



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL FOSFATO, SULFATO Y NITRATO EN
LA CAPTACIÓN DE Cr(VI) EN PLANTAS DE MAÍZ
(*Zea mays*) IN VITRO**

TESIS QUE PRESENTA:

ALONDRA VICENTE HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Miguel Martínez Trujillo

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO DE 2013

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Genética y Microbiología** de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Miguel Martínez Trujillo**

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES: MARÍA YOLANDA HERNÁNDEZ LÓPEZ Y AMADO VICENTE ARGUELLES por el increíble apoyo y el amor incondicional que me han dado a través de todos los años de mi vida, por ser mis guías en este camino y haberme dado las herramientas necesarias, sin ustedes no habría pasado absolutamente nada de esto... ¡¡ **MUCHAS GRACIAS!!**

A MIS HERMANOS: JUAN CARLOS Y RAÚL por todas las buenas palabras, los regaños y el apoyo dado, la confianza que me brindaron a pesar de la distancia que nos mantuvo separados en lo que concluía mis estudios... ¡¡ **GRACIAS!!**

A MI AMIGO Y PAREJA: JUAN CARLOS ZAMUDIO CARREÑO por tu inmenso apoyo, por creer en mí cuando yo dude, por estar en el laboratorio haciéndome compañía y/o ayudándome en el trabajo, por tu paciencia y amor... ¡¡ **GRACIAS!!**

AL DOCTOR MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO: por compartir conmigo su conocimiento, por su gran paciencia y por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo... ¡¡ **MUCHAS GRACIAS!!**

A DIOS: por darme las fuerzas necesarias en mi vida... ¡¡ **GRACIAS!!**

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1.Generalidades del Cromo	4
1.2 Química del Cromo	4
1.3 Efectos biológicos del Cromo	6
1.4 Transporte y acumulación del Cromo en plantas	6
1.5 Efectos del cromo en el crecimiento y desarrollo de las plantas	7
1.6 Tolerancia de las plantas al Cromo	9
1.7 Nutrición vegetal	9
1.8 Transporte de macronutrientes	11
1.9 Fósforo	12
1.10 Azufre	12
1.11 Nitrógeno	13
1.12 Hierro	14
1.13 Manganeseo	14
1.14 Zinc	15
1.15 Efectos del Cromo en el metabolismo de nutrientes minerales	15
1.16 El Maíz (<i>Zea mays</i>)	16
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO GENERAL	22
4.1 Objetivos particulares	22

V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Material biológico	23
5.2. Preparación de semillas	23
5.3. Germinación de semillas, crecimiento y selección de plantas	23
5.4. Tratamientos con Cr y suplementos minerales	24
5.5. Procesamiento de las plantas y análisis de la captación de Cr y otros nutrimentos	25
5.6. Análisis estadístico	25
VI. RESULTADOS	26
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIÓN	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales en maíz.	17
Figura 2. Fotografía comparativa de la plántula de maíz (<i>Zea mays</i>).	18
Figura 3. Desarrollo del sistema radicular del maíz.	19
Figura 4. Pruebas de germinación y crecimiento de la variedad maíz canelo	26
Figura 5. Plantas de maíz de tamaños similares en los tratamientos de medio MS+Cr y suplementos	27
Figura 6. Cuantificación de Cr en la raíz y la parte aérea de plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.5X con cromato de potasio 200 μ M durante 24 ó 48 horas.	28
Figura 7. Cuantificación de Cr en la raíz y la parte aérea de plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.5X con cromato de potasio 250 μ M durante 24 ó 48 horas.	29
Figura 8. Relación de Cr entre la parte aérea y la raíz en plantas de maíz (<i>Zea mays</i>) var Canelo, mantenidas en solución de MS 0.5X con cromato de potasio 200 ó 250 μ M durante 24 ó 48 horas, con suplementos de nutrientes.	30
Figura 9. Cuantificación de Cr total en plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.5X con cromato de potasio 250 μ M durante 24 ó 48 horas, con suplementos de nutrientes.	31

Figura 10. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 200 μ M por 24 horas. 33

Figura 11. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 200 μ M por 24 horas. 34

Figura 12. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 200 μ M por 48 horas. 34

Figura 13. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 200 μ M por 48 horas. 35

Figura 14. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 250 μ M por 24 horas. 35

Figura 15. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 250 μ M por 24 horas. 36

