en diferentes condiciones ambientales en diversos puntos del planeta, y estas variaciones genéticas naturales son muy valiosas en el estudio de diversas características. Los ecotipos Columbia (Col) y Landsberg *erecta* (Ler) son los usados preferentemente en el laboratorio.

Arabidopsis es una especie muy prolífica capaz de producir por autofecundación hasta 10.000 semillas por planta (Meyerowitz., 1989) un factor importante en el momento de realizar estudios genéticos. Además, su capacidad de autofecundarse facilita la mantención de líneas y la realización de cruzas controladas.

Es una especie con un genoma pequeño de 125 Mb (www.arabidopsis.org), poco más de 20 veces el de *Escherichia coli*, 10 veces el de *Saccharomyces cerevisiae* y similar al tamaño del genoma de *Drosophila melanogaster*. Es diploide, mientras que muchas otras plantas tienen una ploidía mucho mayor y su genoma se encuentra distribuido en 5 cromosomas ($2n = 10$). En el año 2000 se completó la secuencia del genoma de *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative).

Antecedentes

La contaminación por metales pesados es un grave problema que se ha incrementado con el aumento de la población mundial. Por esta razón, en las últimas décadas, aumentó el interés por conocer detalladamente los efectos tóxicos de los mismos, sobre el metabolismo y desarrollo de las plantas cultivadas, con el objetivo de generar información para el manejo adecuado de cultivos expuestos a contaminantes (Díaz Aguilar *et al.*, 2001).

Los metales pesados pueden participar en una serie de procesos al incorporarse al ciclo del agua, principalmente en la fase relacionada con el suelo, llegando a acumularse en éste como resultado de reacciones químicas, vía procesos de adsorción, solubilización, precipitación y cambios en sus estados de oxidación, o pueden estar presentes en tejidos vegetales, debido a la asimilación por la planta. En consecuencia, el uso agrícola de estos suelos contaminados por metales pesados, aparentemente, produce cultivos normales, pero potencialmente peligrosos para el consumo humano y animal (Alarcon *et al.*, 2001). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante varios años.

Efecto de los metales pesados

Los metales pesados interactúan con varios grupos funcionales de proteínas, principalmente grupos sulfhidrilo. Como resultado, la conformación de las proteínas es alterada, modificando así su función y actividad. Muchas enzimas con grupos sulfhidrilo en sus centros activos pierden sus actividades. Además, el metabolismo celular también se ve obstaculizado por la unión de metales a grupos sulfhidrilo de metabolitos fisiológicamente activos de bajo peso molecular. Por lo tanto, la unión de metales pesados a grupos sulfhidrilo libres puede afectar negativamente al metabolismo celular de muchas maneras. (Ivanov *et al.*, 2003).

Ciclo de vida

Uno de los fenómenos biológicos que mayor interés despierta es el desarrollo, conjunto de procesos que convierten al cigoto en un individuo capaz de perpetuar a su especie. El desarrollo conlleva la variación de la morfología y la fisiología de las células, los tejidos y el organismo completo a lo largo del ciclo de vida de éste, como consecuencia de la modulación de la expresión de los genes según patrones temporales y espaciales definidos (Cartagena, 1998). Conocer en detalle la función de un gen es imprescindible para entender el fenotipo observado en un organismo. Muchos de estos fenotipos pueden manifestarse como cambios sutiles en el crecimiento o desarrollo (Boyes *et al.*, 2001).

El ciclo de vida de *A. thaliana* es corto, inferior a un año, aunque en el laboratorio se puede completar en un período de entre seis a ocho semanas (figura 1).

El desarrollo vegetativo comienza con la germinación, en la que la cubierta de la semilla se rompe, produciéndose la emisión de la radícula, la elongación del hipocotilo y el desarrollo de las hojas, y finaliza con la aparición de las flores (figura 3 y 4). La duración de esta fase depende considerablemente de las condiciones ambientales y de las características genéticas de cada estirpe, pudiendo limitarse a unas dos semanas o prolongarse durante varios meses (Cartagena, 1998).

En las fases iniciales del crecimiento de la planta, las hojas vegetativas forman una estructura en roseta. Posteriormente, surge la inflorescencia. Pueden distinguirse la roseta temprana y la adulta, en función de la forma de las hojas que se generan. También para la inflorescencia se consideran dos fases, una de ellas temprana, en la que aparecen hojas caulinares o brácteas, con inflorescencias laterales en sus axilas. La inflorescencia tardía, por su parte, se caracteriza por la aparición de flores laterales, que no están acompañadas de hojas caulinares (figura 2) (Cartagena, 1998).

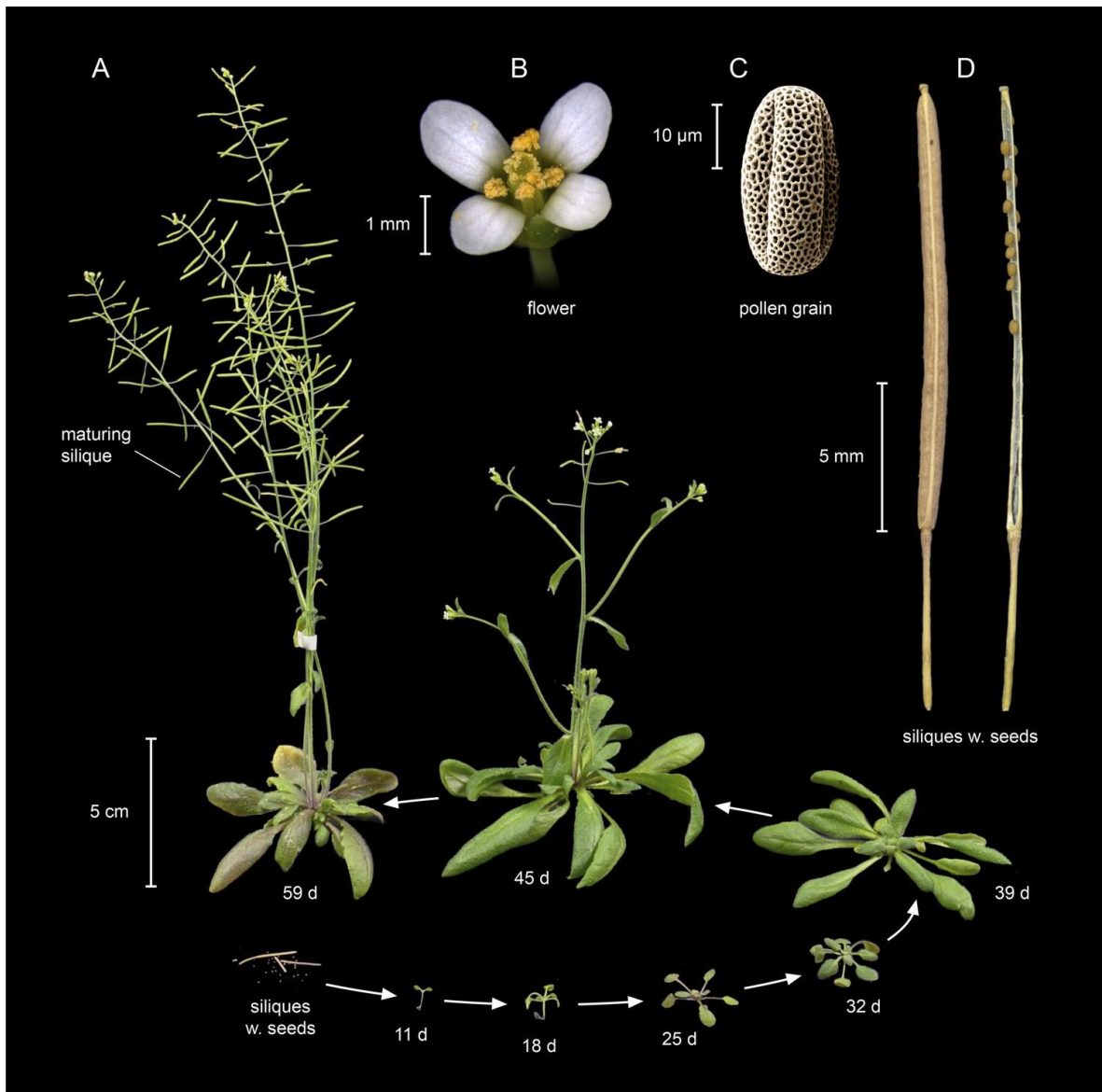


Figura 1: Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. (A) *A. thaliana* del tipo Columbia (Col) en diferentes estadios de su ciclo de vida, desde la semilla (abajo a la izquierda) hasta la germinación (11 días), crecimiento vegetativo (39 días) y crecimiento reproductivo (45 días). (B) Flor. (C) Grano de polen. (D) Silicuas maduras (izquierda: cerrada - derecha: abierta). Tomado de Krämer, 2015

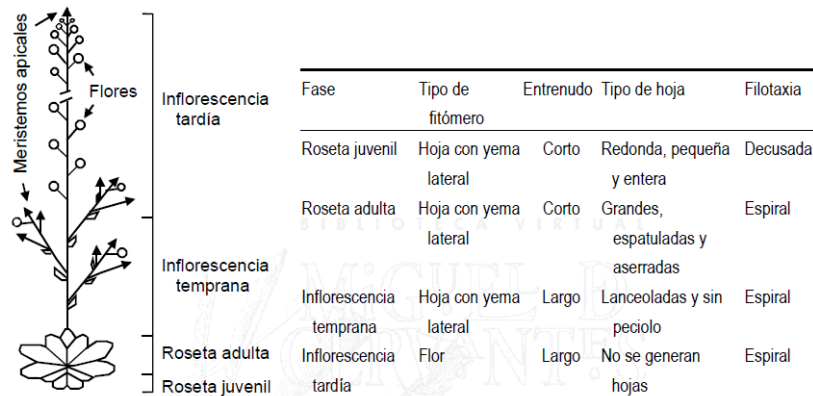


Figura 2: Cambios en la morfología del sistema del tallo a lo largo del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda se indican las diferentes fases en las que suele dividirse el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Tomado de Cartagena, 1998.

A continuación, se detallan las etapas de desarrollo fenotípico de *A. thaliana* para ensayos en placa de Petri y en tierra:

Etapas del desarrollo fenotípico de <i>A. thaliana</i> para ensayos en placa de Petri		
Etapas	Descripción	Días ^a
0	Germinación de la semilla	0 a 5,5
1	Desarrollo de las hojas- hasta 4 hojas en la roseta	6 a 14,4
Etapas del desarrollo fenotípico de <i>A. thaliana</i> para ensayos en tierra		
1	Desarrollo de las hojas- hasta 14 hojas en la roseta	12,5 a 25,5
3	Crecimiento de la roseta	18,9 a 29,3
5	Aparición de la inflorescencia	26 +/- 3,5
6	Producción de flores	31,8 a 49,4
8	Maduración de las silicuas	48 +/- 4,5
9	Senescencia- Cosecha de semillas	No determinado

Figura 3: Etapas del desarrollo de *A. thaliana* en placa de Petri y tierra. ^a Promedio de días a partir del día de siembra, incluyendo los tres días de estratificación a 4°C para sincronizar la germinación. Modificado de Boyes *et al.*, 2001.

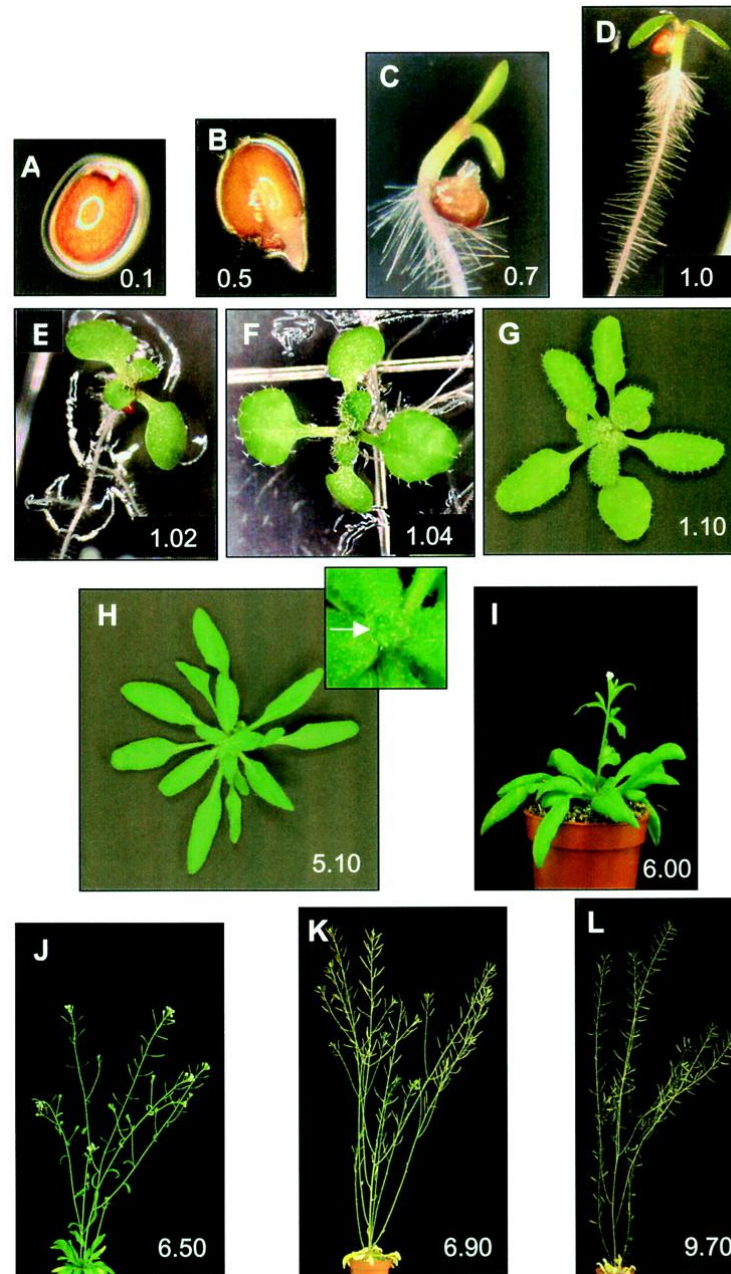


Figura 4: Etapas del desarrollo de *A. thaliana*. Imágenes de las principales etapas del desarrollo de *A. thaliana*: A, B y C: Etapa 0; D, E, F y G: Etapa 1; H: Etapa 5; I, J y K: Etapa 6; L: Etapa 9. Tomado de Boyes *et al.*, 2001.

Metales

Níquel

Entre los metales pesados, el níquel es uno de los contaminantes presentes en las descargas de la industria minera, de la fundición, refinación de elementos metálicos y de diferentes tipos de industrias que utilizan este metal como materia prima. Su presencia, tanto en las aguas residuales utilizadas para riego, como en lodos residuales utilizados como fertilizantes o mejoradores del suelo, es una de las causas de la contaminación en suelos y plantas (Díaz Aguilar *et al.*, 2001). En el caso de la industria de la fundición, el volumen de agua residual es poco, el problema puede darse por el contacto del agua de escorrentía con materias primas de fundición, escorias, lodos, cenizas y otros residuos. Se entiende como escorrentía a la corriente de agua que se vierte al rebasar su depósito. La mayoría de estas industrias se encuentran en zonas con sistema de alcantarillado por lo que el impacto ambiental no sería significativo si las aguas colectadas por el sistema son posteriormente tratadas (Sosa *et al.*, 2013).

En 1988, el níquel se incluyó en la lista de los elementos esenciales para las plantas. Sin embargo, este elemento es fitotóxico cuando está presente en altas concentraciones (Krämer *et al.*, 1998). Se absorbe como catión Ni^{+2} y es transportado rápidamente a los sitios metabólicamente activos, ocasionando múltiples efectos tóxicos en el crecimiento, e interfiere en la absorción y translocación de otros nutrimentos a los diferentes órganos de las plantas, provocando serias deficiencias. Estos síntomas incluyen la inhibición de la elongación de la raíz y la clorosis entre las venas de las hojas, esta última, como consecuencia de la interferencia del níquel con la formación de clorofila (Krämer *et al.*, 1998).

Cromo

Otro metal pesado de gran relevancia es el cromo que en su forma hexavalente (Cr VI) es considerado muy tóxico por su alta movilidad y normalmente aparece asociado con oxígeno, como cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (García *et al.*, 2011). La principal fuente de contaminación con este metal son las curtiembres, donde las concentraciones de cromo (VI) de sus efluentes pueden variar entre 1 a 77 mg/L del elemento (Giardina *et al.*, 2012). Otra fuente de contaminación es la industria de aceros refractarios. El cromato y el dicromato poseen una similitud geométrica y de carga con algunos aniones esenciales, lo cual puede afectar la nutrición mineral. Por ejemplo, alguno de los efectos inhibitorios (a concentraciones mayores a 100 μM) en el crecimiento de la raíz y del follaje podrían ser causados por la competencia del cromo con nutrimentos minerales esenciales mediante su unión a los transportadores. La entrada del cromo (VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un transporte activo, pero se carece de pruebas concluyentes del mecanismo específico involucrado (Ortiz-Castro *et al.*, 2009).

Plomo

El plomo es un catión divalente que se une fuertemente a los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Azcona-Cruz *et al.*, 2015). A diferencia de los otros dos metales, es un metal no esencial para la planta. Se lo considera un contaminante tóxico que no se degrada y permanece en el ambiente siendo peligroso para el hombre a niveles tan bajos como 5 ppm. (Núñez Chaves, 2007).

El plomo es un contaminante importante tanto en el ecosistema terrestre como acuático. Además de los procesos de erosión natural, las principales fuentes de contaminación por plomo son los gases de escape de automóviles, chimeneas de fábricas que usan plomo, efluentes de la industria de las baterías de acumulación, minera y fundición de minerales de

plomo, las operaciones de metalizado y acabados, fertilizantes, pesticidas y aditivos en pigmentos y gasolina (Sharma y Dubey, 2005).

Parte del plomo en la solución se adsorbe sobre las raíces y luego se une a los grupos carboxilo del ácido urónico del mucilago, o directamente a los polisacáridos de la superficie celular del rizoderma. El mucilago, restringe la captación del metal en la raíz y establece una barrera importante para el sistema radicular. A nivel molecular, el mecanismo por el cual el plomo entra a las raíces es aún desconocido, pero se sabe que una de las vías involucra canales iónicos. (Pourrut *et al.*, 2011; Seregin e Ivanov, 2001)

Se supone que los metales pesados afectan la absorción de otros iones por diferentes mecanismos. Uno de ellos se basa en el trastorno inducido por el metal en el metabolismo celular que conduce a los cambios en las actividades enzimáticas de membrana y la estructura de la misma. (Seregin e Ivanov, 2001).

Efectos de los metales pesados en el desarrollo de *A. thaliana*

A continuación, se mencionan los estudios y resultados relevantes de otros grupos de investigación en el área, que se utilizaron como referencia para esta tesis.

Vargas- Palominos y colaboradores (2007), estudiaron el efecto del cloruro de níquel y del nitrato de plomo en el crecimiento de la raíz de *A. thaliana*. Para el níquel definieron las concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 μM ; en el caso del plomo las concentraciones ensayadas fueron, 0; 500; 1000; 1250 y 1500 μM . Este grupo determinó que, en todos los tratamientos con níquel se presentó una disminución de la longitud de la raíz primaria, siendo mucho mayor esta disminución a partir de la concentración de 150 μM ; en los tratamientos con plomo el crecimiento de la raíz principal en las concentraciones de 1000, 1250 y 1500 μM fue poco perceptible, mientras que a 500 μM las raíces crecieron igual que en el control sin metal (figura 5).

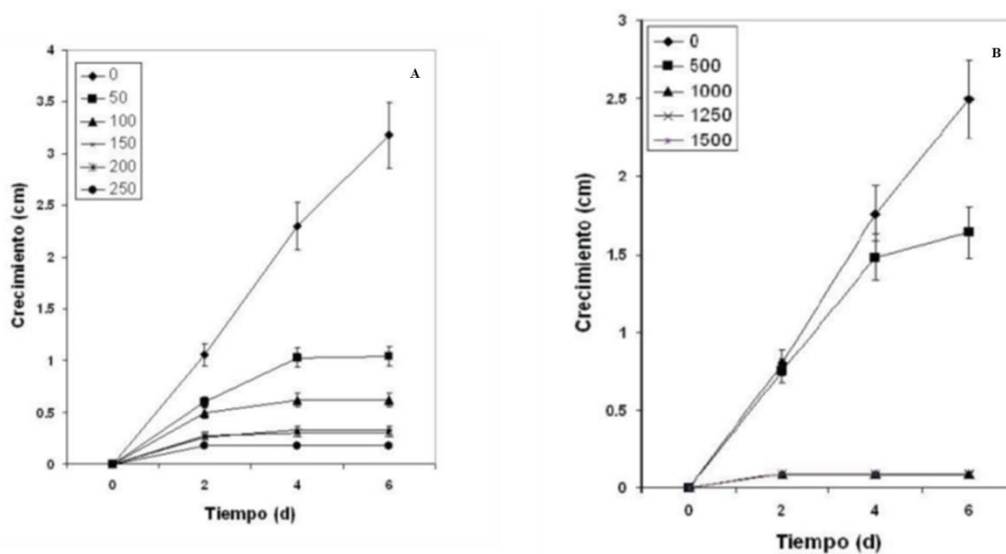


Figura 5: Efecto del níquel (A) y el plomo (B) sobre el crecimiento de la raíz de *A. thaliana*. El crecimiento de la raíz primaria se midió a los 2, 4 y 6 días, en las concentraciones del metal, indicadas en micromolaridad. Modificado de Vargas- Palominos, 2007.

Los mismos valores que ensayó Vargas- Palominos para níquel y plomo, fueron ensayados por Guillén (2008) pero en *Nicotina tabacum L*; los resultados que este grupo obtuvo fueron, en el caso del níquel que a 100 μM el crecimiento de la raíz principal aumentó con respecto al control, a 50 μM el crecimiento disminuyó con respecto al control y en el resto de las concentraciones el crecimiento de la raíz primaria se inhibió por completo. En el caso del plomo, todas las concentraciones inhibieron el crecimiento de la raíz primaria.

Por su parte, Silva-Guzman y colaboradores (2016), ensayaron las concentraciones de 0, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 μM Ni(NO₃)₂ en *Arabidopsis thaliana* y los resultados que obtuvieron fueron que a concentraciones superiores a 150 μM, el Ni⁺² es altamente tóxico para el crecimiento de la raíz.

Martínez- Trujillo y colaboradores (2013), realizaron ensayos con cromato de potasio para evaluar el efecto del cromo VI en el crecimiento de la raíz de *A. thaliana*; para ello, generó plántulas de 6 días crecidas en medio MS sólido y las trasplanto a medio MS

suplementado con 0, 100, 150, 200 y 250 μM de cromato de potasio. Los resultados obtenidos fueron que el crecimiento de la raíz primaria se inhibió por completo a partir de 150 μM , en la concentración de 100 μM se inhibió el crecimiento, pero sólo un 50% (figura 6).

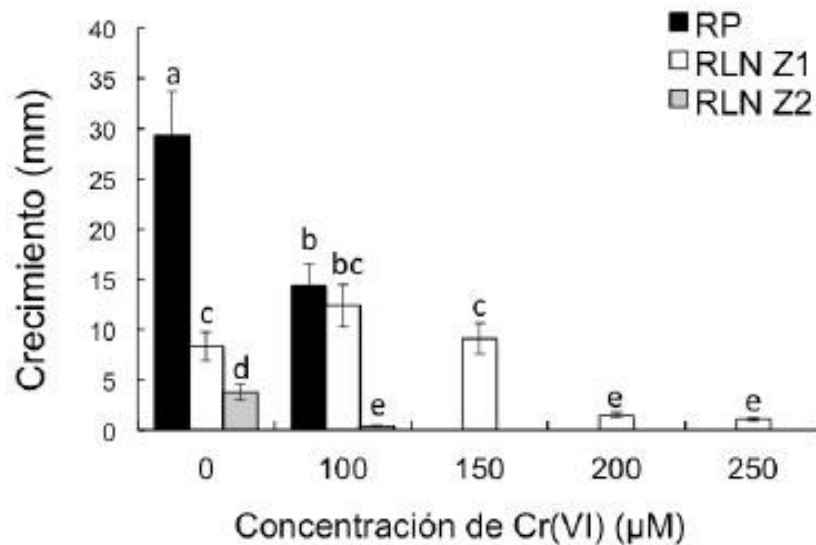


Figura 6: Efecto del Cr (VI) en el crecimiento de raíces de plantas de *A. Thaliana* sin raíces laterales trasferidas de medios MS a medios suplementados con Cr (VI). RP: Raíces primarias; RLN Z1: Raíces laterales nuevas de la zona 1; RLN Z2: Raíces laterales nuevas de la zona 2. Las letras indican las diferencias significativas para $p < 0,05$ con la prueba de Tukey, $n=20$ para cada tratamiento. Las barras representan los intervalos de confianza para $\alpha=0,05$. Modificado de Martínez – Trujillo, 2013.

El grupo de trabajo de García (2011), analizó el crecimiento de raíces primarias de *Nicotina tabacum L* en condiciones de estrés generadas por cromo VI a diferentes concentraciones de dicromato de potasio (0, 100 y 200 μM). Los resultados de este ensayo demuestran que, si bien el crecimiento se inhibe los primeros 5 días después del trasplante, luego existe una estimulación y el crecimiento llega a ser mayor que el control. Así, se demostró que si bien el cromo inhibe el crecimiento de la raíz primaria es necesario analizar si

ese retraso en el crecimiento es constante o depende del tiempo transcurrido después del trasplante.

Por otra parte, Eleftheriou y colaboradores (2015) ensayaron el efecto del dicromato de potasio a concentraciones de 0, 50, 100 y 250 μM en plántulas de *A. thaliana*. Las plántulas fueron crecidas sin ningún tratamiento durante 4 días y luego fueron trasplantadas a nuevas placas de Petri con medio específico (Phytoagar - Duchefa, Haarlem, The Netherlands) donde se aplicó el tratamiento correspondiente. Realizaron mediciones del largo de la raíz principal durante 4 días y observaron que a 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la longitud de la raíz de las plántulas era menor que las del control (0 μM).

METAL PESADO	RESULTADOS RELEVANTES DE OTROS GRUPOS
Níquel	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la longitud de la raíz de <i>A. thaliana</i> entre 50 y 250 μM. • En <i>N. tabacum</i> a 100 μM el crecimiento de la raíz fue mayor y a 50 μM fue menor con respecto al control. Entre 150 y 250 μM se inhibió completamente el crecimiento de la raíz. • Concentraciones superiores a 150 μM son altamente tóxicas para el crecimiento de la raíz principal de <i>A. thaliana</i>.
Cromo	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 100 μM disminuyó el crecimiento de la raíz y a partir de 150 μM la inhibición fue completa en <i>A. thaliana</i>. • En <i>N. tabacum</i> a 100 y 200 μM, al comienzo hay una inhibición, pero finalmente se estimula el crecimiento de la raíz. • En <i>A. thaliana</i> expuesta al metal durante 4 días se inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal.
Plomo	<ul style="list-style-type: none"> • A concentraciones de 500, 1000, 1250 y 1500 μM el crecimiento de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> fue poco perceptible. • En <i>N. tabacum</i>, a las mismas concentraciones el crecimiento de la raíz primaria se inhibió.

Figura 7: Resultados obtenidos por otros grupos, utilizados como referencia para esta tesis.

Salinidad

Germinación

La germinación de las semillas de *A. thaliana* wild type del ecotipo Columbia no se ve afectada en concentraciones menores a 100 mM de Na₂SO₄ o KCl (Quesada *et al.*, 2000) (figura 8), por lo que se pueden usar como control en el diseño experimental.

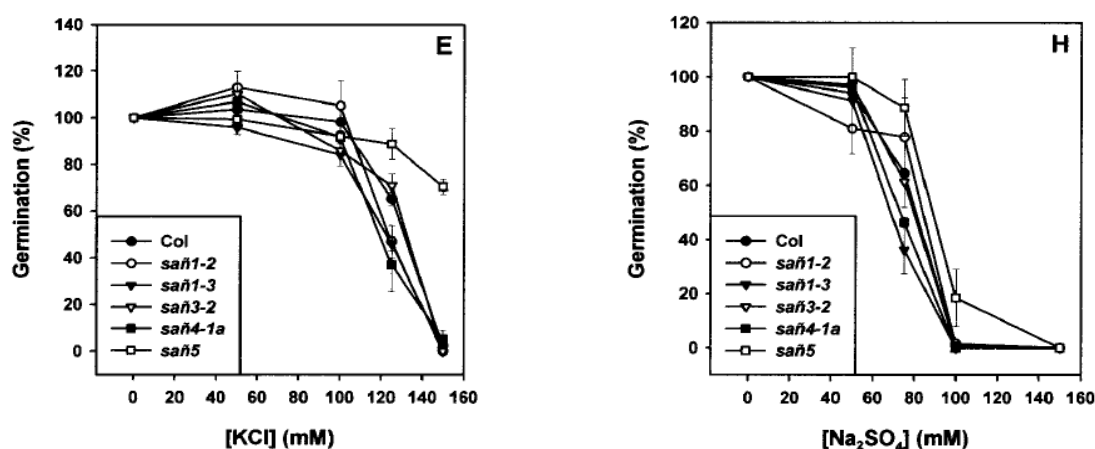


Figura 8: Efecto del estrés osmótico en líneas de *Arabidopsis thaliana* wild type y mutantes con germinación halotolerante (salobreño - sañ). Cada gráfico representa el patrón de germinación de distintas mutantes y su ancestro wild type. Se utiliza como control semillas de *A. thaliana* wild type del ecotipo Columbia. Las barras de error representan desviaciones estándar. Cada punto corresponde al promedio de tres o más réplicas de 50-100 semillas. Col, Columbia. Modificado de Quesada *et al.*, 2000.

Medición de la longitud de la raíz principal

Plantas de *A. thaliana* del tipo salvaje fueron crecidas en medio MS con distintas concentraciones de KCl. Se observó que a partir de 0,1 mM KCl el crecimiento se vió favorecido y que a niveles superiores a 10 mM KCl el crecimiento de la raíz se redujo sin

llegar a ser menor que la longitud de las raíces de las plántulas sin tratar (figura 9) (Liu y Zhu, 1997).

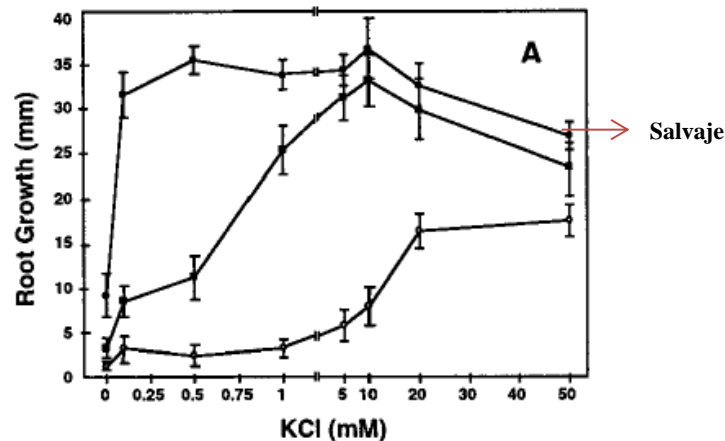


Figura 9: El crecimiento óptimo de las plántulas de tipo salvaje (círculo negro), sos1 (círculo blanco), y sos3 (cuadrado negro) requiere diferentes concentraciones externas de KCl en los medios. El crecimiento en MS fue considerado como 100%. Los valores son los promedios de 15 plántulas. Modificado de Liu y Zhu, 1997.

VARIABLES DE ESTUDIO

Semilla y germinación

Las angiospermas producen un embrión con nutrientes almacenados en un paquete compacto, la semilla, la cual se desarrolla después de que ha ocurrido la fecundación. Una semilla madura contiene una planta embrionaria, que tiene la información genética necesaria para producir una nueva planta, y alimento, rodeados por un resistente epispermo (testa) protector. A su vez, la semilla está encerrada en un fruto, en el caso de *A. thaliana* en las silicuas. El embrión maduro contenido en la semilla consiste en una corta raíz embrionaria, o radícula; un sistema aéreo embrionario, y una o dos hojas de semilla, o cotiledones. La corta porción del sistema aéreo embrionario que conecta la radícula con los

cotiledones es el hipocotilo. El ápice del sistema aéreo, o yema terminal, se localiza arriba del punto de inserción del o los cotiledones y se denomina plúmula. Dado que la planta embrionaria no realiza fotosíntesis, debe contar con nutrimentos durante la germinación mientras se hace autosuficiente. Los cotiledones de muchas plantas funcionan como órganos de almacenamiento y se hacen grandes y gruesos a medida que absorben las reservas de alimento producidas inicialmente como endospermo. Estas semillas tienen poco o nada de endospermo en la madurez, es el caso de las semillas de *A. thaliana*. (Viljee *et al.*, 1998; Langer y Hill, 1987).

Todas las semillas necesitan calor y humedad para germinar, pero muchas semillas que recién han madurado no germinan de inmediato, aunque las condiciones sean ideales. En vez de ello, entran en estado de latencia durante el cual no germinarán. El estado de latencia por lo general se caracteriza por una baja actividad metabólica y una resistencia a las condiciones ambientales adversas. El estado de latencia de la semilla resuelve dos problemas, uno intrínseco a la planta misma y otro relacionado con factores ambientales. En primer lugar, si una semilla germinara mientras está encerrada todavía en el fruto y cuelga de un árbol o una guía, podría agotar sus reservas de alimento antes de tocar el suelo. En segundo lugar, las condiciones ambientales que son apropiadas para el crecimiento de las plántulas podrían no coincidir con la maduración de la semilla. Las plantas han desarrollado muchos mecanismos que producen estado de latencia en las semillas y las semillas de cada especie tienen sus propios requisitos que deben satisfacer para que haya germinación. Los tres requisitos más comunes son desecación (impide la germinación mientras esta en el fruto), exposición al frío y fractura del tegumento de la semilla. (Audesirk *et al.*, 2003).

Una vez que las condiciones son adecuadas para la germinación, la primera parte en emerger de la semilla es la raíz embrionaria. A medida que esta crece y se abre paso en el suelo, encuentra considerable fricción contra las partículas con que se topa. El delicado meristemo apical de la punta de la raíz está protegido por una caliptra o pileoriza. El siguiente en emerger de la semilla es el sistema aéreo. Las puntas del tallo no están protegidas

por una estructura comparable a la caliptra, pero las plantas tienen diferentes modos de proteger las delicadas puntas del tallo cuando este crece a través del suelo hacia la superficie. El tallo de una dicotiledónea se curva para formar un gancho invertido, curvando el hipocotilo, de modo que tira de la punta del tallo y los cotiledones a través del suelo. Los cotiledones quedan expuestos al aire, se ponen verdes y realizan fotosíntesis y transfieren tanto el alimento almacenado como azúcares recién sintetizadas. (Viljee *et al.*, 1998; Audesirk *et al.*, 2003).

Hojas

La hoja, en el amplio sentido del término, es muy variable ya sea en estructura como en función. La hoja normal a menudo muestra su especialización como un órgano fotosintético por la forma aplanada y extendida de su lámina permitiendo la máxima absorción de la energía lumínica y la difusión interna eficiente de los gases. La lámina puede estar inserta al tallo por el pecíolo, o la hoja puede ser sin pecíolo, es decir, sécil como en el caso de las hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Las hojas de una planta en desarrollo progresivo muestran diferencias más o menos pronunciadas en su morfología. Las hojas llevan a cabo un desarrollo heteroblástico y de este modo revelan una estructura gradiente en la planta. Los cambios en la forma de la hoja durante la ontogenia de una planta a menudo ocurren en los estados de plántula de manera que hay una diferencia entre formas juveniles y adultas (Esau, 1993).

Las hojas pueden ser simples o compuestas y su disposición alrededor del tallo, o filotaxis, también es de importancia. La disposición más simple se da cuando las hojas se unen alternativamente a uno u otro lado, pero también pueden ser opuestas, o verticiladas, o en combinaciones variables.

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, la hoja es simple, es decir, el ensanchamiento de la hoja o limbo es entero y la disposición de las hojas en el tallo es alterna

que sólo se observa en especies que elongan el tallo desde el momento de la germinación (Langer y Hill, 1987).

Al igual que los tallos y las raíces, las hojas pueden estar modificadas. Por ejemplo, en algunas plantas de ambientes muy secos las hojas pueden reducir mucho su tamaño y plegarse sobre sí mismas para reducir las pérdidas de agua. Esto puede ir acompañado del crecimiento de pelos sobre la superficie foliar conocidos como tricomas cuya función es variada (absorción, secreción, protección, entre otras) y de la localización de los estomas en las depresiones. Estos últimos realizan el intercambio gaseoso entre el interior de la hoja y el medio exterior. Cuando las hojas están plenamente turgentes los estomas están abiertos y el dióxido de carbono se desplaza libremente hacia el interior para que la fotosíntesis tenga lugar, dándose a la vez una rápida pérdida de humedad. Si la velocidad de pérdida de agua se hace demasiado grande, los estomas se cierran por la disminución de turgencia de las células estomáticas. La pérdida de agua es así reducida, pero a la vez se reduce también la eficacia de la fotosíntesis a causa de la disminución de intercambio gaseoso (Langer y Hill, 1987). Así, la estructura foliar representa una solución intermedia entre fotosíntesis y conservación de agua (Villego *et al.*, 1998).

Los cotiledones, primeras hojas de las plantas y los catafilos son dos formas comunes de hojas. Están representados por diversas brácteas o escamas protectoras y de almacenaje. Son más simples que las hojas normales en su forma y su histología. Las primeras brácteas que se desarrollan sobre un vástago lateral se llaman profilos. Los profilos pueden ser seguidos por hojas normales o por una sucesión de otras brácteas que representan formas de transición con las hojas normales.

Raíz

La raíz es uno de los órganos más importantes y adecuados para la captación de agua y nutrimentos del ambiente necesarios para la vida de la planta. La primera raíz

originada de la planta se llama radícula, que es formada después de la germinación de la semilla y forma la raíz primaria. Las raíces originadas a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales (Taiz y Zeiger, 2010).

La supervivencia y el rendimiento de las plantas dependen en gran medida de la capacidad de la planta para explorar eficientemente el suelo en la búsqueda de agua y minerales. Así, el crecimiento radicular y la arquitectura son extremadamente relevantes para la adaptación de la planta al medio de crecimiento, ya que determinan el volumen del suelo que una planta es capaz de explorar en un momento dado. La arquitectura del sistema radicular (RSA) representa la disposición espacial de raíces de diferentes edades y órdenes y está determinada por factores genéticos y la integración de señales ambientales. El componente genético determina la morfología fundamental y el modelo del sistema radicular de una planta, mientras que las señales ambientales modelan la arquitectura de la raíz modificando el programa genético intrínseco. La disponibilidad de nutrientes puede ejercer un profundo impacto en RSA alterando el número, la longitud, el ángulo y el diámetro de las raíces y pelos. De hecho, las plantas pueden responder a la disponibilidad heterogénea de recursos asignando raíces donde se encuentran las condiciones más favorables (Gruber *et al.*, 2013).

Floración

Las diferencias genéticas en el tiempo de floración contribuyen conspicuamente a la variación dentro y entre las poblaciones naturales. Esta variación en tiempo de floración se ha relacionado en algunos casos con la sensibilidad diferencial a la vernalización, exposición de las semillas al frío que les confiere la aptitud para florecer, y la duración del día, lo que refleja la adaptación local. La mayoría de los ecotipos, subpoblación genéticamente diferenciada restringida a un hábitat específico, que se utilizan en experimentos moleculares y genéticos, como Columbia y Landsberg *erecta*, florecen dentro

de 3-4 semanas después de la siembra, con 10-13 y 6-8 hojas de roseta respectivamente, cuando se proporcionan condiciones normales de crecimiento y fotoperiodo de día largo. Los genotipos muestran sólo una pequeña respuesta a la vernalización. (Koorneef *et al.*, 1991).

La correlación entre tiempo de floración y número de hojas fue observada por muchos autores y puede explicarse asumiendo una tasa uniforme de iniciación foliar para todos los genotipos que difieren sólo en el momento en que el meristemo vegetativo se convierte en meristemo reproductivo. Sin embargo, el coeficiente de correlación entre los dos parámetros no es el mismo para todos los genotipos (figura 10) (Koorneef *et al.*, 1991).

Genotipo	Numero de hojas de roseta	Numero de hojas caulina	Días de floración
WT Col	12,9±0,2	3,5±0,1	30,6±0,3

Figura 10: Número de hojas y tiempo de floración para *A. thaliana* genotipo Col (wt) crecidas en invernadero en idénticas condiciones de día largo. Modificado de Koorneef *et al.*, 1991

Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido o MEB se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Con esto conseguimos hasta 100 Å de resolución, muy superior a cualquier instrumento óptico. Esta microscopía, permite la caracterización y observación de muestras sólidas y conductoras mediante imágenes obtenidas con electrones primarios, secundarios y retrodispersados.

Su funcionamiento consiste en hacer incidir un haz de electrones barriendo toda la muestra. Todas las muestras se observan en condiciones de alto vacío y deben estar metalizadas con un material conductor, en esta tesis se metalizaron con Oro-Paladio, esta técnica se denomina sputtering. Para ello, las muestras tienen que estar libres de humedad.

Para lograr esto se realiza el secado por punto crítico de las mismas, ya que cuanto menos hidratadas se encuentran, más fácil y rápido se metalizan, generando mejores condiciones de observación. El material deberá ser montado en porta muestras de aluminio (<http://www.macn.secyt.gov.ar>).

Métodos de fijación

Talbot y White (2013) lograron identificar un método para la preparación de muestras para el MEB en el cual se lograba preservar la morfología y las dimensiones del tejido original. Compararon los métodos de fijación convencionales (glutaraldehído o formaldehído-ácido acético-alcohol) con los protocolos basados en la fijación con solvente (metanol-etanol), que permiten simultáneamente fijar y deshidratar el tejido pudiendo transferirse al mismo directamente al proceso de secado por punto crítico.

El metanol es un solvente altamente polar con estructura similar al agua el cual penetra rápidamente a los tejidos y puede simplemente reemplazarla. Por lo tanto, estas propiedades del metanol hacen que sea un fijador ideal para MEB, ya que la eliminación del agua es crítica para una buena preservación. La deshidratación adicional con etanol parece ser importante, tal vez, para eliminar completamente el agua o para servir como un mejor solvente de transición.

Concluyeron que el protocolo de metanol-etanol es, generalmente, el mejor para la preservación de los tejidos de planta para MEB. A continuación, se presenta una comparación visual de las hojas de *A. thaliana* preparadas mediante el método de glutaraldehído y el método metanol-etanol (figura 11)

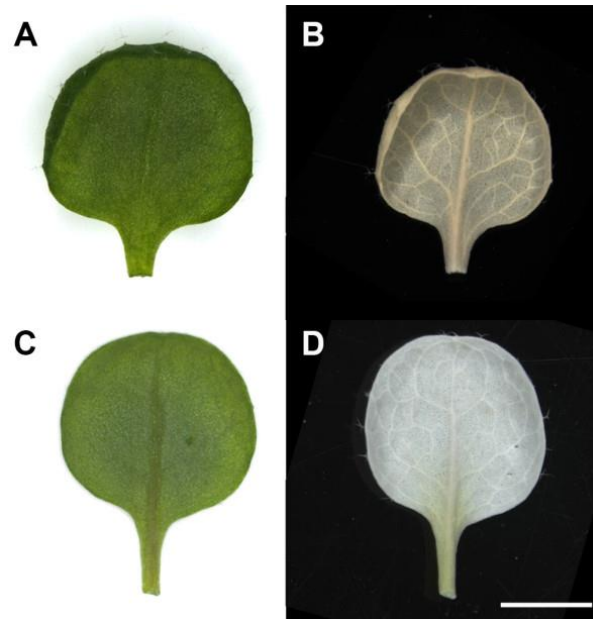


Figura 11: Efecto del procesamiento para MEB en las dimensiones de las hojas de *A. thaliana*. Comparación visual de los procedimientos de fijación de glutaraldehído y metanol-etanol (A-B, C-D), mostrando antes (A, C) y después (C, D) del secado por punto crítico. Algunas hojas estaban ligeramente onduladas en los bordes (A); esta ondulación no parecía cambiar después del procesamiento que era el mismo para hojas onduladas (B). Modificado de Talbot y White, 2013.

Hipótesis

Partiendo de la base que los metales pesados tienen un efecto nocivo sobre los cultivos nos podemos plantear la siguiente hipótesis: Al crecer a la planta *Arabidopsis thaliana* en exposición a diferentes concentraciones de distintos metales pesados (Ni^{+2} , Pb^{+2} y Cr^{+6}) se afectará su normal desarrollo, esperándose una reducción en la longitud de la raíz principal, disminución en el número de hojas y de las raíces secundarias y en la proporción de germinación y floración. Además, se espera observar una diferencia morfológica en aquellas plantas que crecieron expuestas a los distintos metales pesados.

Metodología

Lugar de trabajo

Como lugar de trabajo se utilizó el laboratorio de Biotecnología y Microbiología del 9º piso de UADE Labs. En él, se dispone de amplio equipamiento, mesadas de trabajo y de un espacio destinado a la investigación en plantas, asegurando las condiciones necesarias para desarrollar las actividades relacionadas a la experimentación en dicho organismo modelo. Además, cuenta con un espacio equipado con lupas estereoscópicas (Stemi 2000-Zeiss) utilizadas para una mejor visualización de las plantas y para fotografiar a las mismas.

Material biológico y condiciones de crecimiento

Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

El cultivo de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, en laboratorio se puede realizar de diversas formas y utilizando diversos sustratos, según el estudio que se desea realizar. En este trabajo se utilizaron tres técnicas diferentes, las cuales se detallan a continuación:

- Cultivo en placa de Petri: se utilizaron placas de Petri (90mm de diámetro y 15mm de profundidad) conteniendo 25 ml de medio de cultivo específico para plantas compuesto por medio de cultivo MS con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962) y agar bacteriológico tipo A al 0,08% (Biokar diagnostics). En las mismas se sembraron cuatro semillas en línea recta en condiciones de esterilidad.

Luego de la siembra, se procedió a la estratificación de las mismas, esto ayuda a que la germinación sea uniforme (Vargas-Palomino *et al*, 2007). Para ello las placas fueron incubadas en la oscuridad durante 72hs a 4°C; para ello se envolvieron en

bolsas de polietileno de baja densidad color negras o papel aluminio y se las puso en heladera.

Pasados los tres días que conlleva el proceso, las placas se dispusieron, en orientación vertical, en una incubadora (Ingelab) capaz de regular el fotoperiodo y la temperatura asegurando las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de las plantas en placa. En este equipo se pudieron fijar los siguientes parámetros:

Fotoperíodo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Temperatura: 22-23°C.

- Cultivo en tubos de ensayo: Se procedió de la misma forma que se mencionó anteriormente, pero las placas de Petri se reemplazaron por tubos de ensayo de 50 ml (2cm x 17,5cm) tapados con film de laboratorio (Parafilm M). A diferencia del cultivo en placa de Petri, se sembraron dos semillas por tubo. Una vez finalizado el proceso de estratificación los tubos se colocaron en gradillas que se ubicaron en el cuarto de plantas, el cual cuenta con un aire acondicionado que mantiene la temperatura constante (22-23°C) y, además, está equipado con un sistema de tubos fluorescentes por estante que permite dar luz según el fotoperíodo mencionado anteriormente (figura 12 B).

En este sistema de cultivo, si germinan ambas semillas, a los siete días post-germinación con dos hojas, la más pequeña se extrae del tubo.

- Cultivo en macetas: Luego de ser cultivadas en placas de Petri por 1 día post-germinación los plantines fueron trasplantados a tierra (figura 12 A).

Este proceso consistió en colocar tierra (Terrafertil growmix multipro) en vasos plásticos (6,5 cm de diámetro y 8cm de alto) y trasplantar dos plantines por maceta, en el caso de que ambos plantines hubiesen llegado al estadio de poseer cuatro hojas, el más pequeño de ellos fue quitado. Esto se realizó ya que es muy probable que el

estrés generado por el trasplante no le permita seguir con el crecimiento al plantín. Las macetas fueron colocadas en bandejas (56 cm de largo, 15 cm de ancho y 3 cm de profundidad).

Las bandejas se ubicaron en el cuarto de plantas, a una temperatura de 22-23 °C con fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). El riego de las mismas se realizó vertiendo agua en las bandejas, ya que incorporan la misma por capilaridad según lo demandado por las plantas, dos veces por semana aproximadamente.

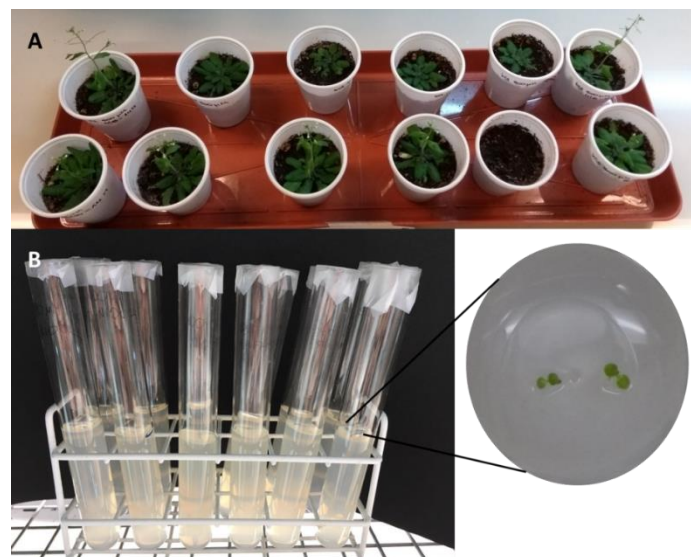


Figura 12: Cultivos de *A. thaliana* en macetas y tubos de ensayo. A) Las macetas de plástico (6,5 cm de diámetro y 8cm de alto) con Terrafertil growmix multipro fueron colocadas en bandejas (56 cm de largo, 15 cm de ancho y 3 cm de profundidad). El riego de las mismas se realizó vertiendo agua (500 ml) en las bandejas Fotoperíodo: largo; Temperatura: 22-23°C B) En cada tubo de ensayo de 50 ml (2cm x 17,5cm) se colocaron 25 ml de medio de cultivo MS, se sembraron dos semillas y fueron tapados con film de laboratorio. Posteriormente, fueron sincronizados (72 horas a 4 °C en oscuridad) y luego colocados en el cuarto de plantas en las mismas condiciones controladas que el cultivo en macetas.

Esterilización de semillas

La esterilización de las semillas se llevó a cabo bajo campana extractora de gases clase I – APE (Sabella) con el vapor generado por la mezcla de hipoclorito de sodio (25gCl/l) y ácido clorhídrico (36,5% - 38%) durante un mínimo de 4 horas y un máximo de 16 horas.

Experimentación con sulfato de níquel (NiSO₄)

Para evaluar el efecto del ion níquel (Ni⁺²) se decidió ensayar distintas concentraciones de una solución de sulfato de níquel (NiSO₄). Se partió de una solución madre (0,5 M) preparada en el laboratorio con sal de NiSO₄ (97%, M&B). Las concentraciones que se decidieron ensayar fueron 0, 50, 100, 150, 200 y 600 µM de NiSO₄ (Vargas-Palominos *et al.*, 2007).

Además, con el fin de controlar el efecto del ion sulfato (SO₄⁻²) que acompaña al ion Ni⁺², se preparó una solución madre (0,5 M) de sulfato de sodio (Na₂SO₄) (99.0% - 100,5%, Nedra) y se ensayaron concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 600 µM (Quesada *et al.*, 2000).

Las variables estudiadas fueron, proporción de semillas germinadas, cantidad de hojas a los 7 y 14 días post-germinación, longitud de la raíz principal a los 14 días post-germinación y cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación. Para ello, se realizó el cultivo en placa de Petri con medio MS con vitaminas suplementado con la cantidad de solución de sal según el tratamiento. Se prepararon tres placas para cada concentración de NiSO₄ y una placa para la concentración de Na₂SO₄. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Otra variable a estudiar fue el efecto de los metales en la floración. Para ello, se armaron doce macetas por concentración dispuestas en bandejas plásticas, según protocolo

mencionado con anterioridad. El tratamiento con el metal se proporcionó mediante el riego, vertiendo 500 ml de solución a cada bandeja con su correspondiente concentración.