Figura 16. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 250 μ M por 48 horas. 36

Figura 17. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.5x con Cr(VI) 250 μ M por 48 horas. 37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados de oxidación y propiedades de los compuestos del cromo	5
Tabla2. Elementos esenciales para las plantas	10
Tabla 3. Tratamientos utilizados para analizar la captación de Cr y el efecto de fosfato, sulfato ó nitrato.	24

RESUMEN

El cromo (Cr) es el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre, sin embargo, la inadecuada disposición de desechos provenientes de procesos industriales lo han convertido en un importante contaminante ambiental. El Cr(VI) es considerada la forma más tóxica del cromo y usualmente está asociado al oxígeno formando cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). La captación de Cr(VI) es un proceso activo en las plantas, pero se desconoce el mecanismo específico involucrado, que pudiera ser por transportadores de nutrimentos minerales. En este trabajo se analizó el efecto de fosfato, sulfato y nitrato, en la captación de cromato, usando plantas de maíz. Las plantas de 12 días de edad fueron colocadas en medios líquidos MS 0.2x, con cromato de potasio 200 ó 250 μM . En algunos tratamientos se adicionó fosfato, sulfato ó nitrato a una concentración de 3 mM. Las plantas se dejaron 24 ó 48 horas y posteriormente fueron procesadas para la cuantificación. Los resultados demostraron que el fosfato y sulfato interfieren con la captación de Cr(VI) en 200 μM , mientras que sólo el fosfato interfiere a 250 μM . Además, la concentración de hierro disminuye debido a la presencia del Cr(VI). La mayor parte del Cromo se acumula en las raíces, a las 24 horas hay 10% en la parte aérea y 90% en la raíz y a las 48 horas en la parte aérea se acumula el 20% y el resto en la raíz.

Los resultados demuestran que existe una interferencia del fosfato y sulfato en la captación de Cr(VI), lo cual también depende de la concentración del Cromo, y la presencia de este último disminuye la presencia de hierro en las plantas.

ABSTRACT

Chromium (Cr) is the seventh most abundant metal in the earth's crust, however, the improper disposal of waste from industrial processes have become a major environmental contaminant. The Cr(VI) is considered the most toxic form of chromium and usually is associated with the oxygen forming chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). The uptake of Cr(VI) is an active process in plants, but the specific mechanism involved is unknown, which could be for mineral nutrient transporters. In this paper was analyzed the effect of phosphate, sulfate and nitrate on chromate uptake, using corn plants. Twelve days old plants were placed in 0.2X MS liquid media with potassium chromate 200 to 250 μM . In some treatments, phosphate, sulfate or nitrate was added, at a concentration of 3 mM. Plants were incubated 24 to 48 hours and were subsequently processed for quantification. The results showed that the phosphate and sulfate interfere with the uptake of Cr(VI) at 200 μM , while at 250 μM only phosphate interferes. Furthermore, the concentration of iron decreases due to the presence of Cr(VI). Most of the chrome is accumulated in the roots, at 24 hours there are 10% in the aerial part and 90% in the root and at 48 hours in the aerial part accumulates 20% and the rest at the root.

The results demonstrate that there is interference of phosphate and sulfate on the uptake of Cr(VI), which also depends on the concentration of chromium, and the presence of this metal also decreases the iron concentration in plants.

I. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados contribuyen fuertemente a la contaminación ambiental; la cantidad de metales disponibles en el suelo depende de la solubilidad, la cual está influenciada por el pH, el contenido de arcillas, contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico y otras propiedades que hacen que los sitios contaminados con metales pesados sean únicos en términos de manejo de la contaminación (Sauveet et al. 2000). Se consideran metales pesados: el plomo, cadmio, cromo, mercurio, zinc, cobre, plata y arsénico; constituyendo éstos un grupo de gran importancia, ya que algunos son esenciales para las células, pero en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, tales como humanos, organismos del suelo, plantas y animales (Spain 2003).

Estos contaminantes pueden alcanzar niveles de concentración que provocan efectos negativos en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo como son la reducción del contenido de materia orgánica, disminución de nutrimentos, variación en el pH (generando suelos ácidos), efectos adversos en la diversidad y actividad en los microorganismos de la rizósfera; además dificultan la formación de una cubierta vegetal protectora, favoreciendo con ello la aridez, erosión del suelo y la dispersión de los contaminantes hacia zonas y acuíferos adyacentes y como consecuencia aumenta la vulnerabilidad de las plantas al ataque por insectos, plagas y enfermedades, afectando su desarrollo (Zhang et al. 2000).