Experimentación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Para evaluar el efecto del ion dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) se decidió ensayar distintas concentraciones de una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Se partió de una solución madre (0,5 M) preparada en el laboratorio con sal de $K_2Cr_2O_7$ (99%, Anedra). Las concentraciones que se decidieron ensayar fueron 0, 100, 150, 200, 250 y 600 μM de $K_2Cr_2O_7$ (Martínez-Trujillo *et al.*, 2013).

Además, con el fin de controlar el efecto del ion potasio (K^+) que acompaña al ion $Cr_2O_7^{2-}$, se preparó una solución madre (0,5 M) de cloruro de potasio (KCl) (99.0% - 100,5%, Nedra) y se ensayaron concentraciones de 200, 300, 400, 500 y 1200 μM (Quesada *et al.*, 2000).

Las variables que se propusieron estudiar fueron las mismas que para el experimento del sulfato de níquel y para la experimentación fue realizada de la misma manera.

Experimentación con cloruro de plomo ($PbCl_2$)

Para evaluar el efecto del ion plomo (Pb^{+2}) se decidió ensayar distintas concentraciones de una solución de cloruro de plomo ($PbCl_2$). Se partió de una solución madre (0,008 M) preparada en el laboratorio con sal de $PbCl_2$ (99%, Riedel-de Haën). Las concentraciones que se decidieron ensayar fueron 0, 250, 500, 800, 1000 y 1250 μM de $PbCl_2$ (Vargas-Palominos *et al.*, 2007).

Además, con el fin de controlar el efecto del ion cloruro (Cl^-) que acompaña al ion Pb^{+2} , se preparó una solución madre (0,5 M) de cloruro de potasio (KCl) (99.0% -

100,5%, Nedra) y se ensayaron concentraciones de 500, 1000, 1600, 2000 y 2500 μM (Quesada *et al.*, 2000).

Las variables que se propusieron estudiar fueron las mismas que para el experimento del sulfato de níquel y para la experimentación fue realizada de la misma manera.

Análisis de las variables

Germinación

Al tercer día luego del paso a la luz de las semillas (6 días desde su siembra) la mayoría de las semillas habían germinado, por lo que en este momento se procedió a evaluar la proporción de semillas germinadas en cada tratamiento. Para esto se tomó nota de las semillas que presentaban raicilla y cotiledones abiertos (Boyes *et al.*, 2001) y se calculó una proporción de semillas germinadas por cada placa.

Recuento de hojas

Se realizó manualmente utilizando, cuando era necesario, lupas estereoscópicas.

Medición de la raíz principal

Se realizó a través del software ZEN 2012 SP1 (blue edition). Para ello, primeramente, se extrajo el plantín del medio de cultivo y se lo colocó en un portaobjetos (figura 13 A y B). Luego se acondicionó la raíz, se estiró y marcaron segmentos (figura 13 C). Por último, se fotografió a la misma con una cámara Axiocam ERc 5s de ZEISS acoplada a

una de las lupas estereoscópicas (figura 13 D). Una vez obtenida la foto se procedió a la medición (figura 13 E).

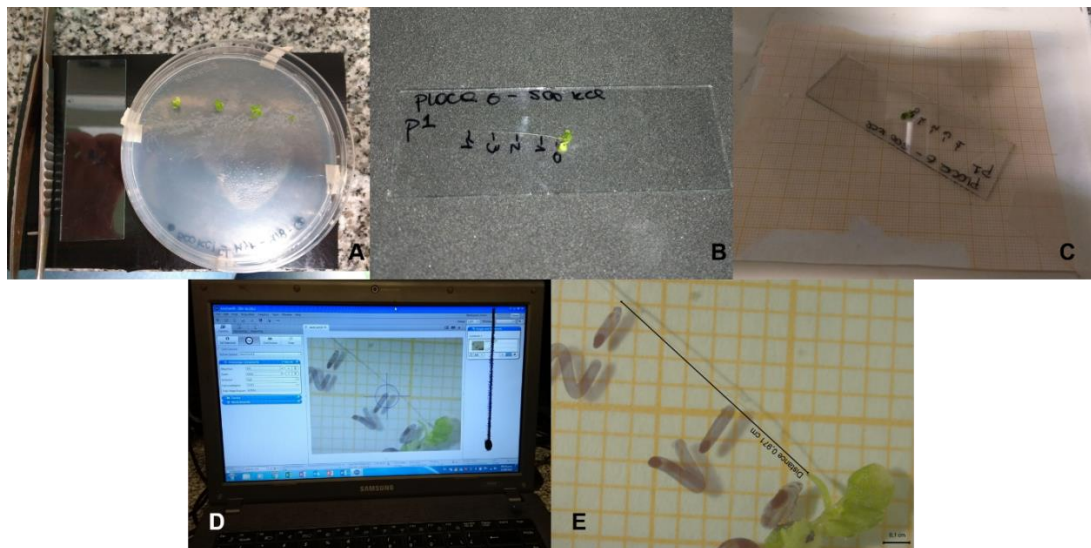


Figura 13: Protocolo para la medición de raíces. A) Herramientas necesarias y muestras: pinza, portaobjetos y placa de Petri con plántulas. B) Plántula de *A. thaliana* colocada en un portaobjetos, estirada y segmentada a partir del hipocótilo. C) Muestra de la imagen B colocada en la lupa estereoscópica sobre papel milimetrado. D) Momento en el cual se toma la fotografía mediante el uso del software ZEN 2012 SP1 (blue edition) en una computadora. E) Foto de los primeros dos segmentos de una plántula con su escala y la medición realizada.

Floración

La floración fue evaluada como el número de hojas de roseta en el momento en que se observó el meristemo reproductivo, pudiéndose evaluar indirectamente el tiempo de floración (Koorneef *et al.*, 1991).

Preparación y análisis de muestras mediante microscopio electrónico de barrido

Se realizaron cultivos de semillas en medio MS con las soluciones de sales de metales pesados ($K_2Cr_2O_7$; $PbCl_2$; $NiSO_4$), respetando las mismas concentraciones y condiciones de cultivo mencionadas para el ensayo de morfología de cada compuesto. Así, se obtuvieron muestras para analizar mediante microscopía electrónica de barrido.

La fijación de los plantines se realizó a los 14 días post-germinación según el protocolo basado en metanol (99,8%) (Talbot y White, 2013) que consiste un lavado de 10 minutos con metanol, luego se repite lo anterior dos veces, pero durante 30 minutos y luego se almacenan en etanol (100%) (figura 14).

En el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, donde se encuentra el microscopio marca Philips modelo XL30 TMP New Look, a las muestras se les realizó el secado por punto crítico y posterior metalizado con una mezcla de Oro-Paladio. Por último, las muestras son montadas en portamuestras de aluminio (figura 15).

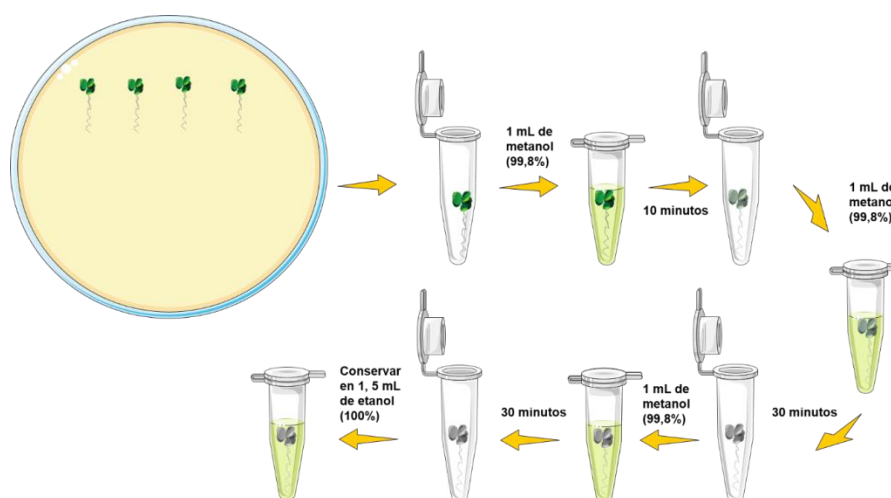


Figura 14: Protocolo basado en metanol (99,8%) para la fijación de plantines (muestras) para su posterior observación en el microscopio electrónico de barrido. La planta es extraída del medio de cultivo y colocada en un Eppendorf para ser lavada con 1,5ml de metanol al 99,8% durante 10 minutos. Se repite lo mismo dos veces pero esta vez, durante 30 minutos. Finalmente, se almacena en etanol 100%. Modificado de Talbot y White, 2013.

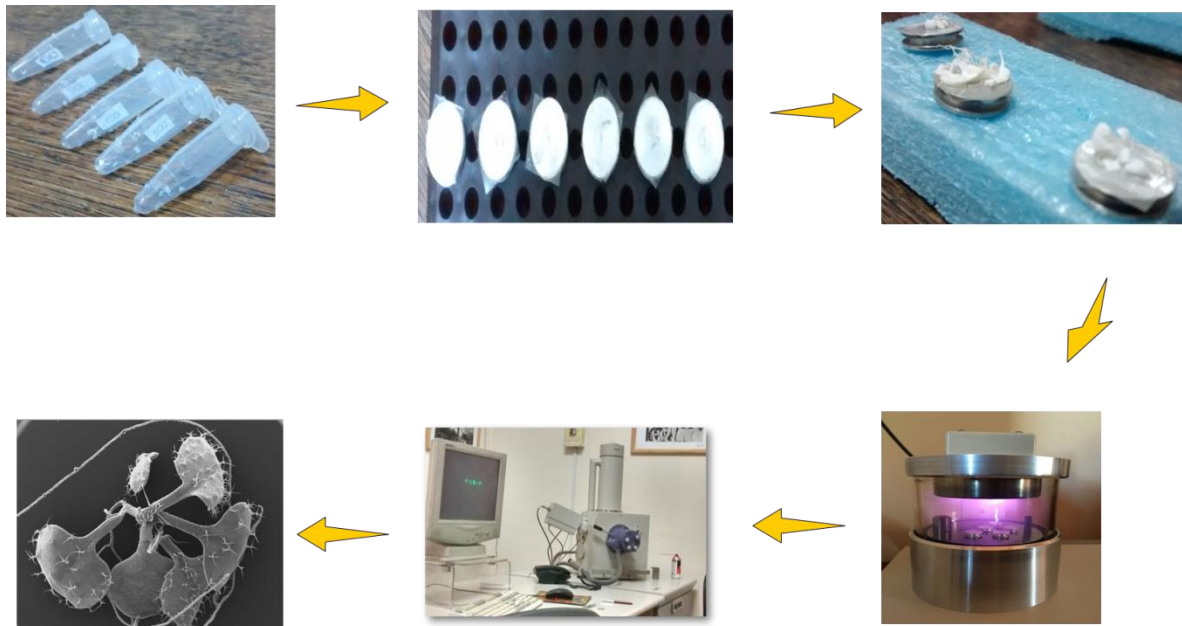


Figura 15: Preparación de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de barrido. Las muestras ya secadas por punto crítico fueron colocadas en porta muestras de aluminio. Luego, fueron metalizadas para realizar su observación (paso 4). Por último, se colocan en el equipo y se toma la fotografía.

Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media \pm desvío estándar (SE). Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de Anova paramétrica, así como la no paramétrica (Kruskal-Wallis). Para determinar cuál test utilizar en cada variable estudiada se evaluaron previamente la homocedasticidad y la normalidad. En el caso de que no se cumplan ninguno de los supuestos mencionados se utilizó la prueba no paramétrica. Si se cumple al menos la homocedasticidad se realizó una prueba de Anova paramétrica, ya que esta Anova es robusta a la falta de normalidad.

Luego de realizada la prueba de Anova, en el caso de que esta de significativa, es decir, que al menos la media de un grupo difiere de la media del resto de los grupos, se procedió a realizar una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (luego de la Anova

paramétrica) o de Dunn (luego de la Anova no paramétrica). Ambas pruebas comparan a todos los grupos contra el control, sin tratar.

Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el p-valor fue menor que 0,05 ($p < 0.05$).

Tratamiento de los residuos

Los residuos de la experimentación que contengan metales pesados, ya sea tierra o medio de cultivo, se colocaron en bolsas color rojo para que luego sean retirados por una empresa que decomisa los residuos peligrosos.

Resultados

Puesta a punto de las condiciones de cultivo de *A. thaliana*

Cultivo en placa de Petri

Para establecer las condiciones de crecimiento y determinar el tiempo en donde se evaluarán las distintas variables, se realizaron cultivos en placa de Petri con medio de cultivo MS con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962). Se prepararon 8 placas con 25ml de medio MS con agar (0,08%); en 4 de ellas se sembraron 5 semillas y en las otras 4 se sembraron 4 semillas, previamente esterilizadas.

Luego se ensayó el protocolo de sincronización, 4 °C durante 72 horas en oscuridad. Cumplido ese plazo, las placas fueron colocadas en la cámara de cultivo a 22 °C y fotoperiodo de día largo.

Tomando todos los resultados en cuenta se decidió, que es mejor sólo sembrar 4 semillas por placa para que estas tengan más espacio para crecer. El pH adecuado del medio de cultivo para el crecimiento debe estar entre 5,5-6. Se comprobó que la temperatura y el fotoperiodo son adecuados, así como también, que los protocolos de esterilización funcionaron correctamente, ya que no hubo presencia de contaminaciones.

Variable	Placas con 4 semillas					Placas con 5 semillas				
	1	2	3	4	Promedio	5	6	7	8	Promedio
Germinación (proporción)	1	1	0,75	1	0,94	0,8	1	1	1	0,95
Hojas a los 7 días Post-germinación	1,5	1,5	1,5	0,5	1,25	1,25	1,4	1	1,4	1,26
Hojas a los 14 días Post-germinación	4	5,33	4,5	4,5	4,58	2,25	2,4	1,6	2,2	2,11
Longitud de la raíz principal (cm)	2,11	4,38	4,7	4,1	3,82	1,32	1,74	1,14	1,23	1,36
Raíces secundarias	1,5	0,3	6,5	1,25	2,39	2,25	3,4	0,8	3,8	2,56

Figura 16: Cuadro comparativo de los resultados de cada variable de estudio según técnica de cultivo en placa de Petri. Cada valor corresponde al promedio de la variable por placa. Los promedios en color rojo, para las variables hojas a los 14 días post-germinación y longitud de raíz principal, son mayores en el cultivo con 4 semillas por placa que en el cultivo de 5 semillas por placa.

Cultivo para el ensayo de floración

Para definir qué tipo de cultivo era el más adecuado y óptimo para realizar el ensayo de floración, se probó el cultivo en medio MS en tubos de ensayo y el cultivo en macetas con tierra, siguiendo los protocolos mencionados anteriormente.

Se decidió utilizar sólo el cultivo en macetas, ya que las plantas se adaptaron muy bien al trasplante y a las condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos fueron aceptables, obteniéndose plantas con un desarrollo normal y que cumplieron de forma adecuada su ciclo de vida. Además, al realizarse este ensayo se corroboró el tiempo y las características a la hora de florecer mencionadas en los antecedentes.

Al crecer las plantas en tubos con medio MS no se obtuvieron buenos resultados ya que, las semillas germinaban y no había contaminaciones, pero a los 7 días la mortalidad era elevada, alrededor del 80%. Esto es el resultado de la siembra de 12 tubos con

dos semillas cada uno, donde sólo 2 tubos fueron viables. Dado esto, se probaron otras variables como colocar los tubos en la cámara de cultivo y disminuir el volumen de medio de cultivo utilizado; los resultados obtenidos fueron los mismos, no pudiéndose determinar la causa de esta problemática.

Puesta a punto del protocolo de fijación para MEB

Con el objetivo de preparar las muestras para el microscopio electrónico de barrido decidimos ensayar un protocolo de fijación que consta en lavados con metanol 99,8% y posterior conservación en etanol 100%, en muestra generadas en placa de Petri con medio MS. Se observaron luego en el MEB obteniéndose las siguientes fotografías (figura 17), comprobándose que las estructuras están conservadas y que este protocolo es útil para la observación de plantines mediante esta técnica.

Con respecto a las semillas, estas no pueden ser observadas en el MEB debido a su tamaño, ya que son muy pequeñas y se pierden.

Se determinó que el tamaño mínimo del brote o plantín tiene que ser de 0,341 cm aproximadamente para que no se extraviara en el proceso.

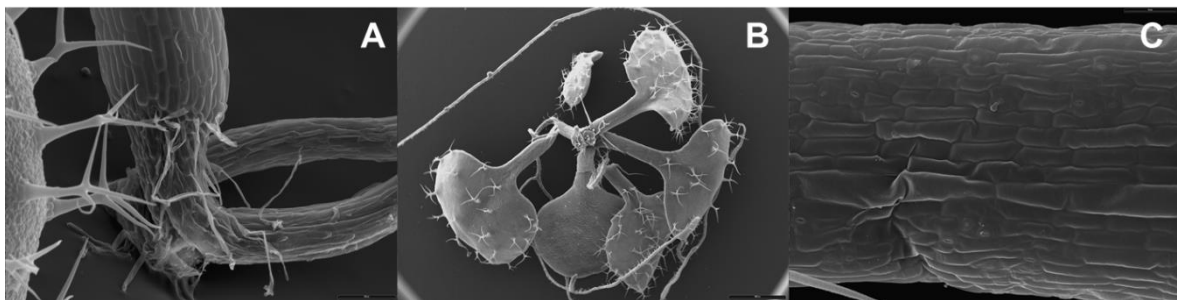


Figura 17: Micrografías del MEB. A) Tricomas de la superficie de la hoja, estructura conservada. B) Plantín con la estructura de hojas y cotiledones conservados. C) Tejido de la hoja, con la estructura celular preservada.

Puesta a punto de la técnica para la medición de raíces

Para la medición de raíces se eligió utilizar el programa provisto por la cámara que está acoplada a la lupa del laboratorio. Se estableció un protocolo, mencionado en materiales y métodos, que consta en extraer el plantín del medio de cultivo, acondicionar la raíz y por ultimo fotografiarla. Una vez obtenida la foto, se procedió a la medición. Este programa nos permitió definir una escala, generando así mediciones lo suficientemente precisas para el análisis de la variabilidad del largo de la raíz en los diferentes tratamientos (figura 13).

Ensayo con sulfato de níquel (NiSO_4)

Con el fin de determinar el efecto del ion níquel en el desarrollo de *A. thaliana* se ensayaron concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 600 μM de NiSO_4 . Para descartar cualquier interacción del ion sulfato (contra ion), realizamos un control con concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 600 μM de Na_2SO_4 .

Germinación

Analizamos en primera instancia el proceso de germinación. No observamos alteraciones en dicho proceso bajo las condiciones analizadas (figura 18).

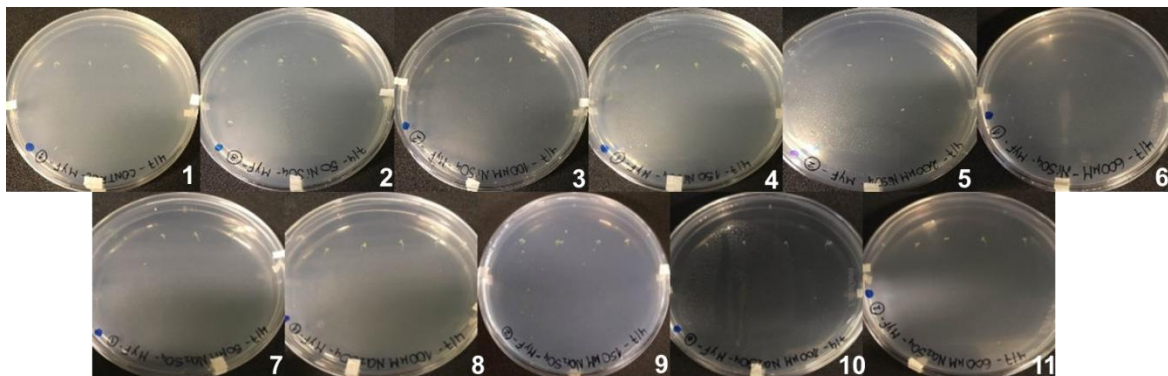


Figura 18: Cultivo de *A. thaliana* al momento de la germinación. Fila superior, tratamientos con NiSO_4 en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con Na_2SO_4 , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 50 μM NiSO_4 **3)** 100 μM NiSO_4 **4)** 150 μM NiSO_4 **5)** 200 μM NiSO_4 **6)** 600 μM NiSO_4 **7)** 50 μM Na_2SO_4 **8)** 100 μM Na_2SO_4 **9)** 150 μM Na_2SO_4 **10)** 200 μM Na_2SO_4 **11)** 600 μM Na_2SO_4 .

Realizamos un análisis estadístico de los resultados obtenidos utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. La variable proporción de germinación no presenta evidencia suficiente de que esta sea afectada por el tratamiento ($p=0.9763$). Como se puede ver en la figura 19 todos los tratamientos presentaron una proporción semejante o igual al control.

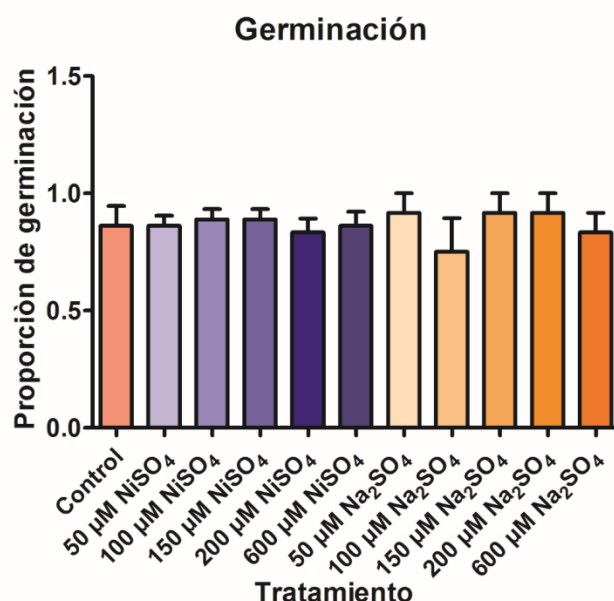


Figura 19: Efecto del sulfato de níquel (NiSO₄) en el proceso germinativo de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con NiSO₄ o Na₂SO₄ en la concentración indicada. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/ tratamiento (control y NiSO₄) o 3 placas/tratamiento (Na₂SO₄). Anova no paramétrica Kruskal-Wallis ($p=0,9763$).

Cantidad de hojas a los 7 días post-germinación

Posteriormente analizamos el número de hojas. A los 7 días post-germinación se realizó el recuento de hojas de cada plántula y se pudo observar que a la concentración de 50 μM hubo un aumento en la cantidad de hojas y a medida que aumentaron las

concentraciones de NiSO₄, la cantidad de hojas disminuyó hasta llegar a cero hojas en la concentración 600 μM (figura 20).

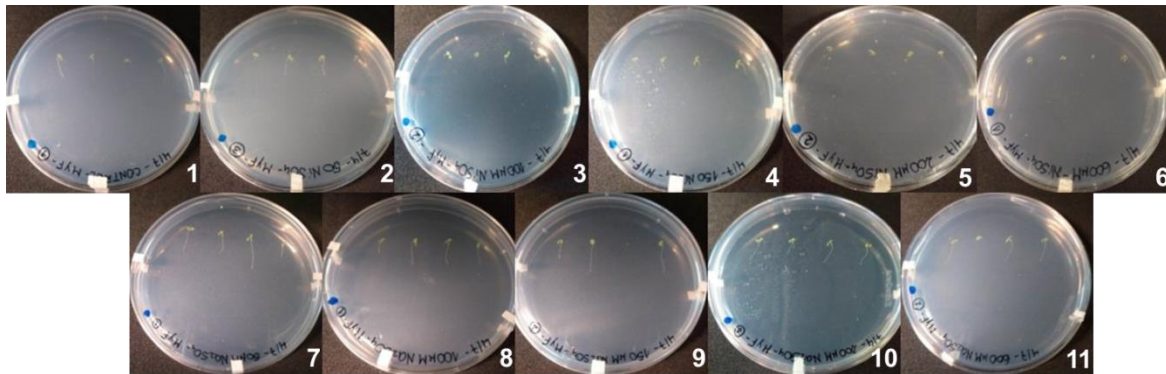


Figura 20: Cultivo de *A. thaliana* a los 7 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con NiSO₄ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con Na₂SO₄, también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 50 μM NiSO₄ **3)** 100 μM NiSO₄ **4)** 150 μM NiSO₄ **5)** 200 μM NiSO₄ **6)** 600 μM NiSO₄ **7)** 50 μM Na₂SO₄ **8)** 100 μM Na₂SO₄ **9)** 150 μM Na₂SO₄ **10)** 200 μM Na₂SO₄ **11)** 600 μM Na₂SO₄.

Al realizar la misma prueba estadística que en la germinación, se determinó que la variable cantidad de hojas se ve afectada significativamente en la concentración de 600 μM ($p < 0,001$), en la cual el crecimiento se detuvo y la planta sólo conservó los cotiledones y la raicilla. El resto de los tratamientos no presentó evidencia suficiente para demostrar que el NiSO₄ a esas concentraciones afecte a la variable de estudio. A pesar de esto, es importante mencionar que se ve una tendencia a la reducción del número de hojas (figura 21).

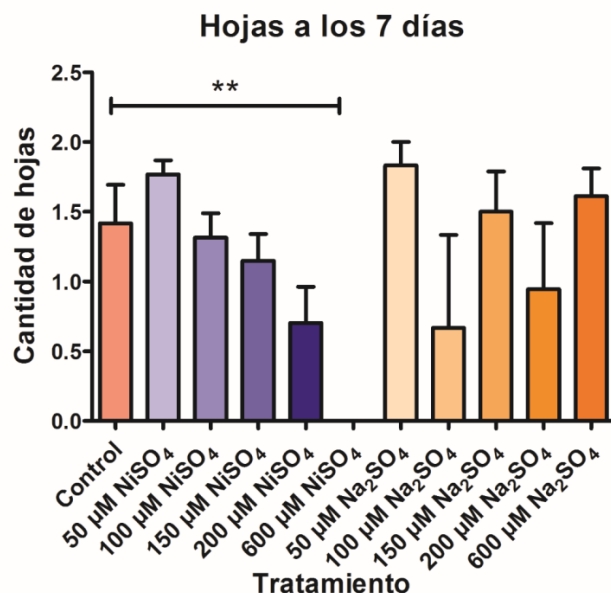


Figura 21: Efecto del sulfato de níquel (NiSO₄) en el desarrollo de las hojas a los 7 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con NiSO₄ o Na₂SO₄ en la concentración indicada. A los 7 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/tratamiento (control y NiSO₄) o 3 placas/tratamiento (Na₂SO₄). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (****p<0,0001).

Cantidad de hojas a los 14 días post-germinación

Análisis similares fueron llevados a cabo a los 14 días post-germinación. Como se puede observar en la figura 23 el NiSO₄ afectó significativamente en las concentraciones de 200 μM (p<0,001) y 600 μM (p<0,0001) comparado con el control. Así mismo, la

concentración de 150 μM muestra una tendencia fuerte a la inhibición, aunque esta no fue significativa.

En el tratamiento con 200 μM se puede observar que el crecimiento en el número de hojas se detuvo o es más lento que en el control (figura 20).

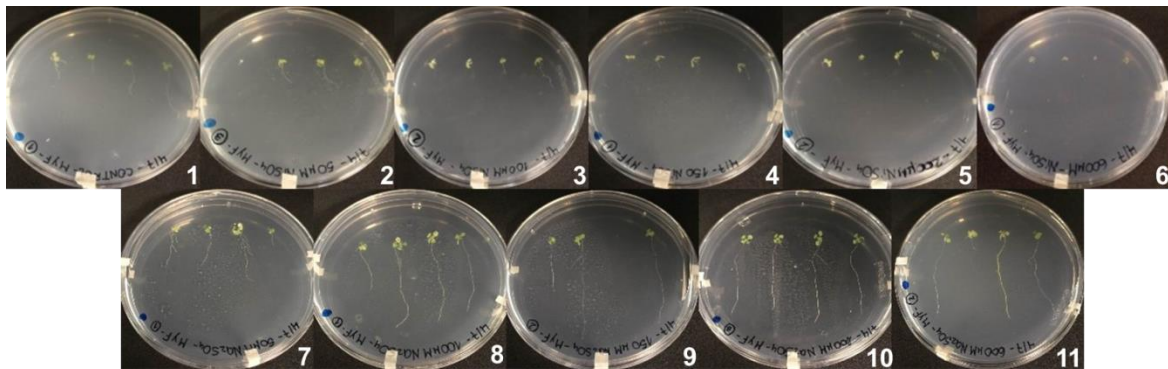


Figura 22: Cultivo de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con NiSO_4 en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con Na_2SO_4 , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 50 μM NiSO_4 **3)** 100 μM NiSO_4 **4)** 150 μM NiSO_4 **5)** 200 μM NiSO_4 **6)** 600 μM NiSO_4 **7)** 50 μM Na_2SO_4 **8)** 100 μM Na_2SO_4 **9)** 150 μM Na_2SO_4 **10)** 200 μM Na_2SO_4 **11)** 600 μM Na_2SO_4 .

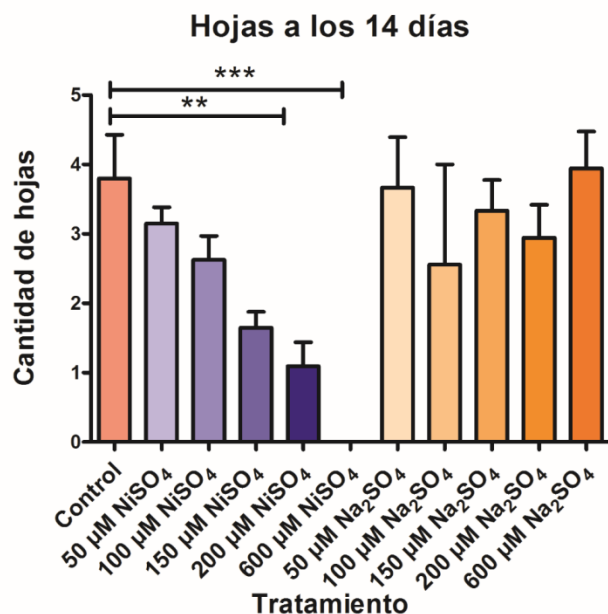


Figura 23: Efecto del sulfato de níquel (NiSO₄) en el desarrollo de las hojas a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con NiSO₄ o Na₂SO₄ en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/tratamiento (control y NiSO₄) o 3 placas/tratamiento (Na₂SO₄). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (****p<0,0001).

Longitud de la raíz principal a los 14 días post-germinación

Paralelamente se midió la longitud de la raíz a los 14 días post-germinación. Para cada concentración ensayada se calculó por placa el promedio. La estadística utilizada fue la misma que en los análisis anteriores, determinando que los tratamientos de 200 μM (p<0,05) y 600 μM (p<0,001) presentan disminución significativa en la variable longitud de

raíz con respecto al control (figura 24). El tratamiento de 150 μM de NiSO_4 también presentó disminución en la variable respuesta, pero no posee significancia.

Así mismo, se puede observar en la figura 24 que las plántulas de las concentraciones de 50 μM y 100 μM de NiSO_4 desarrollaron raíces más largas que el control, pero dicho aumento no es significativo.

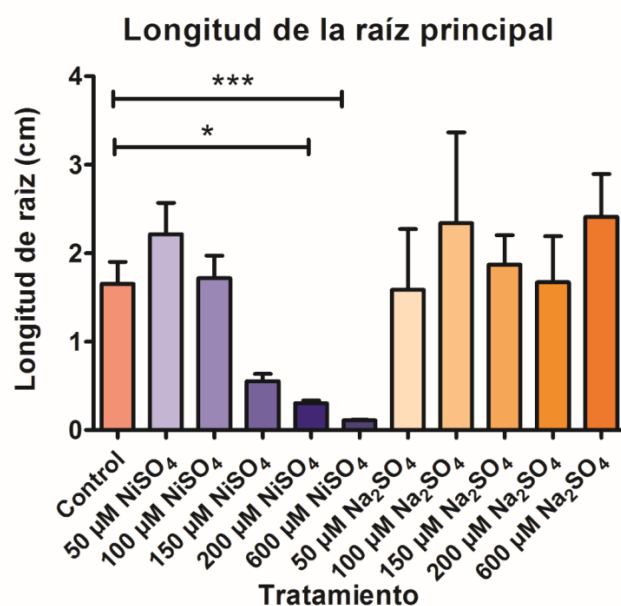


Figura 24: Efecto del sulfato de níquel (NiSO_4) en el desarrollo de la raíz principal a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con NiSO_4 o Na_2SO_4 en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se midió la longitud (cm) de la raíz de cada una de las plantas mediante un software y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control y NiSO_4) o 3 placas/tratamiento (Na_2SO_4). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (**** $p < 0,0001$).

Cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación

Al analizar la cantidad de raíces secundarias, se pudieron observar diferencias significativas. Las concentraciones de 150 μM , 200 μM y 600 μM de NiSO_4 presentaron disminución ($p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente) con respecto al control (figura 25).

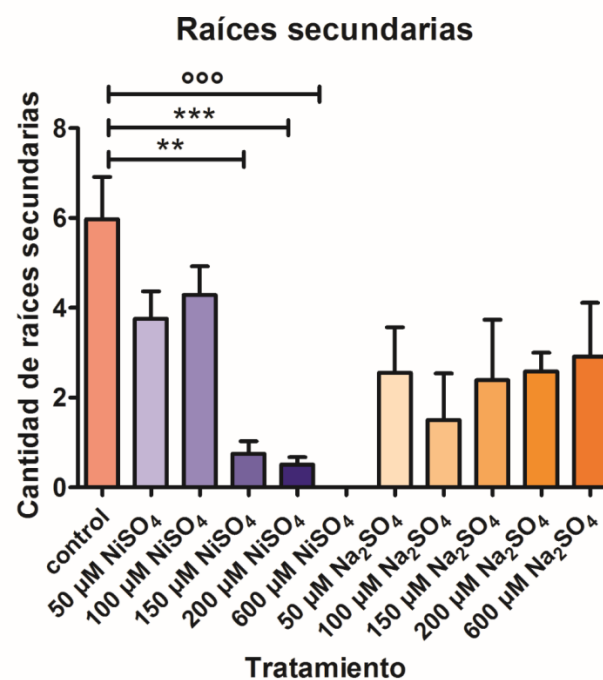


Figura 25: Efecto del sulfato de níquel (NiSO_4) en el desarrollo de las raíces secundarias a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con NiSO_4 o Na_2SO_4 en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de raíces secundarias en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control y NiSO_4) o 3 placas/tratamiento (Na_2SO_4). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (**** $p < 0,0001$).

Floración

La floración fue evaluada como el número de hojas de roseta en el momento en que se observó el meristemo reproductivo, pudiéndose evaluar indirectamente el tiempo de floración (Koorneef *et al*; 1991).

En ninguno de los tratamientos se observó floración fuera de término, el promedio para cada caso de estudio oscilo entre 10-13 hojas de roseta, lo cual concuerda con los resultados publicados para el ecotipo Columbia silvestre. (Koorneef *et al*; 1991) (figura 26).

Para la prueba estadística Anova paramétrica de una vía la variable cantidad de hojas en roseta presenta evidencia suficiente de que existe al menos un grupo que difiere del resto de los grupos, $p=0.0008$. Por ello, a posteriori se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, la cual no presentó cambios significativos de los grupos con el control (figura 27).



Figura 26: Cultivo de *A. thaliana* en tierra para ensayo de floración. Las fotos fueron tomadas entre los 10 y 15 días posteriores a la observación del meristemo reproductivo. Fila superior, tratamientos con NiSO_4 en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con Na_2SO_4 , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= $0 \mu\text{M}$ **2)** $50 \mu\text{M NiSO}_4$ **3)** $100 \mu\text{M NiSO}_4$ **4)** $150 \mu\text{M NiSO}_4$ **5)** $200 \mu\text{M NiSO}_4$ **6)** $600 \mu\text{M NiSO}_4$ **7)** $50 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ **8)** $100 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ **9)** $150 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ **10)** $200 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ **11)** $600 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$.

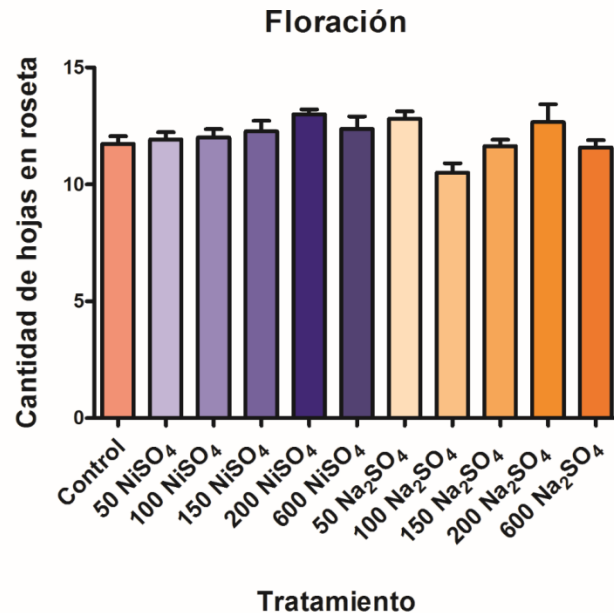


Figura 27: Efecto del sulfato de níquel (NiSO₄) en el proceso de floración de *A. thaliana*. Se germinaron 264 semillas de *A. thaliana* en medio MS solo, a los siete días de la siembra se trasplantaron 2 brotes a cada maceta con tierra (Terrafertil growmix multipro). El primer riego se realizó con agua destilada, sin ningún metal, para reducir el estrés que sufren los plantines al trasplantarlos. Los siguientes riegos se realizaron dos veces por semana, con agua destilada suplementada con NiSO₄ o Na₂SO₄ en la concentración indicada. Las columnas representan la media ± SE de n macetas/ tratamiento (control; NiSO₄; Na₂SO₄).

Efecto del sulfato de sodio

Al realizar el mismo análisis con la sal Na₂SO₄ (control), no se observaron cambios significativos con respecto al control (sin tratar), por lo que se puede adjudicar las variaciones de los tratamientos con NiSO₄ al Ni⁺² (figuras 19 a 27).

Sin embargo, en el recuento de raíces secundarias a los 14 días post-germinación (figura 25), aunque no significativa, se observa una fuerte tendencia a la inhibición de esta variable por lo que el contraíón podría estar afectando el desarrollo.

Análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido

Para realizar un estudio morfológico de los plantines sometidos a los distintos tratamientos, realizamos microscopías electrónicas de barrido.

Como se puede observar en la figura 28 los plantines se ven afectados en su desarrollo general a medida que aumenta la concentración del NiSO₄. En esta técnica, así también como en las mencionadas anteriormente, se puede determinar que en el tratamiento con 600 µM el desarrollo se ve claramente impedido, mientras que a concentraciones menores los cambios no son tan evidentes.

Los tejidos epidérmicos visualizados no presentan cambios morfológicos apreciables mediante esta técnica (figuras 29 y 30).

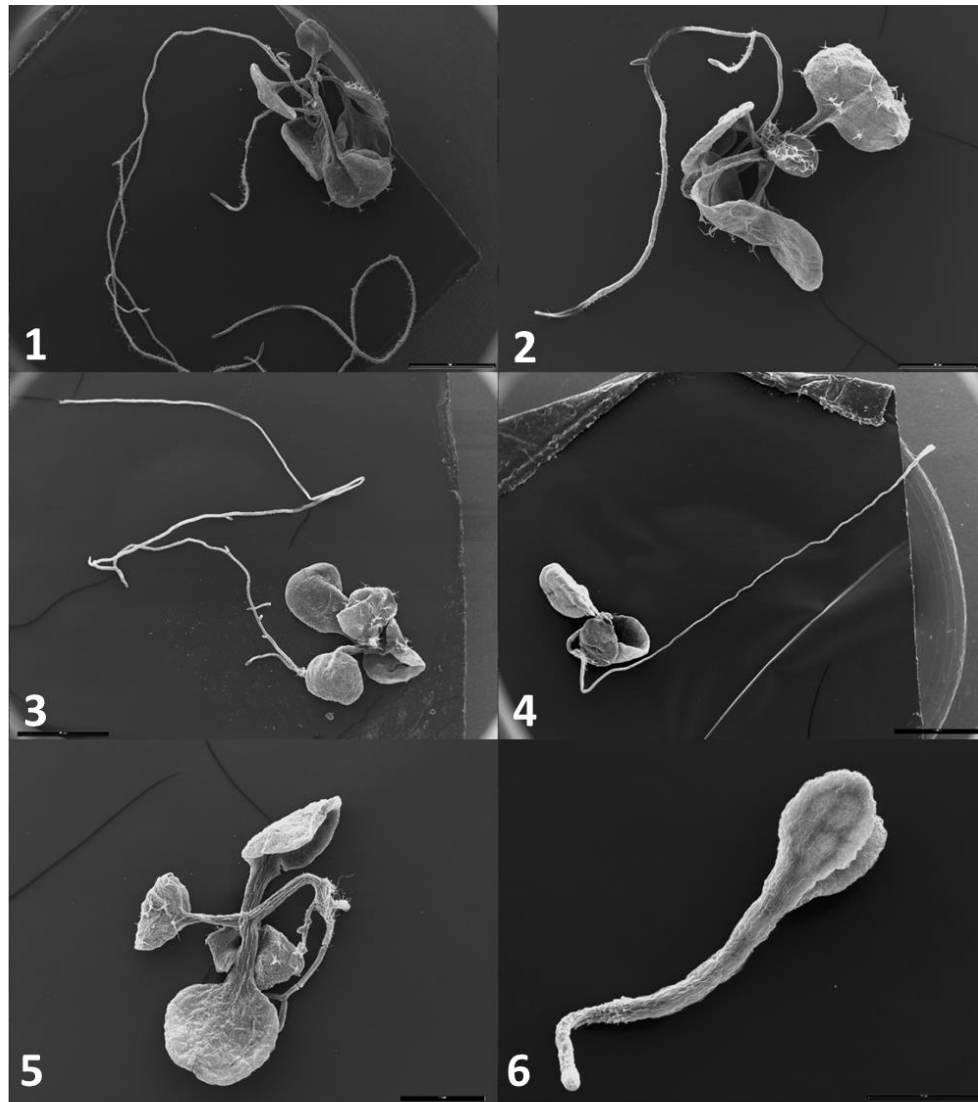


Figura 28: Micrografías electrónicas de barrido de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con NiSO₄. (1) Plantín control (0 μM) Bar= 2000μm. (2) Plantín tratado con 50 μM de NiSO₄. Bar= 1000μm. (3) Plantín tratado con 100 μM de NiSO₄. Bar= 2000μm. (4) Plantín tratado con 150 μM de NiSO₄. Bar= 2000μm. (5) Plantín tratado con 200 μM de NiSO₄. Bar= 1000μm. (6) Semilla germinada (cotiledones y raicilla) tratada con 600 μM de NiSO₄. Bar= 500μm.

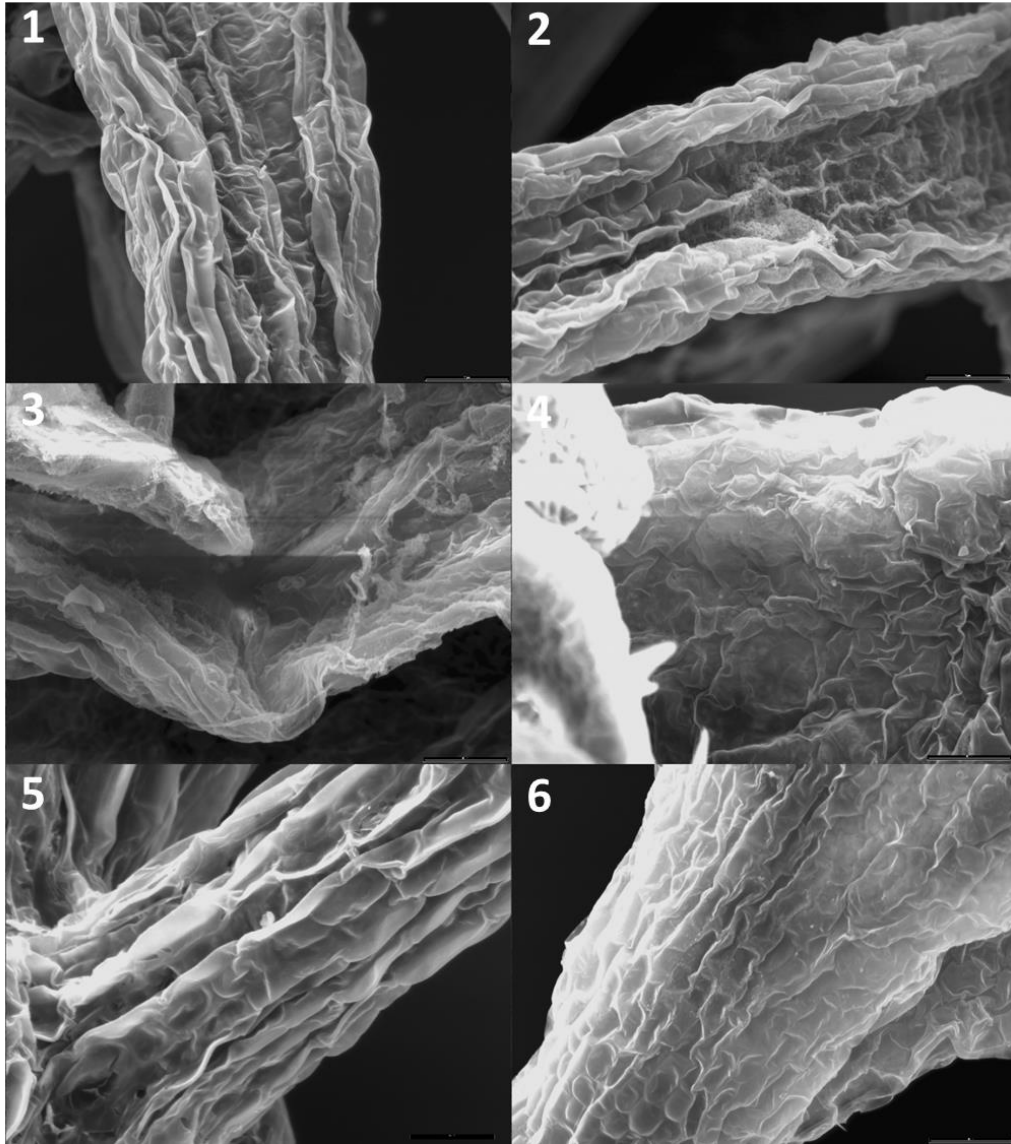


Figura 29: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la hoja de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con NiSO₄. (1) Plantín control (0 μM) Bar= 50μm. (2) Plantín tratado con 50 μM de NiSO₄. Bar= 50μm. (3) Plantín tratado con 100 μM de NiSO₄. Bar= 50μm. (4) Plantín tratado con 150 μM de NiSO₄. Bar= 50μm. (5) Plantín tratado con 200 μM de NiSO₄. Bar= 50μm. (6) Semilla germinada (cotiledones y raicilla) tratada con 600 μM de NiSO₄. Bar= 50μm.

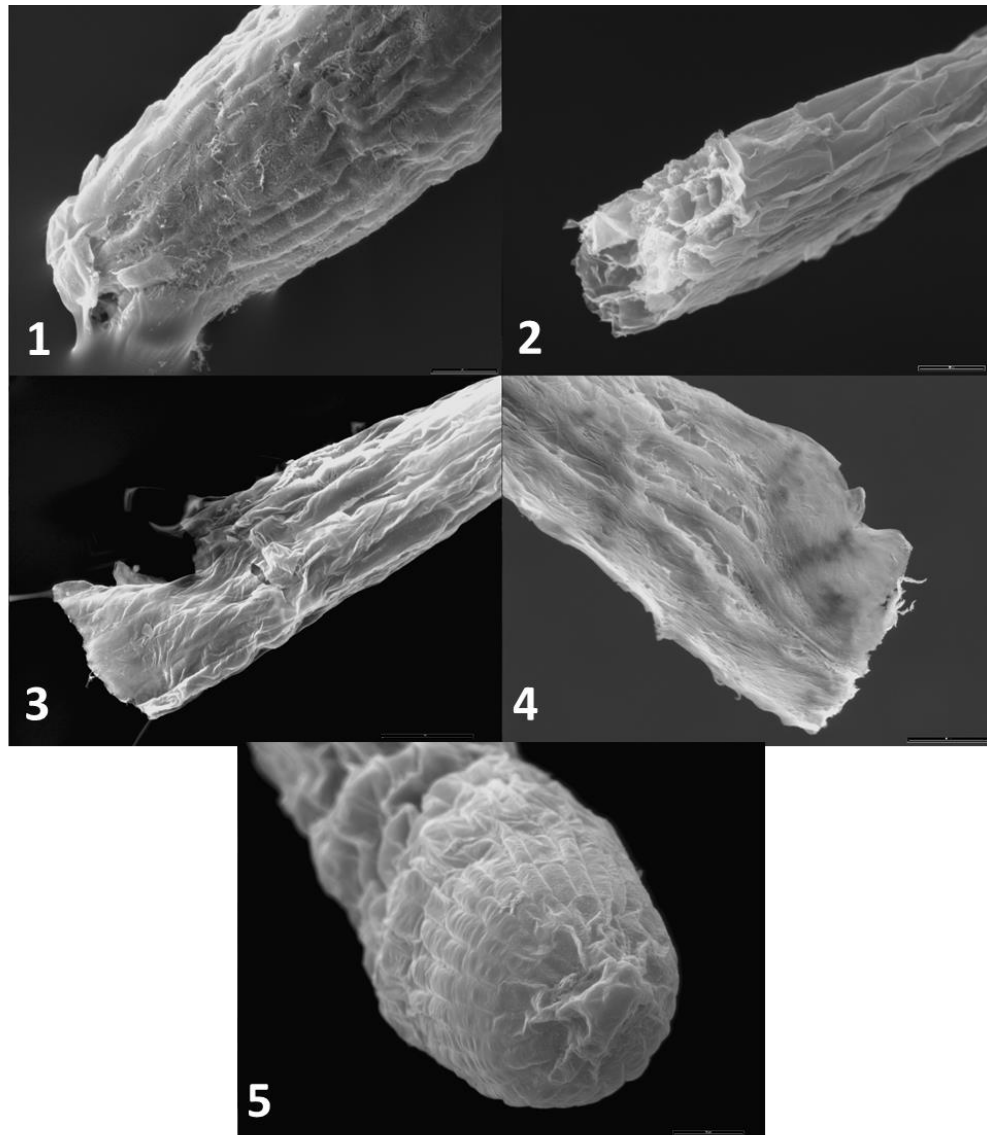


Figura 30: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la raíz de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con NiSO_4 . (1) Plantín control (0 μM) Bar= 20 μm . (2) Plantín tratado con 50 μM de NiSO_4 . Bar= 20 μm . (3) Plantín tratado con 100 μM de NiSO_4 . Bar= 50 μm . (4) Plantín tratado con 150 μM de NiSO_4 . Bar= 50 μm . (5) Semilla germinada (cotiledones y raicilla) tratada con 600 μM de NiSO_4 . Bar= 20 μm .

Ensayo con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Con el objetivo de evaluar el efecto del Cr^{+6} en el desarrollo de *A. thaliana* se ensayaron distintas concentraciones de la sal dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (0, 100, 150, 200, 250 y 600 μM). Para descartar el posible efecto del ion K^+ se ensayaron diferentes concentraciones de KCl (Cloruro de potasio) 200, 300, 400, 500 y 1200 μM . En este caso las concentraciones de KCl son el doble de las de $K_2Cr_2O_7$, ya que la molécula del dicromato posee el doble de átomos de K^+ que el KCl.

Germinación

En el caso del cromo, se pudo determinar que a concentraciones superiores a 150 μM el metal retrasa o impide la germinación ($p < 0,0001$). Para las concentraciones de 200 y 250 μM de $K_2Cr_2O_7$ la germinación se retrasa, las plántulas sólo presentan raicilla y no se observa la presencia de cotiledones. A 600 μM se inhibe la germinación completamente (figura 31).

Se continuó con un posterior análisis de Dunnett de comparaciones múltiples, ya que los resultados de la prueba presentaron evidencia suficiente de que existe al menos un grupo cuya media es diferente a la media del resto de los grupos. Como se puede observar en la figura 32, el $K_2Cr_2O_7$ afecta significativamente al proceso germinativo en las concentraciones de 200 μM ($p < 0,0001$), 250 μM ($p < 0,0001$) y 600 μM ($p < 0,001$).