El cromo (Cr) es el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre, varía de 100 a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$, sin embargo la inadecuada disposición de desechos provenientes de procesos industriales lo han convertido en un importante contaminante ambiental (Skeffington et al. 1976). El metal posee un uso intenso en la industria metalúrgica, las sales de Cr se utilizan en muchos productos tales

como curtidos de cuero, galvanoplastia, la producción de acero, acabado de metales, catalizador, en la fabricación de pigmentos y en la corrosión de metales, por lo tanto está presente en los efluentes de las industrias y en las aguas residuales (Hayat et al. 2011).

Existen diferentes reportes acerca de los efectos de la toxicidad del Cr en las plantas (Shanker 2005) y de alteraciones en la captación de nutrientes por la presencia de este metal. En este trabajo se utiliza como planta modelo el maíz y se analiza la interferencia de nutrientes similares químicamente al cromato, como son el sulfato y el fosfato, para determinar su efecto en la captación de Cr(VI).

1.1. Generalidades del Cromo

El Cromo (Cr) fue identificado por primera vez en 1797 por el químico francés Vauquelin, quién lo aisló de la crocoita, un mineral también llamado “plomo rojo siberiano”. Su nombre proviene del griego *chroma*, que significa color y le fue dado por los muchos colores de sus compuestos (Shupack 1991). El Cr es un elemento natural y ubicuo, que se encuentra en rocas, plantas, suelos y animales, y en los humus y gases volcánicos (Torres-Ríos et al. 2011). El Cr generalmente no se halla en estado libre en la naturaleza, se encuentra en forma combinada, principalmente como el mineral cromita (FeCr_2O_4). El Cr es el séptimo elemento de mayor abundancia en la tierra y el vigésimo primero en las rocas de la corteza.

1.2 Química del Cromo

El Cr es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica. La química inorgánica del cromo no sólo es rica en una gran variedad de colores, sino también en sus diferentes estados de oxidación y en la geometría de sus muchos compuestos. Los estados de oxidación van desde -2 al +6 (Shupack

1991) pero sólo los números de oxidación 0, 2, 3 y 6 son lo suficientemente estables para tener importancia química y biológica (Tabla 1) (Rizzotto et al. 1992).

Tabla 1. Estados de oxidación y propiedades de los compuestos del cromo

Compuesto	Geometría	Estado de oxidación
$[\text{Cr}(\text{CO})_5]^{-2}$	Bipirámide trigonal	-2
$[\text{Cr}_2(\text{CO})_{10}]^{-2}$	Octaedro	-1
$[\text{Cr}(\text{bipy})_3]$	Octaedro	0
$[\text{Cr}(\text{CNR})_6]^+$	Octaedro	+1
$[\text{Cr}(\text{CO})_2(\text{diars})_2\text{X}]^+$	Prisma trigonal	+2
$[\text{CrC14}]^{-1}$	Tetraedro	+3
$[\text{CrF}_6]^{-2}$	Octaedro	+4
$[\text{CrOCl}_4]^{-1}$	Pirámide cuadrada	+5
$[\text{CrO}_4]^{-2}$	tetraedro	+6

El Cr(VI) es considerada la forma más tóxica del cromo, usualmente está asociado al oxígeno formando cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). En contraste, el Cr(III) en las formas de óxido, hidróxido o sulfato, es mucho menos móvil y existe principalmente ligado a la materia en el suelo (Cervantes et al. 2001). En suelos frescos y húmedos y en condiciones levemente ácidas, la oxidación del cromo, puede ocurrir en presencia de óxidos de hierro y manganeso, sin embargo la reducción del cromo puede ocurrir en presencia de sulfuros y hierro (II) (condiciones anaerobias) y se acelera en presencia de la materia orgánica del suelo, por lo que un suelo con materia orgánica suficiente puede permitir retener por más tiempo el cromo en el suelo. (González-Pineda et al. 2006). El Cr(III) también pudiera oxidar al Cr(VI) en presencia de oxígeno en exceso, siendo transformado de nuevo a la forma más tóxica del elemento (interacción del cromo). Los cromatos y dicromatos, según evidencias son de mayor toxicidad para las plantas (Aportela et al. 2001).