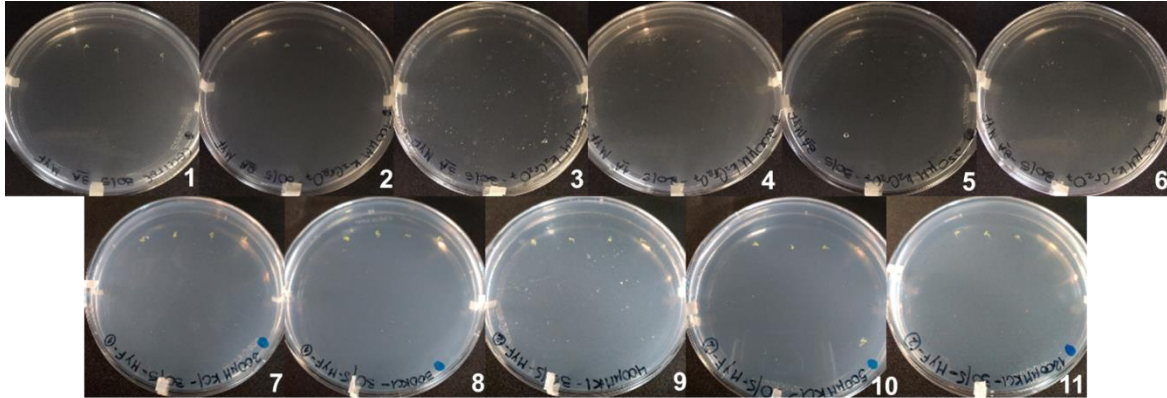


Figura 31: Cultivo de *A. thaliana* al momento de la germinación. Fila superior, tratamientos con $K_2Cr_2O_7$ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl, también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 100 μM $K_2Cr_2O_7$ **3)** 150 μM $K_2Cr_2O_7$ **4)** 200 μM $K_2Cr_2O_7$ **5)** 250 μM $K_2Cr_2O_7$ **6)** 600 μM $K_2Cr_2O_7$ **7)** 200 μM KCl **8)** 300 μM KCl **9)** 400 μM KCl **10)** 500 μM KCl **11)** 1200 μM KCl.

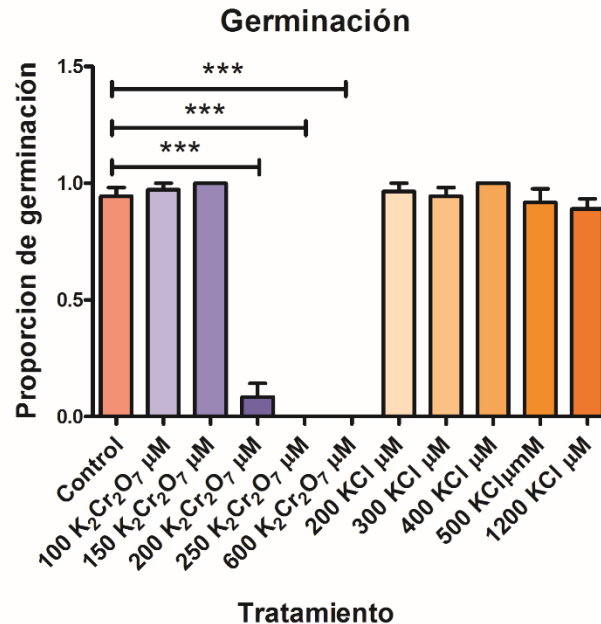


Figura 32: Efecto del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en el proceso germinativo de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con $K_2Cr_2O_7$ o KCl en la concentración indicada. A los 6 días post-siembrá se calculó la proporción de semillas germinadas por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control, $K_2Cr_2O_7$ y KCl). * señala resultados significativos del Anova paramétrica de una vía con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (**** $p < 0,0001$).

Cantidad de hojas a los 7 días post-germinación

Seguidamente, a los 7 días post-germinación se realizó el recuento de hojas de cada plántula y se pudo observar que a partir de 200 μM hubo una disminución en el número de hojas, este fenómeno podría tener una correlación con la germinación tardía previamente observada (figura 33).

Al realizar el análisis estadístico de los resultados no obtuvimos diferencias significativas ($p=0,3933$). Por lo tanto, no existe evidencia suficiente de que al menos un grupo presente en promedio cantidad de hojas diferente al promedio de hojas del resto de los grupos (figura 34).

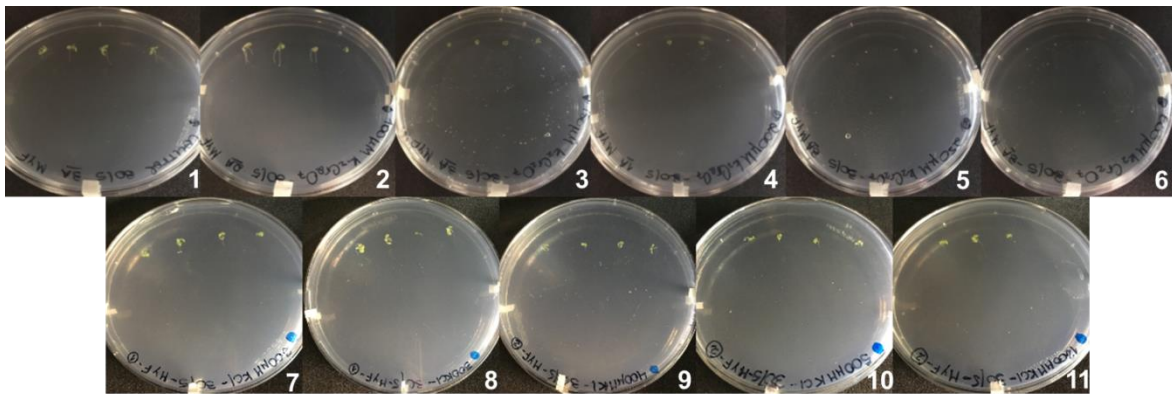


Figura 33: Cultivo de *A. thaliana* a los 7 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con $K_2Cr_2O_7$ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl, también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= $0 \mu M$ **2)** $100 \mu M K_2Cr_2O_7$ **3)** $150 \mu M K_2Cr_2O_7$ **4)** $200 \mu M K_2Cr_2O_7$ **5)** $250 \mu M K_2Cr_2O_7$ **6)** $600 \mu M K_2Cr_2O_7$ **7)** $200 \mu M KCl$ **8)** $300 \mu M KCl$ **9)** $400 \mu M KCl$ **10)** $500 \mu M KCl$ **11)** $1200 \mu M KCl$.

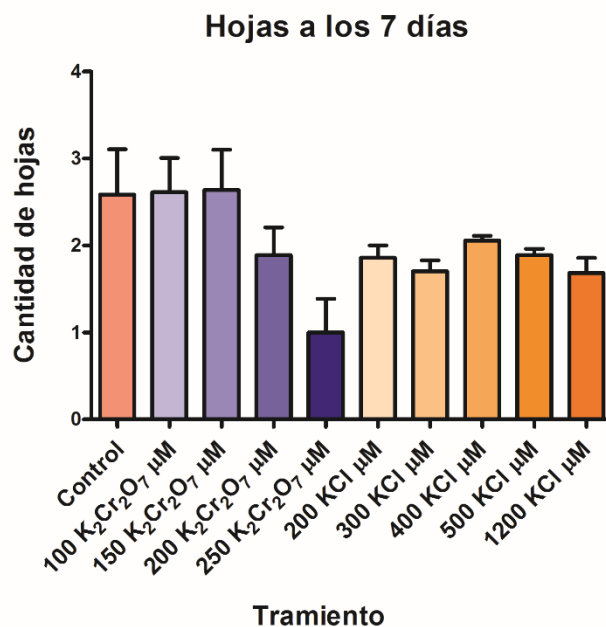


Figura 34: Efecto del dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en el desarrollo de las hojas a los 7 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con K₂Cr₂O₇ o KCl en la concentración indicada. A los 7 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/tratamiento (control, K₂Cr₂O₇ y KCl). Anova no paramétrica Kruskal-Wallis (p=0,3933)

Cantidad de hojas a los 14 días post-germinación

Posteriormente, se repitió el proceso de recuento de hojas a los 14 días post-germinación y se pudo observar que a medida que se fue aumentando la cantidad de K₂Cr₂O₇ la cantidad de hojas fue disminuyendo y las plántulas tuvieron menor tamaño (figura 35).

Para el análisis de esta variable se realizó un test de Anova paramétrico, su p-valor fue menor que 0,0001 por lo que hay evidencias suficientes de que al menos uno de los grupos presenta un promedio de cantidad de hojas diferente al promedio de cantidad de hojas

de los otros grupos. Para evaluar dicha diferencia se realizó una prueba de Dunnett de comparaciones múltiples (figura 36). Esta última prueba dio como resultado que hubo una disminución significativa en la cantidad de hojas en las concentraciones de 200 μM ($p < 0,0001$) y 250 μM ($p < 0,0001$) de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

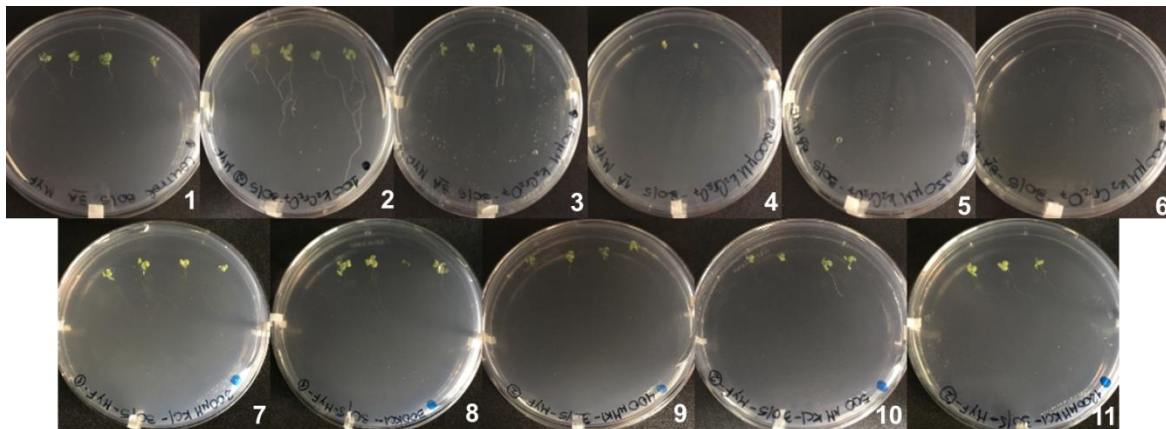


Figura 35: Cultivo de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 100 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ **3)** 150 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ **4)** 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ **5)** 250 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ **6)** 600 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ **7)** 200 μM KCl **8)** 300 μM KCl **9)** 400 μM KCl **10)** 500 μM KCl **11)** 1200 μM KCl .

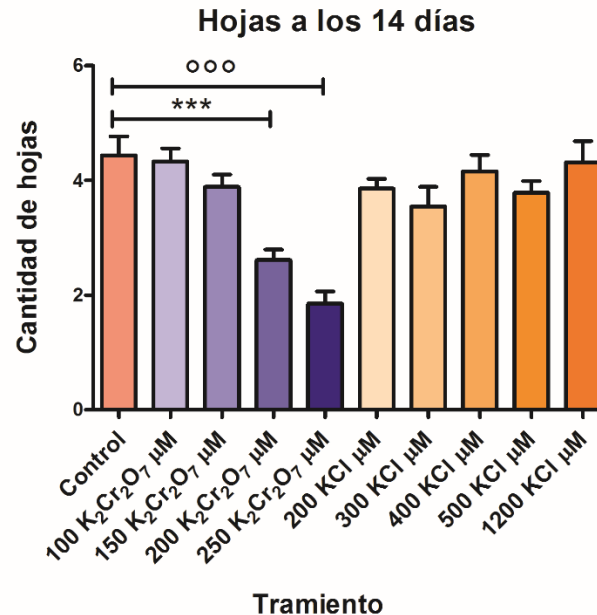


Figura 36: Efecto del dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en el desarrollo de las hojas a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con K₂Cr₂O₇ o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/ tratamiento (control, K₂Cr₂O₇ y KCl). * señala resultados significativos del Anova paramétrica de una vía con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (****p<0,0001).

Longitud de la raíz principal a los 14 días post-germinación

Simultáneamente, a los 14 días post-germinación se realizó la medición de la raíz principal de cada planta y se calculó un promedio por placa para cada concentración ensayada.

La prueba estadística utilizada fue una Anova no paramétrica la cual presentó resultados significativos. Se pudo observar la disminución de la longitud de la raíz para las concentraciones de 200 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($p < 0,05$) y 250 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($p < 0,001$) con respecto al control (figura 37).

Se presentó en la concentración de 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ un aumento apreciable en la longitud de la raíz con respecto al control, pero este no fue significativo.

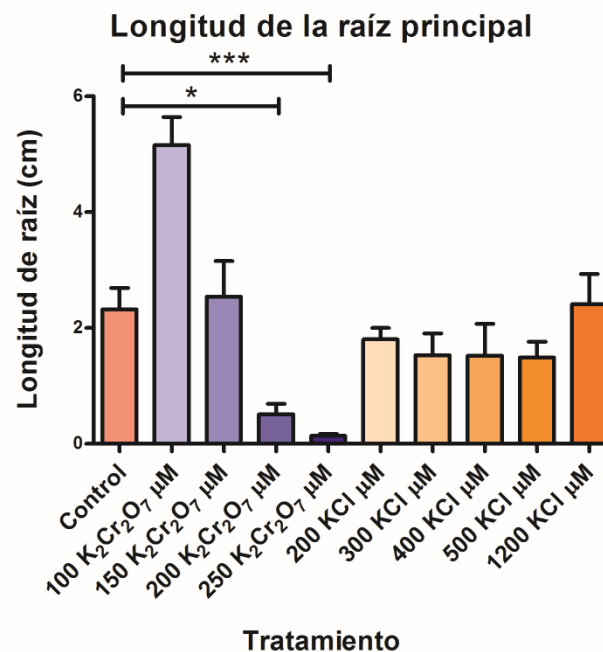


Figura 37: Efecto del dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en el desarrollo de la raíz principal a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se midió la longitud (cm) de la raíz de cada una de las plantas mediante un software y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y KCl). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (**** $p < 0,0001$).

Cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación

El análisis de las raíces secundarias reveló que hubo un aumento importante pero no significativo, en las concentraciones de 100 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 150 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ con respecto al control. Sin embargo, a partir de la concentración de 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la prueba estadística y las observaciones determinaron que hay evidencias suficientes de que el dicromato de potasio afecta la cantidad de raíces secundarias. Los p-valores fueron $<0,001$ para 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $<0,01$ para 250 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (figura 38).

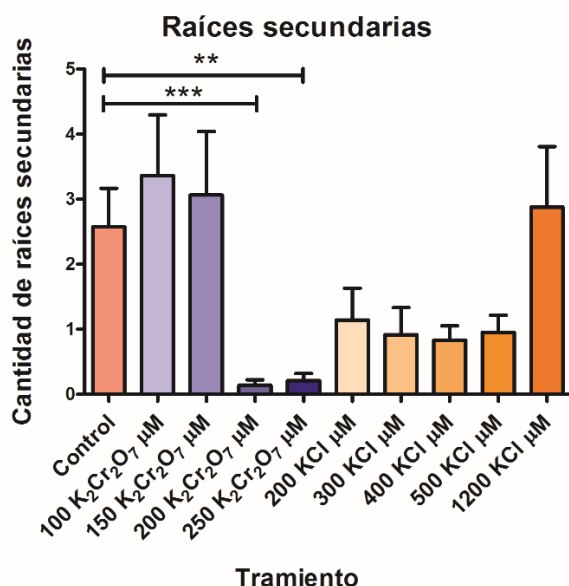


Figura 38: Efecto del dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en el desarrollo de las raíces secundarias a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de raíces secundarias en cada una de plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y KCl). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (****p<0,0001).

Floración

El tiempo de floración no presentó cambios apreciables. Se evaluó mediante Anova paramétrica ($p=0,006$). Posteriormente, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Esta última prueba estadística no presentó cambios significativos de los grupos con respecto al control (figura 40).

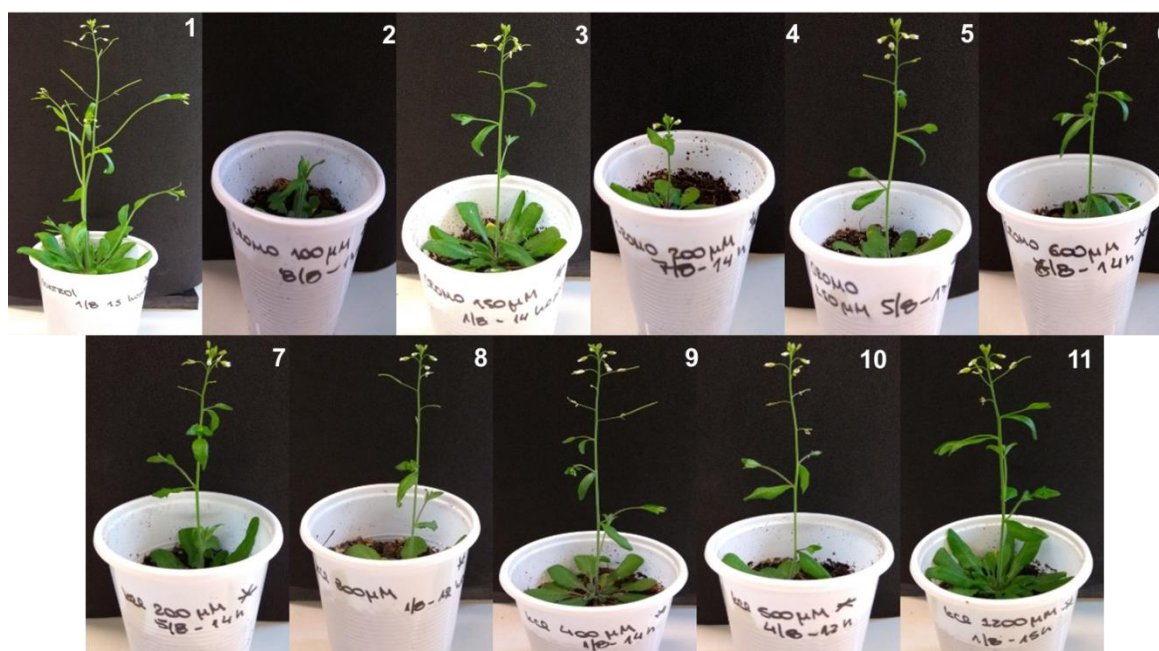


Figura 39: Cultivo de *A. thaliana* en tierra para ensayo de floración. Las fotos fueron tomadas entre los 10 y 15 días posteriores a la observación del meristemo reproductivo. Fila superior, tratamientos con $K_2Cr_2O_7$ en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= $0 \mu M$ **2)** $50 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ **3)** $100 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ **4)** $150 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ **5)** $200 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ **6)** $600 \mu M$ $K_2Cr_2O_7$ **7)** $200 \mu M$ KCl **8)** $300 \mu M$ KCl **9)** $400 \mu M$ KCl **10)** $500 \mu M$ KCl **11)** $1200 \mu M$ KCl.

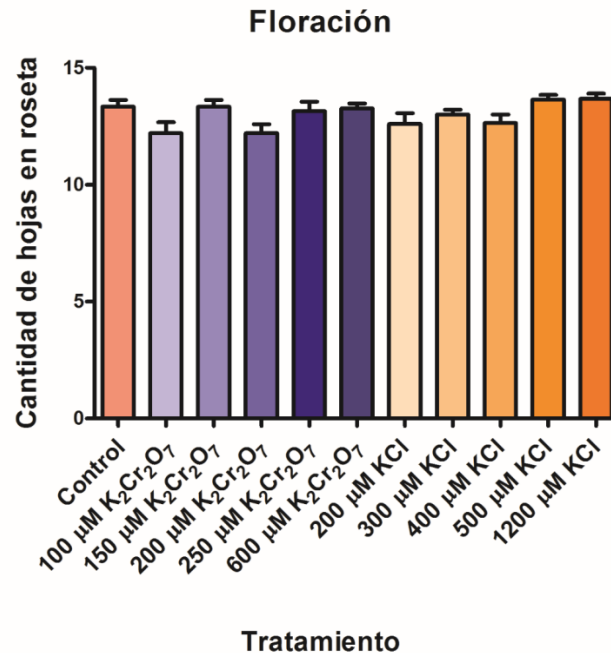


Figura 40: Efecto del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en el proceso de floración de *A. thaliana*. Se germinaron semillas de *A. thaliana* en medio MS solo, a los siete días de la siembra se trasladaron a macetas con tierra (Terrafertil growmix multipro). El primer riego se realizó con agua destilada, sin ningún metal, para reducir el estrés que sufren los plantines al trasladarlos. Los siguientes riegos se realizaron dos veces por semana, con agua destilada suplementada con $K_2Cr_2O_7$ o KCl en la concentración indicada. Las columnas representan la media \pm SE de n macetas/ tratamiento (control; $K_2Cr_2O_7$; KCl). Anova paramétrica de una vía ($p=0,006$) con posterior análisis de comparaciones múltiples de Dunnett.

Efecto del cloruro de potasio

Para la evaluación del contra ion K^+ , se ensayaron concentraciones de 200, 300, 400, 500 y 1200 μM KCl. La evaluación del efecto de esta sal se realizó en conjunto con la sal de dicromato.

Se determinó que no hubo variaciones significativas con respecto al control, por lo que se puede adjudicar las variaciones observadas al ion $Cr_2O_7^{-2}$ (figuras 31 a 40). A pesar de esto, en la figura 38, donde se muestran los resultados para la variable cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación, se observa una fuerte inhibición del desarrollo de las mismas excepto para la concentración 1200 μM donde el efecto es estimuladorio.

Análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido

A medida que aumenta la concentración del metal en estudio ($K_2Cr_2O_7$) como se puede observar en las microscopías de barrido electrónico (figura 41) el desarrollo del plantín, en general, se ve afectado.

Los tejidos epidérmicos visualizados y el meristemo apical presentan cambios morfológicos apreciables mediante esta técnica. A medida que aumenta la concentración de la sal se observa que los tejidos aumentan su rugosidad (figuras: 42, 43 y 44).

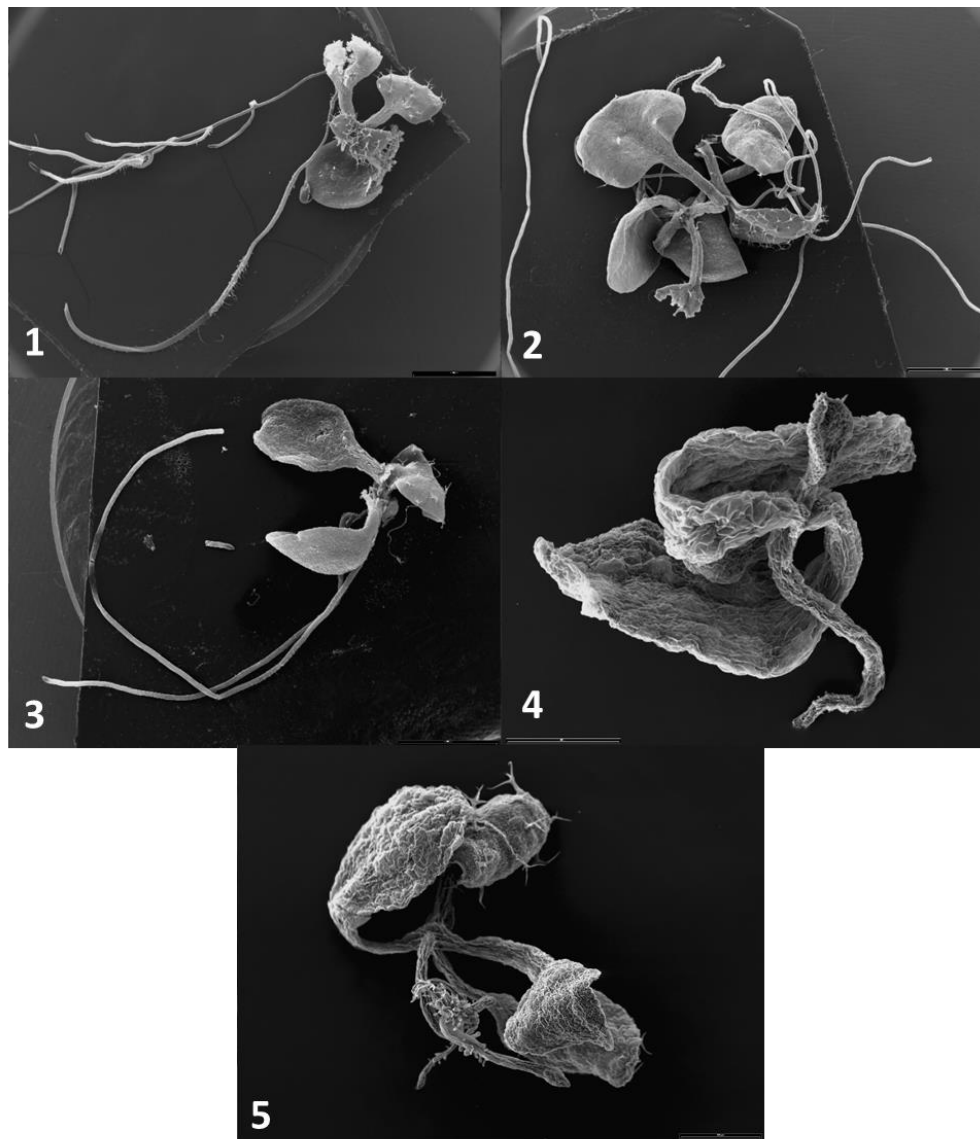


Figura 41: Micrografías electrónicas de barrido de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$. (1) Plantín control ($0 \mu M$) Bar= $2000 \mu m$. (2) Plantín tratado con $100 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $2000 \mu m$. (3) Plantín tratado con $150 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $2000 \mu m$. (4) Plantín tratado con $200 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $500 \mu m$. (5) Plantín tratado con $250 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $500 \mu m$. (6) Muestra de la concentración $600 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$ ausente, se extravió en el proceso de secado por punto crítico.

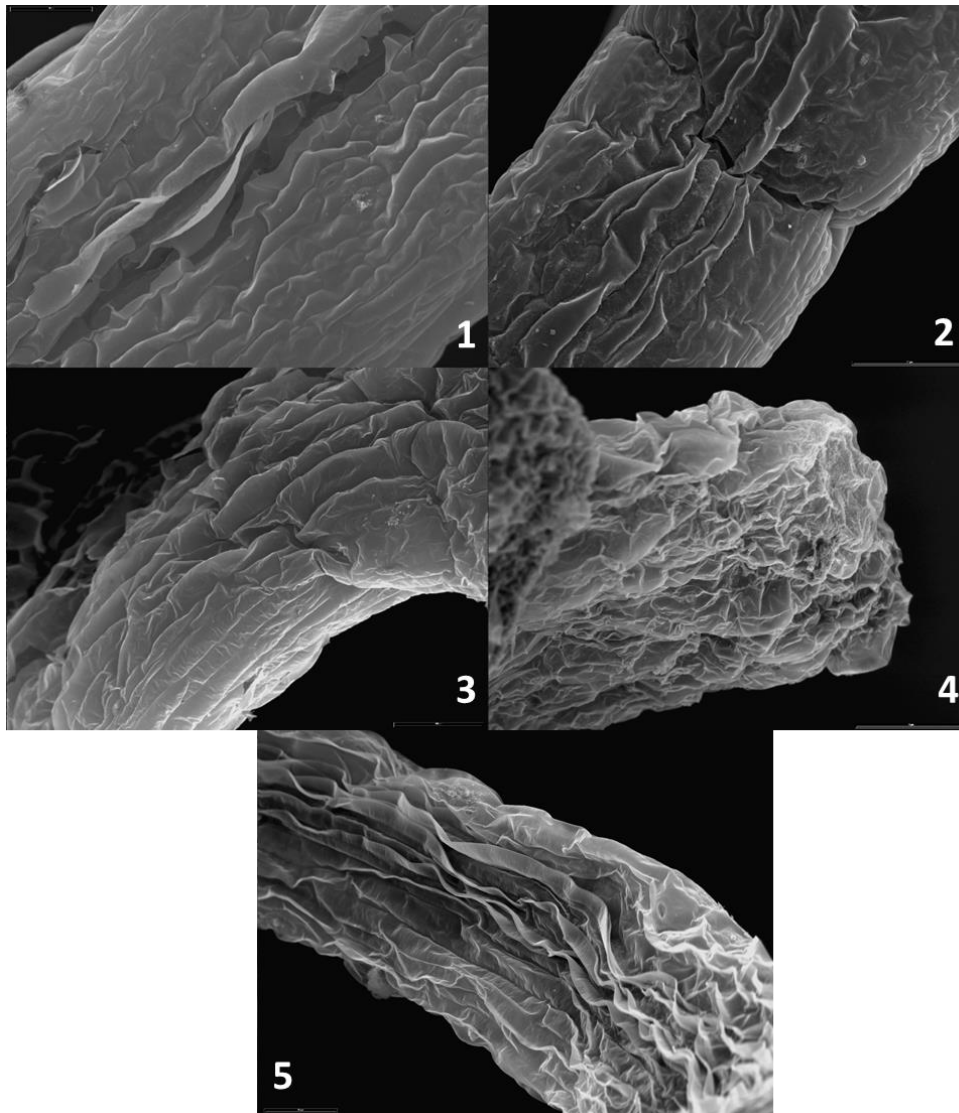


Figura 42: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la hoja de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$. (1) Plantín control (0 μM) Bar= 50 μm . (2) Plantín tratado con 100 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 100 μm . (3) Plantín tratado con 150 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 100 μm . (4) Plantín tratado con 200 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 100 μm . (5) Plantín tratado con 250 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 50 μm . (6) Muestra de la concentración 600 μM de $K_2Cr_2O_7$ ausente, se extravió en el proceso de secado por punto crítico.

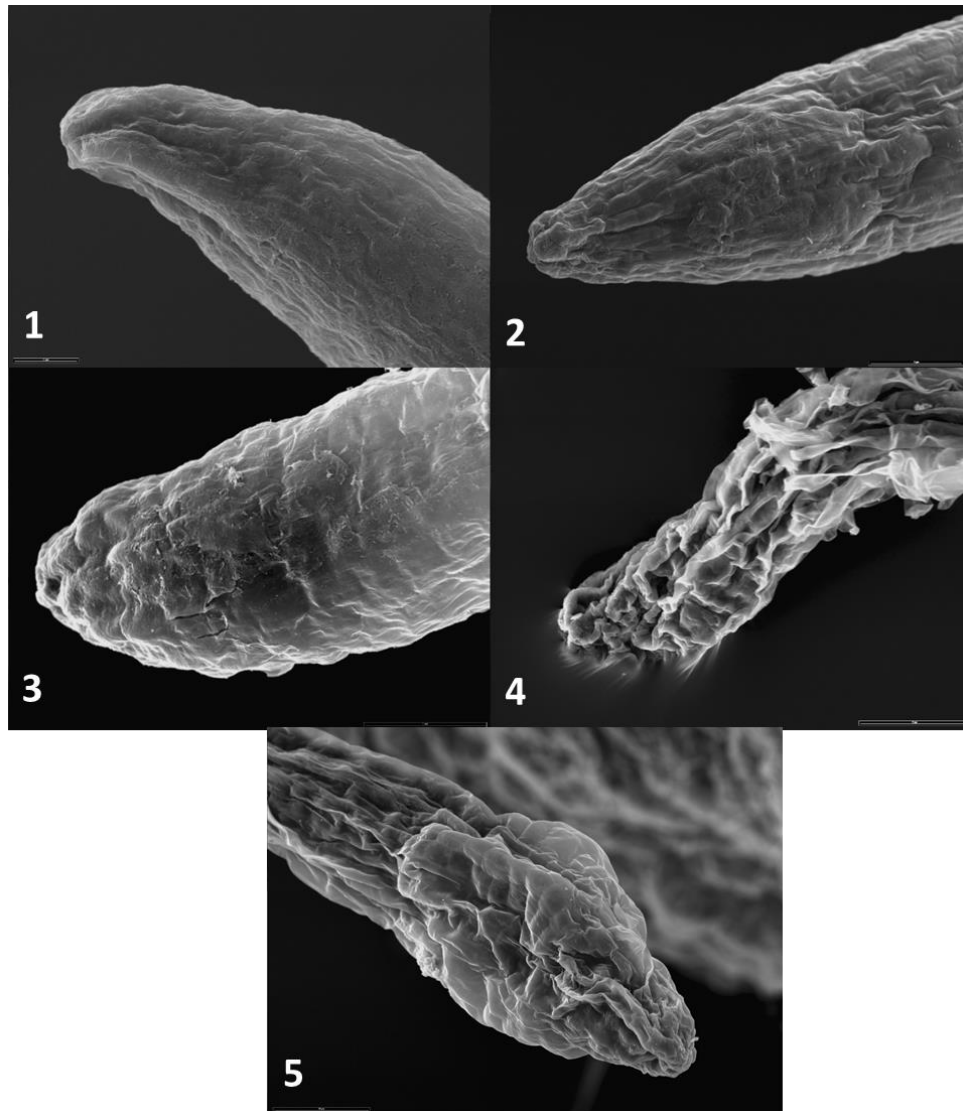


Figura 43: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la raíz de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$. (1) Plantín control ($0 \mu M$) Bar= $20 \mu m$. (2) Plantín tratado con $100 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $50 \mu m$. (3) Plantín tratado con $150 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $50 \mu m$. (4) Plantín tratado con $200 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $50 \mu m$. (5) Plantín tratado con $250 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$. Bar= $50 \mu m$. (6) Muestra de la concentración $600 \mu M$ de $K_2Cr_2O_7$ ausente, se extravió en el proceso de secado por punto crítico.

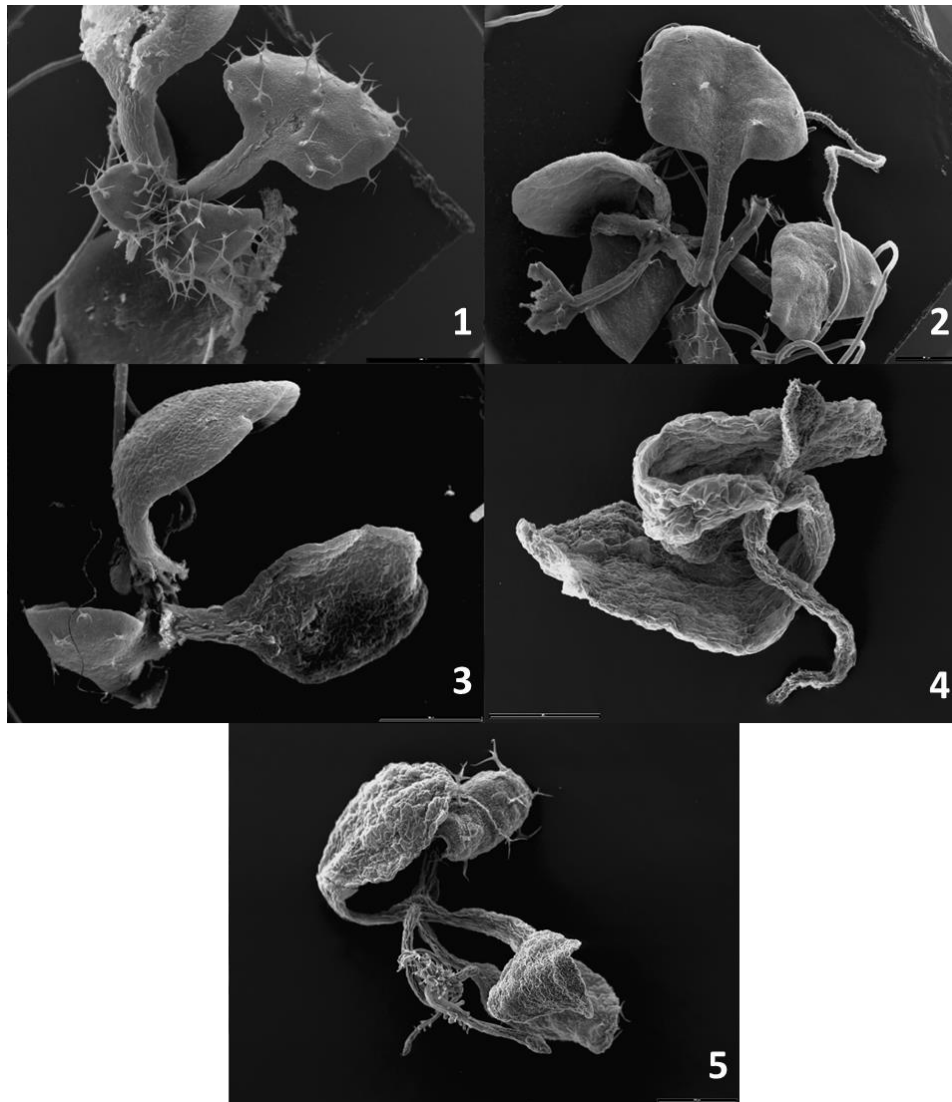


Figura 44: Micrografías electrónicas de barrido del meristema apical del tallo de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con $K_2Cr_2O_7$. (1) Plantín control (0 μM) Bar= 1000 μm . (2) Plantín tratado con 100 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 1000 μm . (3) Plantín tratado con 150 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 1000 μm . (4) Plantín tratado con 200 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 500 μm . (5) Plantín tratado con 250 μM de $K_2Cr_2O_7$. Bar= 500 μm . (6) Muestra de la concentración 600 μM de $K_2Cr_2O_7$ ausente, se extravió en el proceso de secado por punto crítico.

Ensayo con cloruro de plomo (PbCl₂)

Para analizar los efectos del Pb²⁺ ensayamos concentraciones crecientes de PbCl₂ (0; 250; 500; 800; 1000 y 1250 μM) Como control se utilizó KCl en las mismas concentraciones.

Germinación

Al analizar el efecto del metal en la germinación observamos que ninguna de las concentraciones ensayadas afecta dicho proceso. Se realizó un test de Anova (p= 0,0443), con posterior prueba de comparaciones múltiples y esta no mostro resultados significativos (figura 45 y 46).

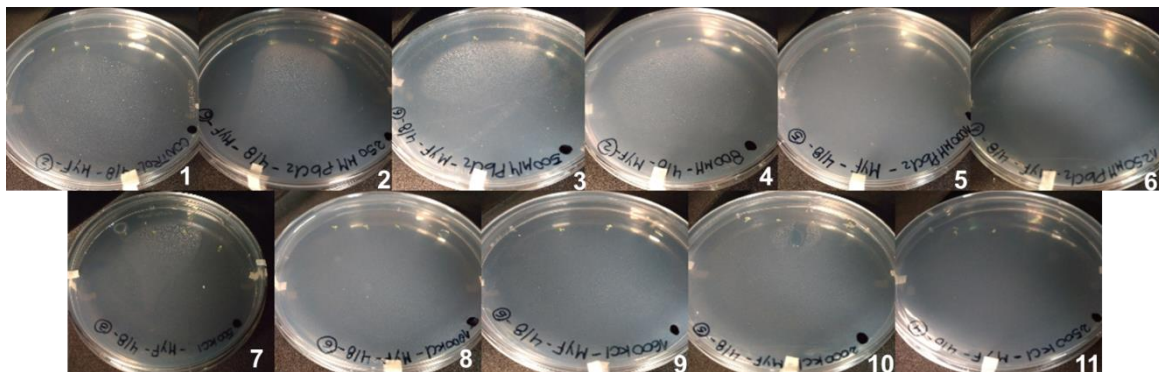


Figura 45: Cultivo de *A. thaliana* al momento de la germinación. Fila superior, tratamientos con PbCl₂ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl, también en concentración ascendente de izquierda a derecha. 1) Control= 0 μM 2) 250 μM PbCl₂ 3) 500 μM PbCl₂ 4) 800 μM PbCl₂ 5) 1000 μM PbCl₂ 6) 1250 μM PbCl₂ 7) 500 μM KCl 8) 1000 μM KCl 9) 1600 μM KCl 10) 2000 μM KCl 11) 2500 μM KCl.

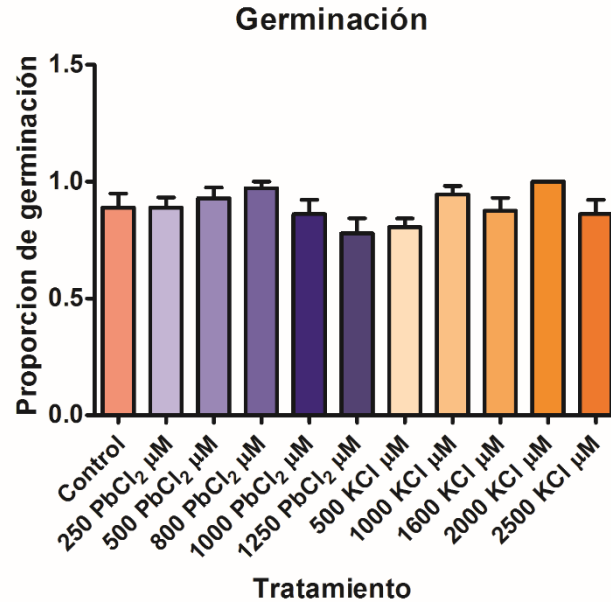


Figura 46: Efecto del cloruro de plomo (PbCl₂) en el proceso germinativo de *A. thaliana*. Se sembraron 4 semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con PbCl₂ o KCl en la concentración indicada. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/ tratamiento (control, PbCl₂ y KCl). Anova paramétrica de una vía con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (p=0,0443).

Cantidad de hojas a los 7 días post-germinación

Posteriormente analizamos el número de hojas 7 días post-germinación. Como se puede observar en la figura 48 no encontramos variaciones en el número de hojas en ninguno de los tratamientos ($p=0,1229$).

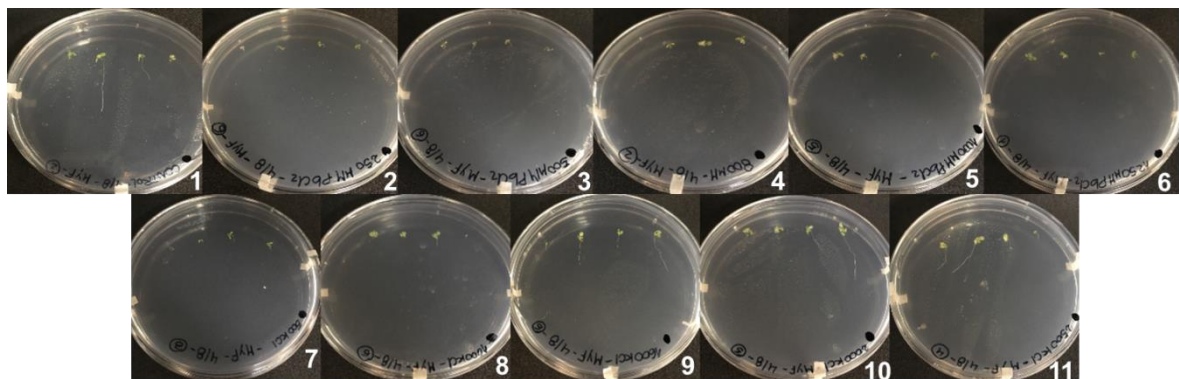


Figura 47: Cultivo de *A. thaliana* a los 7 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con $PbCl_2$ en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= $0 \mu M$ **2)** $250 \mu M PbCl_2$ **3)** $500 \mu M PbCl_2$ **4)** $800 \mu M PbCl_2$ **5)** $1000 \mu M PbCl_2$ **6)** $1250 \mu M PbCl_2$ **7)** $500 \mu M KCl$ **8)** $1000 \mu M KCl$ **9)** $1600 \mu M KCl$ **10)** $2000 \mu M KCl$ **11)** $2500 \mu M KCl$.

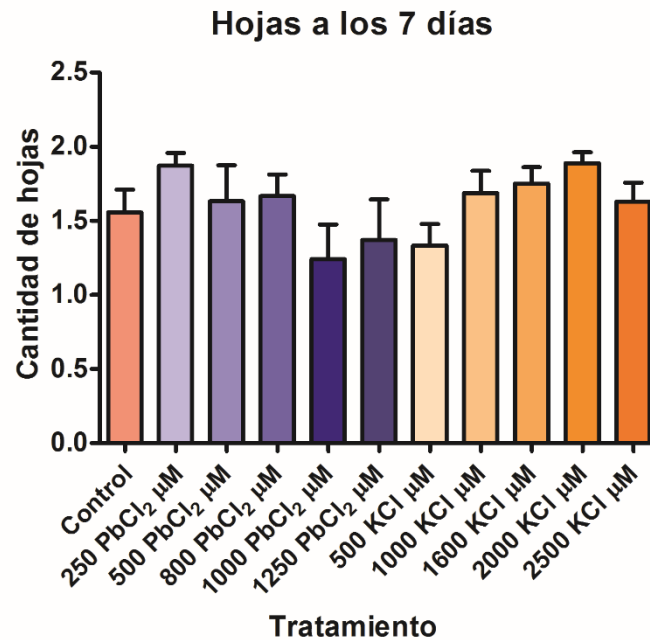


Figura 48: Efecto del cloruro de plomo (PbCl₂) en el desarrollo de las hojas a los 7 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con PbCl₂ o KCl en la concentración indicada. A los 7 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/ tratamiento (control, PbCl₂ y KCl). Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis (p=0,1229).

Cantidad de hojas a los 14 días post-germinación

Al analizar el número de hojas 14 días post-germinación si observamos diferencias significativas con respecto al control para la concentraciones de 1000 y 1250 μM de PbCl₂ (p<0,01 y p<0,05) (figura 49 y 50).

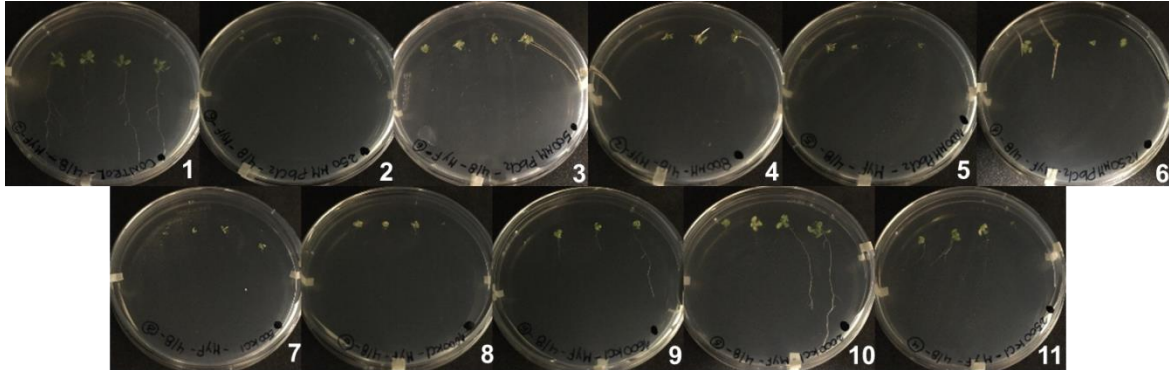


Figura 49: Cultivo de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación. Fila superior, tratamientos con PbCl_2 en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= 0 μM **2)** 250 μM PbCl_2 **3)** 500 μM PbCl_2 **4)** 800 μM PbCl_2 **5)** 1000 μM PbCl_2 **6)** 1250 μM PbCl_2 **7)** 500 μM KCl **8)** 1000 μM KCl **9)** 1600 μM KCl **10)** 2000 μM KCl **11)** 2500 μM KCl .

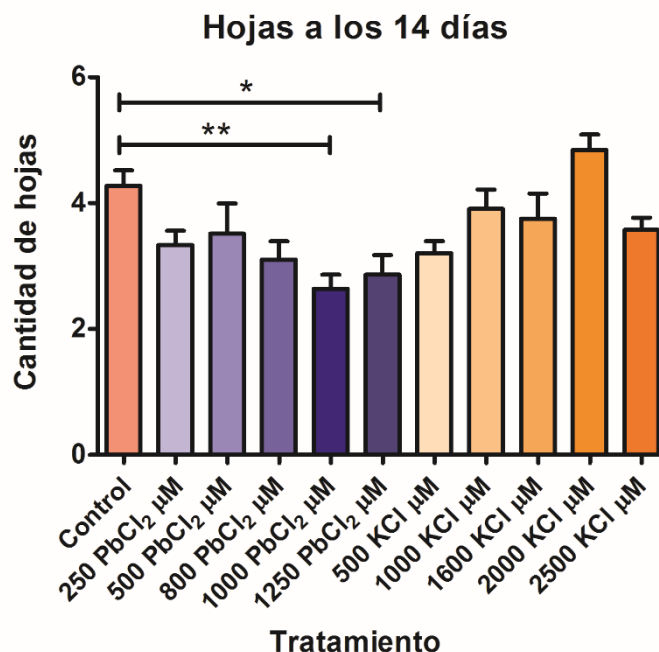


Figura 50: Efecto del cloruro de plomo (PbCl₂) en el desarrollo de las hojas a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con PbCl₂ o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de hojas en cada una de las plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/tratamiento (control, PbCl₂ y KCl). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (****p<0,0001).

Longitud de la raíz principal a los 14 días post-germinación

Al mismo tiempo que se estudió la cantidad de hojas, se evaluó la longitud de la raíz principal. Se pudo observar una disminución de la variable en todos los tratamientos con cloruro de plomo con respecto al control, aunque el efecto inhibitorio se ve claramente a partir de 800 μM (figura 51).

Utilizando el mismo estudio estadístico que en la variable anterior, se determinó que a partir de 800 μM PbCl_2 , inclusive, la longitud de la raíz disminuye significativamente con respecto al control sin tratar. Abarcando las concentraciones de 800 ($p < 0,01$), 1000 ($p < 0,001$) y 1250 ($p < 0,01$) μM PbCl_2 (figura 51).

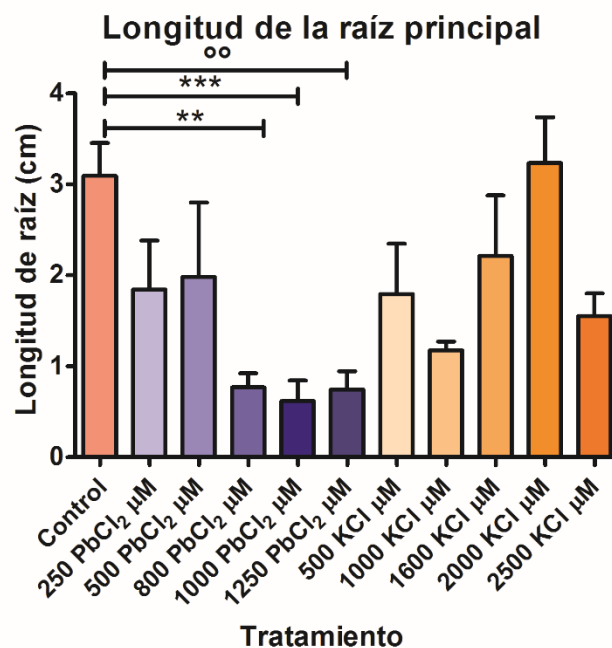


Figura 51: Efecto del cloruro de plomo (PbCl_2) en el desarrollo de la raíz principal a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con PbCl_2 o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se midió la longitud (cm) de la raíz de cada una de las plantas mediante un software y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media \pm SE de 9 placas/ tratamiento (control, PbCl_2 y KCl). * señala resultados significativos del Anova no paramétrica prueba Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (**** $p < 0,0001$).

Cantidad de raíces secundarias a los 14 días post-germinación

Al analizar las raíces secundarias se pudo observar que esta variable en estudio, presento cambios pero no son representativos de una afección relacionada con los tratamientos, ya que los cambios observados no son congruentes. La variable no sigue un patrón adecuado a los tratamientos, hay pocas raíces secundarias en la concentración de 250 μM con respecto al control y en 500 μM , concentración mayor, hay aproximadamente la misma cantidad de raíces secundarias que en el control (sin tratar).

Posteriormente se realizó un análisis estadístico que confirmo las observaciones porque ninguno de los grupos presento diferencias significativas con el control (figura 52).

Estas variaciones no fueron observadas en los otros ensayos, por lo que esta variable puede no ser la mejor para evaluar el efecto del Pb^{+2} .

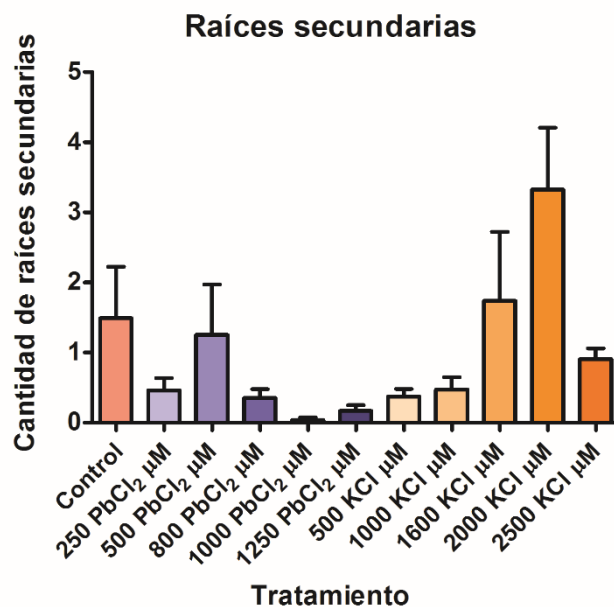


Figura 52: Efecto del cloruro de plomo (PbCl₂) en el desarrollo de las raíces secundarias a los 14 días post-germinación de *A. thaliana*. Se sembraron cuatro semillas por placa de Petri con medio MS solo (control) o suplementado con PbCl₂ o KCl en la concentración indicada. A los 14 días post-germinación se tomó nota de la cantidad de raíces secundarias en cada una de plantas y se calculó un promedio por placa. Las columnas representan la media ± SE de 9 placas/ tratamiento (control, PbCl₂ y KCl). Anova no paramétrica Kruskal-Wallis con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn (p<0,0001).

Floración

Al analizar el efecto del plomo en la floración observamos que ninguna de las concentraciones ensayadas genera diferencias con respecto al control. Se realizó una Anova (p= 0,0205) y posteriormente un análisis de comparaciones múltiples, este último no presento grupos que difieran con el control (figura 53 y 54).

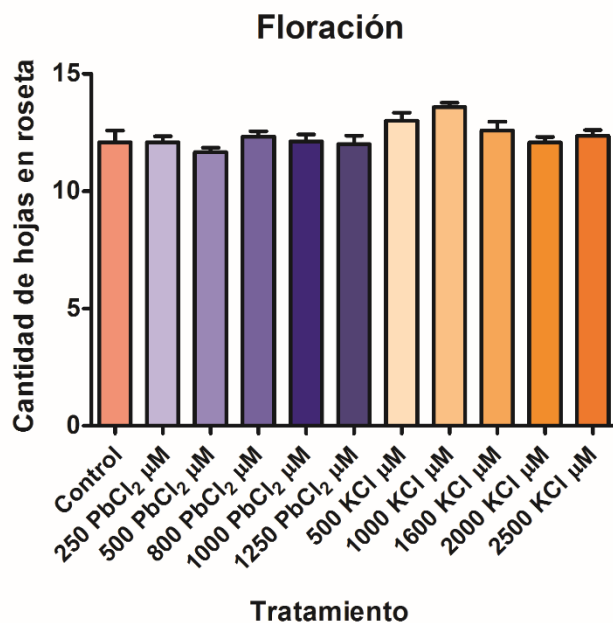


Figura 53: Efecto del cloruro de plomo (PbCl₂) en el proceso de floración de *A. thaliana*. Se germinaron semillas de *A. thaliana* en medio MS solo, a los siete días de la siembra se trasplantaron a macetas con tierra (Terrafertil growmix multipro). El primer riego se realizó con agua destilada, sin ningún metal, para reducir el estrés que sufren los plantines al trasplantarlos. Los siguientes riegos se realizaron dos veces por semana, con agua destilada suplementada con PbCl₂ o KCl en la concentración indicada. Las columnas representan la media ± SE de n macetas/ tratamiento (control; PbCl₂; KCl). Anova no paramétrica del tipo Kruskal-Wallis (p=0,0205) con posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

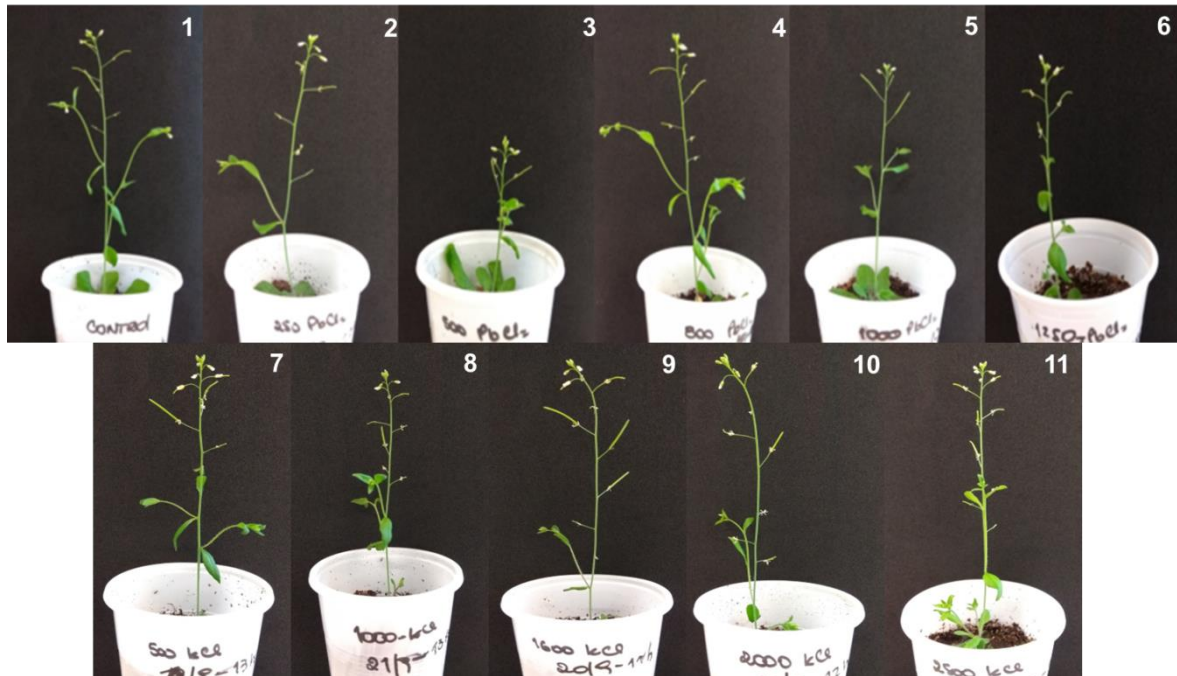


Figura 54: Cultivo de *A. thaliana* en tierra para ensayo de floración. Las fotos fueron tomadas entre los 10 y 15 días posteriores a la observación del meristemo reproductivo. Fila superior, tratamientos con PbCl_2 en concentración ascendente de izquierda a derecha. Fila inferior tratamientos con KCl , también en concentración ascendente de izquierda a derecha. **1)** Control= $0 \mu\text{M}$ **2)** $250 \mu\text{M PbCl}_2$ **3)** $500 \mu\text{M PbCl}_2$ **4)** $800 \mu\text{M PbCl}_2$ **5)** $1000 \mu\text{M PbCl}_2$ **6)** $1250 \mu\text{M PbCl}_2$ **7)** $500 \mu\text{M KCl}$ **8)** $1000 \mu\text{M KCl}$ **9)** $1600 \mu\text{M KCl}$ **10)** $2000 \mu\text{M KCl}$ **11)** $2500 \mu\text{M KCl}$.

Efecto del cloruro de potasio

Para la evaluación del contra ion que acompaña al Pb^{+2} , se ensayaron concentraciones de 500, 1000, 1600, 2000 y 2500 $\mu\text{M KCl}$. La evaluación del efecto de esta sal se realizó en conjunto con la sal de plomo (figuras 45 a 54).

Se pudo determinar que no hubo cambios significativos con respecto al control, por lo que se puede adjudicar las variaciones observadas al ion Pb^{+2} .

Sin embargo, en las figuras 50 (hojas a los 14 días post-germinación) y 51 (longitud de la raíz principal), se puede observar la disminución en ambas variables con respecto al control en los tiramientos con KCl. Específicamente, esto se puede ver en la concentración de 1000 μ M para la variable longitud de raíz.

Análisis morfológico a través de microscopía electrónica de barrido

Como se puede observar en la figura 55, el desarrollo general de los plantines expuestos a diferentes concentraciones de $PbCl_2$ se vio afectado. En este caso, en todos los tratamientos, el plantín disminuyó en gran medida su tamaño con respecto al tamaño del control.

Los tejidos epidérmicos visualizados y el meristemo apical no presentan cambios morfológicos apreciables mediante esta técnica (figuras 56 a 58).

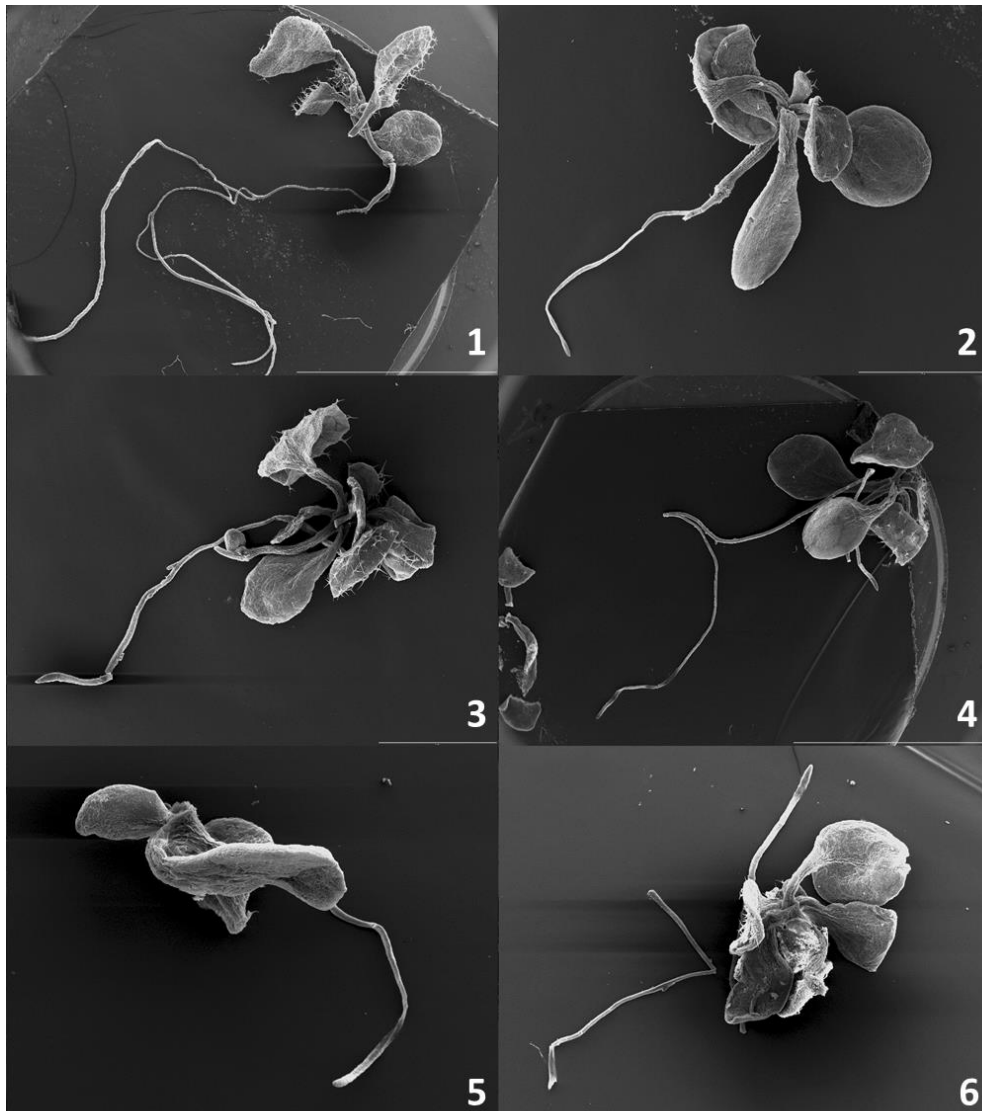


Figura 55: Micrografías electrónicas de barrido de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con PbCl_2 . (1) Plantín control ($0 \mu\text{M}$) Bar= 5 mm. (2) Plantín tratado con $250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (3) Plantín tratado con $500 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (4) Plantín tratado con $800 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 5 mm. (5) Plantín tratado con $1000 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (6) Plantín tratado con $1250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm.

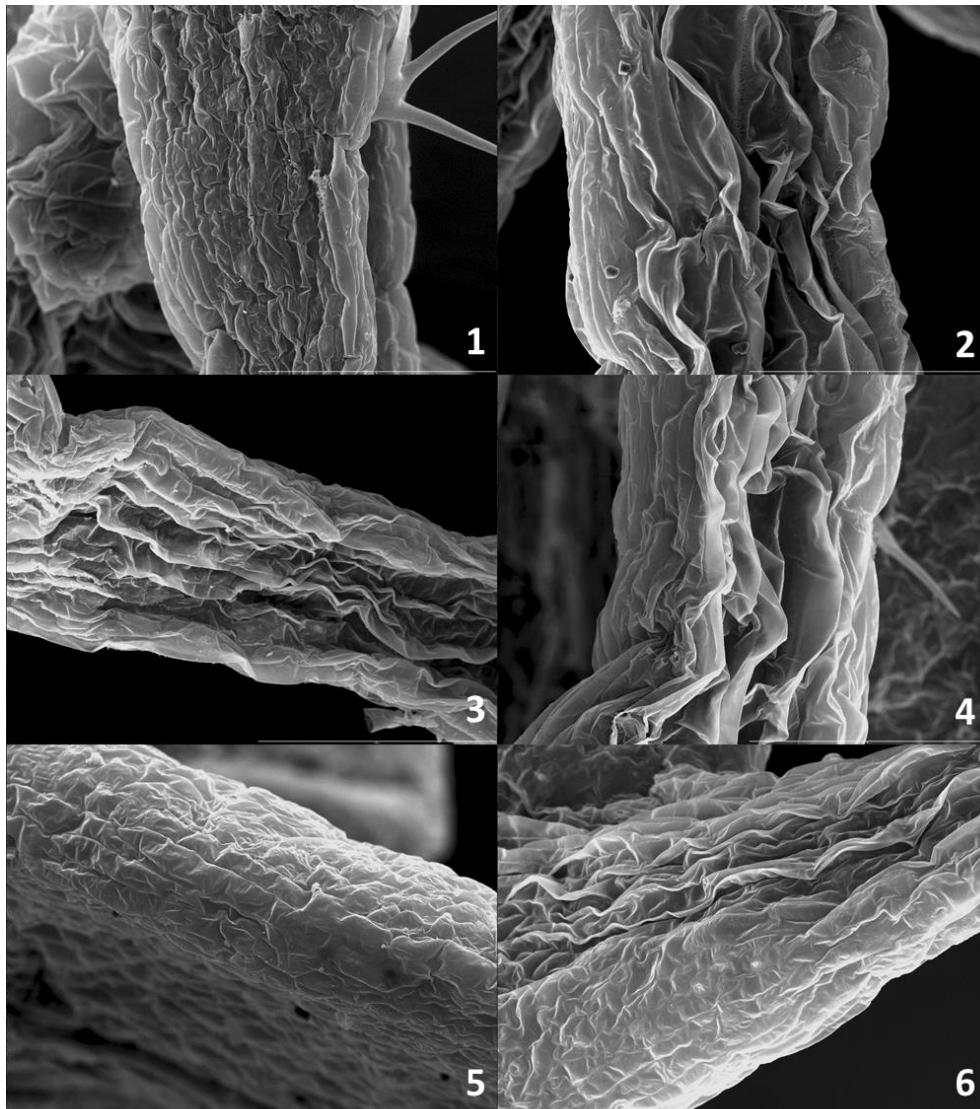


Figura 56: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la hoja de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con PbCl_2 . (1) Plantín control ($0 \mu\text{M}$) Bar= $200 \mu\text{m}$. (2) Plantín tratado con $250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$. (3) Plantín tratado con $500 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$. (4) Plantín tratado con $800 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$. (5) Plantín tratado con $1000 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$. (6) Plantín tratado con $1250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$.

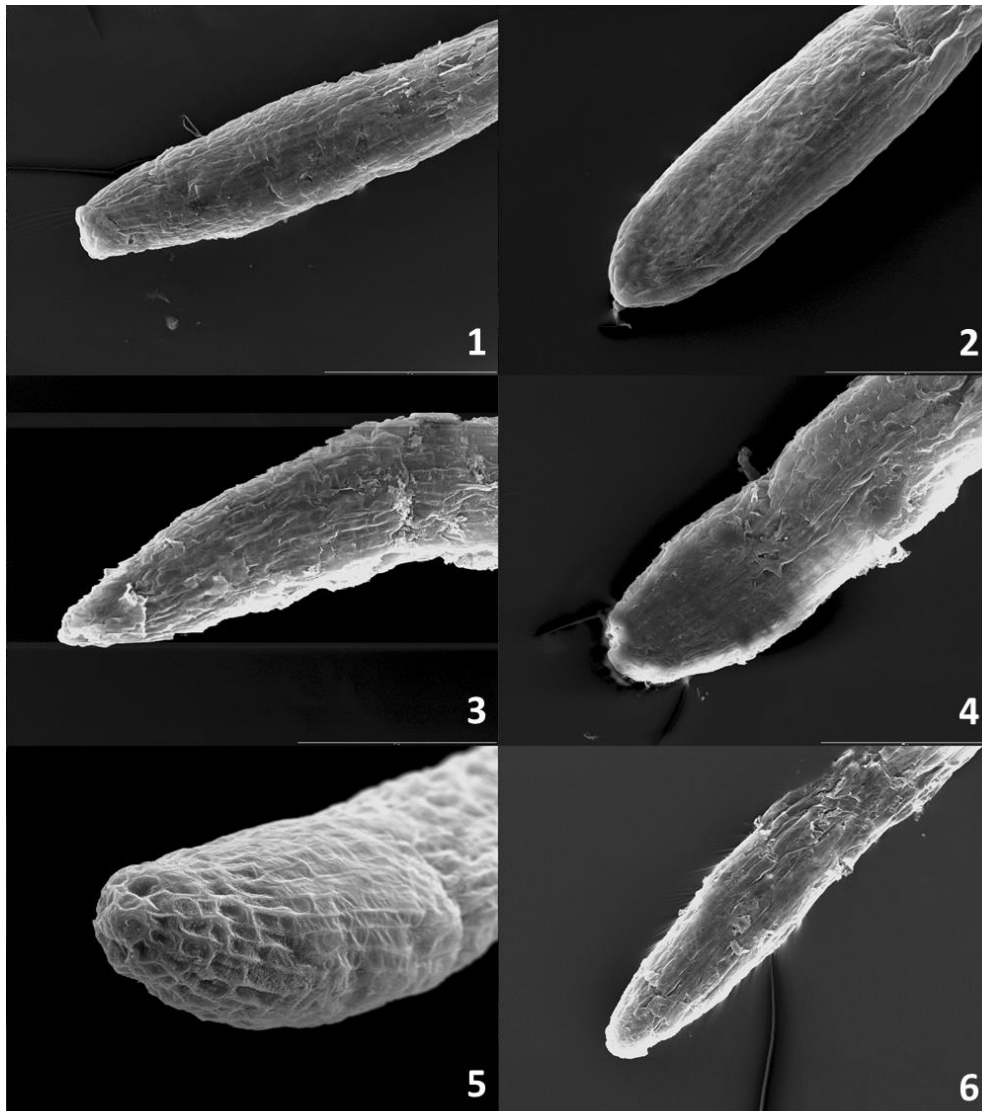


Figura 57: Micrografías electrónicas de barrido del tejido epidérmico de la raíz de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con PbCl_2 . (1) Plantín control ($0 \mu\text{M}$) Bar= $200 \mu\text{m}$. (2) Plantín tratado con $250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $100 \mu\text{m}$. (3) Plantín tratado con $500 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$. (4) Plantín tratado con $800 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $100 \mu\text{m}$. (5) Plantín tratado con $1000 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $50 \mu\text{m}$. (6) Plantín tratado con $1250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= $200 \mu\text{m}$.

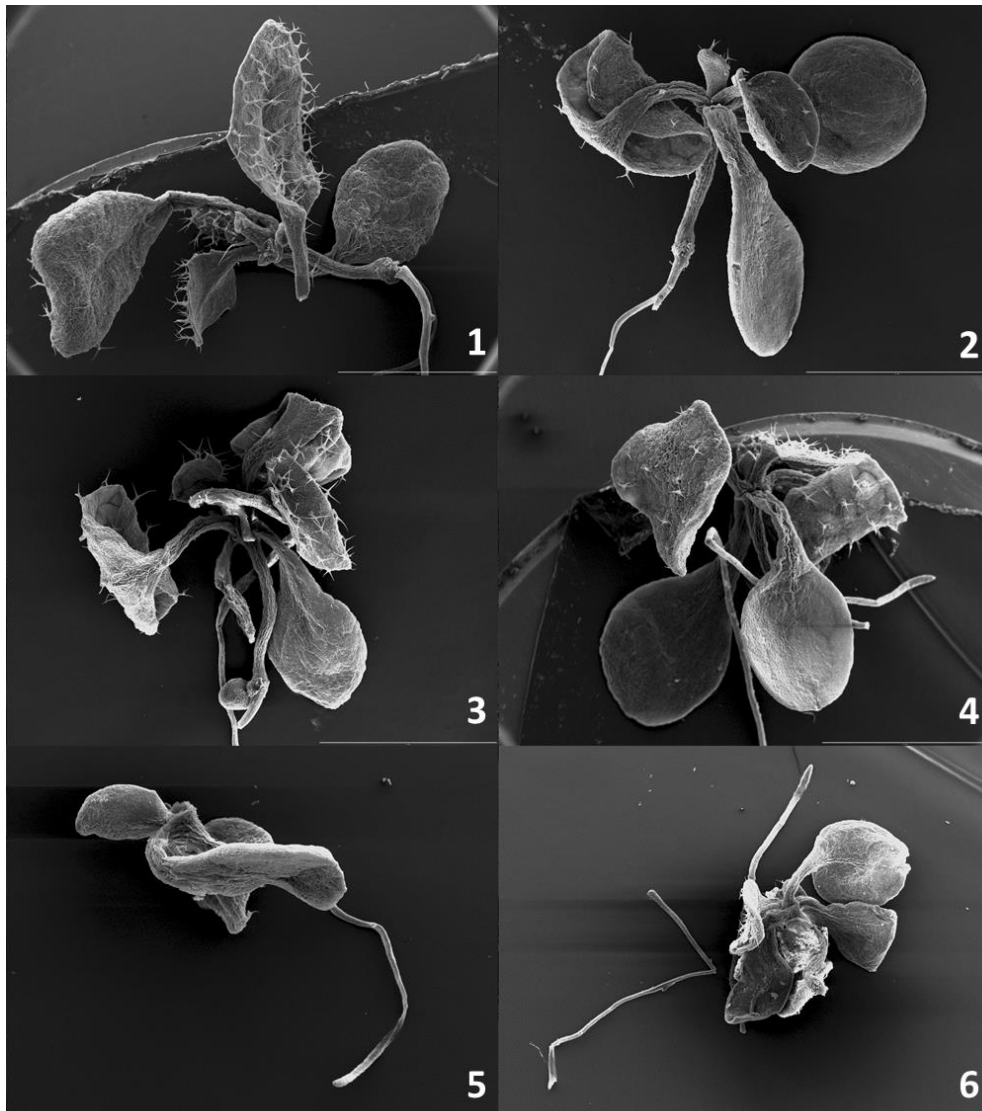


Figura 58: Micrografías electrónicas de barrido del meristemo apical del tallo de plantines de *A. thaliana* a los 14 días post-germinación del tratamiento con PbCl_2 . (1) Plantín control ($0 \mu\text{M}$) Bar= 2 mm. (2) Plantín tratado con $250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (3) Plantín tratado con $500 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (4) Plantín tratado con $800 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (5) Plantín tratado con $1000 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm. (6) Plantín tratado con $1250 \mu\text{M}$ de PbCl_2 . Bar= 2 mm.

Discusión de los resultados

Evaluación de los efectos de los metales pesados en el ciclo de vida de *A. thaliana*

Todas las plantas absorben metales del medio donde se encuentran pero en distinto grado, dependiendo de la especie vegetal, y de las características y contenido de metales del entorno. Una vez absorbidos tienen efectos en el crecimiento y desarrollo de las mismas (Prieto-Méndez *et al.*, 2009). En este proyecto se estudió el efecto de los metales pesados Ni^{+2} , Pb^{+2} y Cr^{+6} en *A. thaliana*, por ser metales potencialmente tóxicos y que su concentración está incrementándose en el ambiente como consecuencia de actividades industriales.

Comenzando por el NiSO_4 a los 7 días la única concentración que presentó impedimentos en el desarrollo fue la de 600 μM . Al observar a los 14 días post-germinación la cantidad de hojas y la longitud de la raíz, es donde se puede observar que a 150 μM el desarrollo de las plántulas comienza a estar inhibido y recién a 200 μM dicha inhibición es significativa. Esto se asemeja a lo reportado por Silva-Guzman *et al.*, 2016, que luego de exponer por 15 días a *A. thaliana* a $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, observó que concentraciones bajas de la sal (150 μM) inhiben el desarrollo de la raíz principal. En el caso de la cantidad de raíces secundarias no se vieron cambios en ninguna concentración de la sal. Llamativamente para la concentración de 50 μM de este metal detectamos un estímulo en el desarrollo foliar y de la raíz principal, esto no sucede en el trabajo realizado por Vargas-Palominos *et al.*, 2007 pero puede deberse a que el ensayo no fue realizado completamente con la misma metodología, pero si los resultados coinciden con los obtenidos por Guillén *et al.*, 2008 quien determinó que a concentraciones de 50 y 100 μM el desarrollo de *N. tabacum* fue estimulado. Esto puede deberse a que el níquel a bajas concentraciones es un micronutriente esencial para las plantas (Guillen *et al.*, 2008).

En el caso del PbCl_2 sucede algo semejante, donde a los 7 días post-germinación la cantidad de hojas no se vio afectada en ninguna de las concentraciones,

mientras que al observar las hojas a los 14 días post-germinación se ve que las concentraciones de 1000 μM y 1250 μM generan un impedimento en el desarrollo foliar, pero al observar al mismo tiempo la longitud de la raíz vemos que a partir de 800 μM PbCl_2 el desarrollo de la raíz principal esta inhibido. Estos resultados concuerdan con los de Guillen *et al.*, 2008 en *N. tabacum L.*, donde el desarrollo de la raíz principal se vio impedido a 500 μM del metal y que a partir de 1000 μM se impide el desarrollo foliar; también concuerda con los resultados obtenidos por Vargas-palominos *et al.*, 2007 donde determinaron que en *A. thaliana* el desarrollo se impide por completo en partir de 1000 μM (puede haber disparidades con algunos de los resultados, ya que no se llevaron a cabo los ensayos de la misma manera). En este metal, también se puede ver que el conteo de raíces secundarias no es un parámetro para evaluar la toxicidad de metales, ya que tampoco se observaron cambios en ninguna de las concentraciones.

Por último, en el caso del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se pudo determinar que tiene un efecto dual en el desarrollo. Al evaluar la germinación de semillas expuestas a dicromato de potasio, se observó que a partir de 200 μM este proceso se veía impedido y que la tasa de germinación era casi nula. Esto es un indicador de su toxicidad en estadios muy tempranos del desarrollo, que los otros metales no presentaron. Cuando se evaluó el desarrollo foliar a los 7 días post-germinación y el resto de las variables a los 14 días post-germinación, se observó que a las concentraciones de 200 y 250 μM el desarrollo se vio demorado, pero no inhibido porque las semillas germinaron y desarrollaron algo de follaje y su raíz principal creció, aunque nunca llegaron a crecer como los controles. En la concentración de 600 μM las semillas nunca germinaron. Por lo contrario, a 100 μM se observó estimulación en el desarrollo de la raíz principal de los plantines. Resultados semejantes fueron obtenidos por Ortíz-Castro *et al.*, 2006 donde señalaron que el dicromato tiene un efecto dual en plantas de *A. thaliana* dependiendo de su concentración en el medio ya que, mientras el tratamiento con 100 μM tiene un efecto estimulador en el crecimiento de la raíz y el follaje, concentraciones de 200 μM o mayores inhiben el crecimiento. Por lo contrario, Eleftheriou *et al.*, 2015 mostró que en

plántulas de *A. thaliana* expuestas durante 4 días a 100 μM de cromo se inhibe el crecimiento de la raíz principal con respecto al control, esta disparidad puede deberse a que el tiempo de exposición al metal fue poco. Garcia *et al.*, 2011 observo en *N. tabacum* que, si bien el crecimiento se inhibe los primeros 5 días después del trasplante, luego existe una estimulación y el crecimiento llega a ser mayor que el control.

Las concentraciones ensayadas, para cada uno de los metales en estudio, permitieron definir un orden de toxicidad, siendo el metal más tóxico el níquel, seguido del cromo y el menos tóxico el plomo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Vargas-Palominos *et al.*, 2007, en los que también determinan que el níquel es más tóxico que el plomo.

Se determinó que el níquel es el más tóxico de los tres metales, ya que a 36 ppm las semillas brotan y no continúan con su desarrollo, presentando radículas de $0,11 \pm 0,1$ cm de longitud (figura 59).

Se pudo definir que el cromo es más tóxico que el plomo comparando las variables de estudio en 207 ppm ($1000 \mu\text{M PbCl}_2$ y $200 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y 260 ppm ($1250 \mu\text{M PbCl}_2$ y $250 \mu\text{M K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de los metales. En la concentración de 207 ppm se determinó que el cromo presenta un desarrollo tardío con respecto al plomo, ya que luego de la germinación los promedios de ambos metales en cada variable son muy semejantes. Ahora, a 260 ppm el cromo presenta un desarrollo aún más tardío con respecto al plomo, la germinación ocurre más tarde en el cromo. Las plántulas presentan diferencias en el desarrollo de la raíz principal, logrando en el plomo un promedio de $0,75 \pm 0,6$ cm y en el cromo $0,14 \pm 0,09$ cm; se considera que esta diferencia en la longitud de la raíz principal es consecuencia de la germinación tarde de las semillas expuestas a 260 ppm de cromo (figura 59).

	207 ppm		260 ppm		36 ppm
	Plomo	Cromo	Plomo	Cromo	Níquel
Germinación (proporción)	0,86 ± 0,08	0,08 ± 0,17	0,78 ± 0,2	0	0,86 ± 0,18
Hojas a los 7 días post-germinación	1,24 ± 0,8	1,88 ± 0,98	1,37 ± 0,8	1 ± 1,09	0
Hojas a los 14 días post-germinación	2,64 ± 0,67	2,61 ± 0,54	2,86 ± 0,9	1,85 ± 0,58	0
Longitud de la raíz principal (cm)	0,62 ± 0,67	0,51 ± 0,55	0,75 ± 0,6	0,14 ± 0,09	0,11 ± 0,1
Cantidad de raíces secundarias	0,037 ± 0,1	0,14 ± 0,25	0,16 ± 0,25	0,21 ± 0,32	0

Figura 59: Promedios de cada variable estudiada en la evaluación del desarrollo de *A. thaliana*, para las concentraciones más relevantes. Cada valor es la media ± SD. Las concentraciones en ppm equivalen a 1000 µM PbCl₂ y 200 µM K₂Cr₂O₇ (207 ppm), 1250 µM PbCl₂ y 250 µM K₂Cr₂O₇ (260 ppm) y a 600 µM de NiSO₄ (36 ppm).

Variables como marcadores de toxicidad

El crecimiento de la raíz primaria es el marcador fenotípico más sensible (Guillén *et al.*, 2008). Esto puede ser verificado mediante la comparación de las variaciones de las diferentes variables que se utilizaron para la evaluación de la toxicidad. En los casos de estudio del níquel y el plomo, la toxicidad marcada por la inhibición del crecimiento de la longitud de la raíz principal apareció a concentraciones 200 µM de NiSO₄ y 800 µM de PbCl₂. Esta inhibición del desarrollo no es notable si se utilizan las variables número de hojas a los 7 días post-germinación o la cantidad de raíces secundarias.

La germinación también es un buen marcador de la toxicidad, esto queda demostrado en el ensayo con dicromato, donde se ve impedido o demorado el proceso germinativo. Como esto no se observó con los otros metales, se puede decir que la germinación es necesaria pero no suficiente para evaluar toxicidad.

Observando la variabilidad que tuvo la cantidad de raíces secundarias en todos los ensayos, consideramos que este no es un buen parámetro para la evaluación de toxicidad por metales.

Por otra parte, el tiempo durante el ciclo de vida en el cual se evalúan las distintas variables es clave, ya que muchas de las toxicidades aparecieron a los 14 días post-germinación, ya sea realizando el recuento por hojas o la medición de la longitud de la raíz principal, y no antes (7 días post-germinación).

En el análisis del proceso de floración, realizado en este trabajo, para cada uno de los metales estudiados, no se observó inhibición o alteración del proceso en estudio cuando se regó a las plantas con soluciones suplementadas con diferentes cantidades de las sales de los metales. Se considera que los resultados obtenidos, no son representativos de la toxicidad que se observó al evaluar a los metales mediante cultivos en medio MS, ya que este permite la fácil absorción de todo lo que contiene.

Los factores que influyen en la movilización de metales pesados en el suelo son características del mismo: pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de intercambio (catiónico y/o aniónico), presencia de carbonatos, materia orgánica, textura orgánica, entre otras (Prieto-Méndez *et al.*, 2009). Dado esto, se propone estudiar el comportamiento de los metales pesados en los suelos a través de una evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos, ya que la toxicidad de los metales depende no solo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema. Esto puede realizarse mediante la determinación de la presencia del componente metálico por espectroscopia de absorción atómica, si esto diera positivo se proseguiría con la misma evaluación, pero en las raíces de las plantas y el follaje.

Además, los bioensayos realizados con *A. thaliana* comprueban que este es un organismo sensible a los metales pesados, pudiendo ser utilizado para la evaluación de diferentes contaminaciones.

Efecto de los contra iones

Como se explicó anteriormente, se realizaron controles con Na₂SO₄ y KCl para evaluar el efecto del ión que acompaña a cada uno de los metales en estudio. Se puede observar en la sección de resultados que, en ninguno de los casos evaluados, ninguna de las dos sales demostró tener un efecto significativo sobre el desarrollo de *A. thaliana*, por lo que se pueden adjudicar las variaciones observadas en los tratamientos con NiSO₄, K₂Cr₂O₇ y PbCl₂, al Ni⁺², Cr⁺⁶ y Pb⁺², respectivamente. Sin embargo, en algunos de los ensayos se observan tendencias dispares que muestran un posible efecto negativo de los contra iones.

Quesada *et al.*, 2000 demostró que la germinación de las semillas de *A. thaliana* del ecotipo Columbia no se ve afectada en concentraciones menores a 100 mM de Na₂SO₄ o KCl, lo que concuerda con los resultados ya que, en todos los casos, se obtuvo una germinación similar a la obtenida por el control sin tratar, independientemente del tratamiento aplicado. En el presente trabajo, se utilizaron concentraciones de dichas sales del orden micromolar y no milimolar.

Por otro lado, Liu y Zhu, 1997 observaron que a partir de 0,1 mM KCl el crecimiento de la raíz principal de *A. thaliana* se ve favorecido y que a niveles superiores a 10 mM KCl se reduce sin llegar a ser menor que la longitud de las raíces de las plántulas sin tratar. Si bien, las concentraciones utilizadas por este grupo son distintas a las del presente trabajo, los resultados de este trabajo muestran que la longitud de la raíz a las concentraciones ensayadas tampoco se ve afectada por el KCl.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en los tratamientos con KCl no fueron los deseados en todos los casos. En los experimentos correspondientes al plomo, se puede observar que a la concentración de 2000 µM KCl hay un estímulo en el desarrollo de las plantas y que a concentraciones menores (500, 1000 y 1600 µM KCl), la longitud de la raíz principal y la cantidad de raíces secundarias muestran una inhibición con respecto al

control a pesar de no ser significativa. Este comportamiento se puede ver, incluso, en la concentración de 2500 μM KCl.

Para el caso de los experimentos con cromo, el comportamiento observado es que los tratamientos con diferentes concentraciones de KCl, son poco variables entre ellos pero presentan una disminución con respecto al control. También, se puede observar un estímulo en el desarrollo de los plantines a 1200 μM KCl.

Consideramos que las variaciones observadas en estos tratamientos están relacionadas con factores externos que alteran la variabilidad, por ejemplo, el estado de la sal utilizada y no con el tratamiento propiamente dicho, ya que la bibliografía sostiene que esta sal (KCl) no afecta el desarrollo de las plantas a las concentraciones que nosotros estudiamos. Por todo lo mencionado anteriormente, sería apropiado probar el efecto del contra ion con otra sal o aumentar el número de réplicas para disminuir el ruido del ensayo.

Para los controles realizados con Na_2SO_4 , se pueden observar variaciones con respecto al control en algunas de las variables de estudio, pero se cree que dichas variaciones están asociadas a que estos tratamientos tienen menos replicas que los tratamientos realizados con níquel y no a que la sal elegida no sea útil como control. Se propone aumentar el número de réplicas.

Técnicas relevantes

La técnica de microscopía electrónica de barrido utilizada puede ser considerada como una buena herramienta para evaluar la morfología de los tejidos de distintas partes de la planta a los 14 días post-germinación. Las imágenes obtenidas a través de esta técnica revelan cambios morfológicos asociados a la exposición de la planta a $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, donde se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de sal el tejido aumenta su rugosidad. En el caso de los otros dos metales, no se observan cambios morfológicos en los tejidos visualizados. Debido a esto, se puede decir que la técnica es útil, pero no suficiente

para evaluar la toxicidad de los metales pesados en *A. thaliana*. No existen muchos trabajos de toxicidad en los cuales se utilice la microscopía electrónica de barrido, por lo que esta metodología es novedosa para este tipo de ensayos.

Así mismo, el protocolo de fijación utilizado suplió las expectativas, ya que resultó en una buena preservación de la morfología de la superficie y en una preservación consistente de las dimensiones de los diferentes tejidos observados, tal como lo reportaron Talbot y White, 2013.

Como se mencionó anteriormente, la medición de la longitud de la raíz principal es uno de los marcadores más sensibles a la toxicidad generada por los metales. A diferencia del trabajo realizado por Martínez-Trujillo *et al.*, 2013 donde el crecimiento de la raíz primaria fue registrado utilizando una regla graduada en mm, en el presente proyecto final se desarrolló una técnica para la medición de dicha variable, no reportada con anterioridad. La metodología consiste en retirar a los plantines del medio de cultivo en los que fueron crecidos a los 14 días post-germinación, colocarlos en un portaobjetos, acondicionarles la raíz (estirla y marcar segmentos) para por último fotografiarlos con una cámara AxioCam ERc 5s de ZEISS acoplada a una lupa estereoscópica de la misma marca. Una vez obtenida la foto se procede a la medición de la raíz a través del software ZEN 2012 SP1 (blue edition). Este programa permitió definir una escala, generando así mediciones lo suficientemente precisas para el análisis de la variabilidad del largo de la raíz en los diferentes tratamientos. Dado los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación, se puede concluir que este método es útil y que cumplió con los requisitos necesarios para esta aplicación.

Conclusión

En este trabajo, se determinó que los metales pesados Ni⁺², Pb⁺² y Cr⁺⁶ afectan el desarrollo de *A. thaliana*, ya que se observó una disminución en el follaje, en la longitud de la raíz principal y, en el caso del cromo, retraso en el proceso germinativo. Viendo esto y

siendo *A. thaliana* un organismo modelo, es de suma importancia evaluar los efectos de estos elementos en plantas de interés agrícola.

La utilización de aguas residuales para riego agrícola contamina suelos y plantas por contener metales tóxicos para los cultivos. A consecuencia del incremento de estos contaminantes en los suelos por prácticas inapropiadas, el aumento de la biodisponibilidad de los mismos para los múltiples cultivos puede causar daños, fitotoxicidad y finalmente, provocar un riesgo latente para la salud de los animales y los hombres.

Actualmente Argentina, cuenta con una ley (11820) que establece las concentraciones máximas recomendadas para el vuelco de efluentes en cursos de agua. Sin embargo, no existen normas de referencia, especificaciones, ni información sobre los niveles normales de metales pesados en suelo y agua destinados al uso agrícola.

Además, es necesario comprender los cambios fisiológicos y moleculares que subyacen los cambios morfológicos encontrados en el presente trabajo. Por ello, se cree necesario el estudio de la expresión de genes diferenciales asociados al desarrollo de *A. thaliana* bajo las condiciones estudiadas, así como también, el estudio de las actividades enzimáticas y la movilización de nutrientes. Los mecanismos específicos involucrados en la entrada de los metales pesados a la plantas son aún desconocidos.

Bibliografía

- **Alarcón, A.V., Cajuste, L.J., Grabach, C.D.S., González, G.A., y Bauer, M. de L. de la I. de** (2001). Cadmio, Níquel y Plomo en agua residual, suelo y cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Agrociencia* 35, 267–274.
- **Anderson M. y Wilson F.** *Arabidopsis: a practical approach*. Practical Approach Series. Oxford University Press, 2000. 296 p. ISBN 978-0-19-963564-1.
- **Audesirk, Teresa; Audesirk, Gerald y Byers, Bruce E.** *Biología. La vida en la tierra*. 6a ed. México: Pearson Educación, 2003. 980 p. ISBN 9702603706.
- **Azcona-Cruz, M.I., Ayala, R.R. y, y Vicente-Flores, G.** (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 20, 72–77.
- **Boyes D.C., Zayed A.M, Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., y Görlach J.** (2001). Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* 13, 1499-1510.
- **BREVE ENCICLOPEDIA DEL AMBIENTE** [en línea]. © 2011 [consulta Agosto 2017] < <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/> >
- **Cartagena, J.S.** (1998). Disección genética del desarrollo de la hoja *en Arabidopsis thaliana*: Estudios de ecotipos y estirpes mutantes de la colección de *Arabidopsis* Information Service. Universidad de Alicante.
- **Clough, S.J., y Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- **Díaz Aguilar I., Larqué Saavedra M.U., Alcántar González G., Vázquez Alarcón A., González Cossio F.V. y Carrillo González R.** (2001). Acumulaciones toxicas de níquel en el crecimiento y la nutrición de trigo. *Terra Latinoamericana* 19, 199-209.
- **Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.-D.S., Panteris, E., and Fatsiou, M.** (2015). Chromium-Induced Ultrastructural Changes and Oxidative Stress in Roots

of *Arabidopsis thaliana*. International Journal of Molecular Sciences 16, 15852–15871.

- **Esau, Katherine.** Anatomía de las plantas con semilla. 1a ed. Buenos Aires: Hemisferio Sur S.A, 1993. 532 p. ISBN 9595043031.
- **García, J.G.C., Guzmán, M.G.S., y Trujillo, M.M.** (2011). Análisis del crecimiento de raíces primarias y raíces laterales de *Nicotiana tabacum L.* en condiciones de estrés generado por Cr (VI). Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 13, 65–69.
- **Giardina, E.B., Heredia, O.S., Castro, M.A., y Effron, D.N.** (2012). Fitotoxicidad del cromo sobre *Phaseolus vulgaris L.* Agronomía y ambiente 32, 75-80.
- **Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S., y Von Wirén, N.** (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. Plant Physiol. 163, 161–179.
- **Guillén, J.N., Abud, Y.C., Madrigal, F.H., y Trujillo, M.M.** (2008). Efecto de níquel, plomo y zinc, en el desarrollo de la raíz de *Nicotiana tabacum L.* Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 10, 39–48.
- **Ivanov, V.B., Bystrova, E.I., y Seregin, I.V.** (2003). Comparative Impacts of Heavy Metals on Root Growth as Related to Their Specificity and Selectivity. Russian Journal of Plant Physiology 50, 398–406.
- **Koorneef M., Hanhart C.J. y Van der Veen J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 229, 57-66.
- **Koorneef, M., Alonso-Blanco, C., y Vreugdenhil, D.** (2004). Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis thaliana*. Annual Review of Plant Biology 55, 141–172.
- **Kraemer, U., Smith, R., Wenzel, W., Raskin, I., y Salt, D.E.** (1998). The Role of Metal Transport and Tolerance in Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense Halacsy*. Plant Physiology 115, 1641–1650.

- **Krämer, U.** (2015). The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *ELife Sciences* 4, e06100.
- **Langer, R.H.M y Hill G.D.** Plantas de interés agrícola. Introducción a la botánica agrícola. 1a ed. Zaragoza: Acribia S.A, 1987. 396 p. ISBN 8420006165.
- **Liu, J., y Zhu, J.-K.** (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14960–14964.
- **Martinez-Trujillo M., Solís-Guzmán G., Jiménez-Saragoz J.C., López-Hernandez D., Carreón-Abud Y. y Ríos-Chávez P.** (2013). Respuestas morfogénicas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* (Magnoliophyta: Brassicales) al estrés de Cr (VI). *Revista Chilena de Historia Natural* 86, 207-219.
- **Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., y Koornneef, M.** (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282, 662–682.
- **Meyerowitz, E.M.** (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56, 263-269.
- **Murashige, T., y Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with *Tobacco* Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- **MUSEO ARGENTINO DE CIENCIAS NATURALES “BERNARDINO RIVADAVIA”** [en línea]. © 2017 [consulta Agosto 2017]. <<http://www.macn.secyt.gov.ar>>
- **Núñez-Chaves R.A.** (2007). Técnicas *in vitro* para biorremediación de cromo y plomo. Instituto tecnológico de Costa Rica.
- **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA EDUCACIÓN, LA CIENCIA Y LA CULTURA. CENCIAS NATURALES. MEDIO AMBIENTE. AGUA. WWAP. HECHOS Y CIFRAS** [en línea]. © 2017 [consulta Septiembre 2017] <<http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/facts-and-figures>>

- **Ortiz-Castro R., Martínez-Trujillo M., López-Bucio J. y Cervantes C.** (2006). Modificaciones en el desarrollo de la raíz inducidas por cromo en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* 44, 107-120.
- **Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J., Cervantes, C., y Carreón-Abud, Y.** (2009). Restauración del crecimiento radical por nutrimentos inorgánicos en *Arabidopsis thaliana L.* expuesta a cromo. *Terra Latinoamericana* 27, 97–103.
- **Padmavathiamma, P.K., y Li, L.Y.** (2007). Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollut* 184, 105–126.
- **Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., y Pinelli, E.** (2011). Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*, (Springer, New York, NY), pp. 113–136.
- **Prieto Méndez, Judith; González Ramírez, César A.; Román Gutiérrez, Alma D.; Prieto García, Francisco.** (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10, 29-44.
- **Quesada V., Ponce M.R. y Micol J.L.** (2000). Genetic Analysis of Salt-Tolerant Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154, 421-436.
- **Seregin, I.V., y Ivanov, V.B.** (2001). Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 523–544.
- **Sharma P. y Dubey R.S.** (2005). Lead toxicity in plants. *Plant Physiology* 17, 35-52.
- **Silva-Guzman M, Addo-Quaye C, Dilkes BP** (2016) Re-Evaluation of Reportedly Metal Tolerant *Arabidopsis thaliana* Accessions. *PLoS ONE* 11(7).
- **Solomon, Edra Pearl; Berg, Linda R.; Martin Diana W. y Vilee, Claude.** *Biología de Vilee*. 4a ed. México: McGraw Hill Interamericana Editores S.A, 1998. 1350 p. ISBN 0030103533

- **Sosa, B.S., Banda-Noriega, R.B., y Guerrero, E.M.** (2013). Industrias de fundición: aspectos ambientales e indicadores de condición ambiental. *Revista de Metalurgia* 49, 5–19.
- **Taiz, Lincoln y Zeiger Eduardo.** *Plant Physiology*. 5a ed. Sunderland, Massachusetts: Sinaure Associates Inc, Publishers., 2010. 945 p. ISBN 9780878938667.
- **Talbot M.J. y White R.G.** (2013). Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods*, 9, 36.
- **THE ARABIDOPSIS INFORMATION RESOURCE** [en línea]. © 2017 [consulta Julio 2017] < <http://www.arabidopsis.org> >
- **Vargas-Palominos L., Martínez-Trujillo M., Ortiz-Castro R. y López-Bucio J.** (2007). Efecto de los metales pesados sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L. *Ciencia Nicolaita* 49, 101-112.

Anexos

Medio de cultivo Murashige-Skoog (MS)



PhytoTechnology Laboratories, LLC™
Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

M519 Murashige & Skoog (MS) Basal Medium w/ Vitamins

Synonym: MS Medium

Properties

Form: Fine to Fluffy Powder
Appearance: White to Yellow Powder
Application: Plant Tissue Culture
Solubility: Water
Typical Working Concentration: 4.43 g/L
Storage Temp: 2-6°
Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
Other Notes: Contains the macro- and micronutrients and vitamins as described by Murashige and Skoog (1962).
pH = 3.5-4.5

Formula (mg/L)

Ammonium Nitrate	1650	Potassium Iodide	0.83
Boric Acid	6.2	Potassium Nitrate	1900
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2	Potassium Phosphate, Monobasic	170
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.025	Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.025	Glycine (Free Base)	2
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.26	myo-Inositol	100
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8	Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7	Pyridoxine•HCl	0.5
Manganese Sulfate•H ₂ O	16.9	Thiamine•HCl	0.1
Molybdc Acid (Sodium Salt)• 2H ₂ O	0.25		

Application Notes

Plant Tissue Culture Tested
Plant species: This medium is used for a numerous species.

References

Murashige, T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Revised 3/2007

PhytoTechnology Laboratories, LLC

P.O. Box 12205, Shawnee Mission, KS 66202-2205
Phone: 1-888-749-8682 or 913-341-5343; Fax: 1-888-449-8682 or 913-341-5442
Web Site: www.phyto-tech.com © 2007 PhytoTechnology Laboratories, LLC

MS19-Info

Page 1 of 1

Sales utilizadas para evaluar el efecto de los metales pesados

NiSO₄·6H₂O (M&B laboratory chemicals)

Peso molecular: 262,8 g/mol

Título: $\geq 97\%$

Cloruro (Cl): $\leq 0,035\%$

Hierro (Fe): $\leq 0,004\%$

K₂Cr₂O₇ (Anedra)

Peso molecular: 294,18 g/mol

Título: $\geq 99,0\%$

Materia insoluble: $\leq 0,005\%$

Pérdida por secado (105 °C): $\leq 0.05 \%$

Sulfato (SO₄): $\leq 0.005 \%$

Cloruro (Cl): $\leq 0.001 \%$

Hierro (Fe): $\leq 0.001 \%$

Sodio (Na) $\leq 0.02 \%$

Calcio (Ca) $\leq 0.003 \%$

PbCl₂ (Riedel- de Haën)

Peso molecular: 278,11 g/mol

Pérdida por secado (105°C): 1%

Nitrato (NO₃): 0,01%

Sales utilizadas como control para evaluar el efecto de los contra iones

Na₂SO₄ (Anedra)

Peso molecular: 142,04 g/mol

Identificación: cumple el ensayo

Título: $\geq 99,9\%$ - $\leq 100,5\%$

Pérdida por secado (130°C): $\leq 0,5\%$

Aspecto de la solución/ claridad: cumple el ensayo

Cloruro (Cl): ≤ 450 ppm

Magnesio: (Mg): ≤ 200 ppm

Hierro (Fe): ≤ 90 ppm

Metales pesados (como Pb): ≤ 45 ppm

Calcio (Ca): ≤ 450 ppm

Arsénico: ≤ 5 ppm

KCl (Anedra)

Peso molecular: 74,55 g/mol

Título: 100%

Materia insoluble: $< 0,005\%$

pH de la solución al 5%: 5,9

Bromuro (Br): $< 0,1\%$

Fosfato (PO₄): < 25 ppm

Ioduro (I): $< 0,005\%$

Sulfato (SO₄): 0,001%

Bario (Ba): cumple

Calcio y Magnesio (Ca + Mg): cumple

Hierro (Fe): < 3 ppm

Metales pesados (como Pb): <5 ppm

Soluciones utilizadas

Solución de NiSO₄: fue preparada con 131,4 g de dicha sal disuelta en un litro de agua destilada. Concentración final: 0,5 M.

Solución K₂Cr₂O₇: fue preparada con 147,09 g de dicha sal disuelta en un litro de agua destilada. Concentración final: 0,5 M.

Solución de PbCl₂: fue preparada con 2,21 g de dicha sal disuelta en un litro de agua destilada. Concentración final: 0,008 M.

Solución Na₂SO₄: fue preparada con 71,02 g de dicha sal disuelta en un litro de agua destilada. Concentración final: 0,5 M.

Solución de KCl: fue preparada con 37, 275 g de dicha sal disuelta en un litro de agua destilada. Concentración final: 0,5 M.