1.3 Efectos biológicos del Cromo

El Cr contamina fuentes de alimentos y se acumula en los productos agrícolas a través del suelo, agua y contaminación que supone un grave riesgo para la salud de las personas de todo el mundo (Dubey et al. 2010). Muchos otros elementos traza esenciales son también tóxicos en exceso, pero el cromo es el único en el hecho de que su esencialidad está limitada a un estado de valencia y su toxicidad a otro y que la transformación del estado de valencia esencial Cr(III) al tóxico Cr(VI) no ocurre en organismos vivos (Rizzotto et al. 1992). La toxicidad del cromo radica en la reducción de Cr(VI) a algún estado de oxidación menor, no necesariamente el Cr(III), donde radicales libres son formados. Los complejos del Cr(V) son formados a partir del Cr(VI) por la reducción de agentes tales como NAD(P)H, FADH₂, varias pentosas y glutatión. Estos compuestos reaccionan con H₂O₂ generando cantidades significativas de radicales OH. Los radicales libres OH pueden producir alteraciones en el ADN así como otros efectos tóxicos (Cervantes et al. 2001).

1.4 Transporte y acumulación del Cromo en plantas

Una de las primeras interacciones del Cr con la planta ocurre durante el proceso de absorción. Como el Cr no es un elemento esencial para las plantas, los mecanismos de captación de su absorción no son específicos (Hayat et al. 2011)

El fosfato y el sulfato son similares a la geometría de los aniones que forman el Cr(VI), por lo que se plantea la posibilidad de que éste pueda penetrar a la raíz a través de los transportadores de estos nutrientes y causar un efecto negativo sobre el crecimiento de la raíz. (Ortiz-Castro et al. 2009). Se sugiere que el cromo es transportado activamente a través de la membrana celular de procariotas y eucariotas. Una vez dentro de la célula, el Cr(VI) es reducido a Cr(III). (Cervantes et al. 2001).

En los vegetales, el Cr se transporta desde la raíz hasta la parte aérea a través del xilema, acumulándose principalmente en las raíces y en cantidades menores en el follaje y órganos reproductivos. (Huffman y Allaway 1973).

El Cr(VI) y Cr(III) cruzan la endodermis vía simplasto. El Cr(VI) en el citoplasma puede reducirse a Cr(III), el cual es retenido en las células del córtex, con lo que disminuyen las concentraciones de Cr(VI) en otros tejidos. Esto podría explicar la baja toxicidad del Cr (III) (Cervantes et al. 2001).

La causa de la mayor acumulación de Cr en las raíces de las plantas podría deberse a que éste se inmoviliza en las vacuolas de las células de la raíz, por lo que lo hace menos tóxico, lo cual puede ser una respuesta natural de la planta para evitar la toxicidad (Shanker et al. 2004).

1.5 Efectos del cromo en el crecimiento y desarrollo de las plantas

Son varios los procesos biológicos que se ven afectados por el Cr(VI) en el ambiente externo e interno de la planta incluyendo cambios en los patrones de crecimiento y desarrollo de la raíz y del follaje. (Shanker et al. 2005). El crecimiento y desarrollo de la planta son procesos esenciales para la propagación de la especie, estos procesos son muy dependientes de ciertos recursos externos como el suelo y el aire.

La germinación es el primer procesos fisiológico afectado por el Cr. La germinación de las semilla de la maleza *Echinochloa colona* se redujo un 25% con 200 μ M Cr. Niveles altos (500 ppm) de Cr(VI) en suelos reduce la germinación hasta un 48% en el arbusto de frijol *Phaseolusvulgaris*. Peralta et al. (2001) encontraron que 40 ppm de Cr(VI) reduce en un 23% la capacidad de las semillas de alfalfa para germinar y crecer en el medio contaminado. Las reducciones de 32 y 57% en la germinación de caña de azúcar se observó con 20 y 80 ppm de Cr, respectivamente (Shanker et al. 2005).

También se ha reportado una disminución en la biomasa de la raíz y del follaje en las plántulas de *Arabidopsis thaliana* trasplantadas a un medio nutritivo suplementado con 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Ortiz-Castro et al. 2007). Algunos autores sugirieron que la disminución del crecimiento de la raíz debida a la toxicidad del Cr puede ocurrir por la inhibición en la mitosis y por una alteración en el alargamiento de las células, causando un colapso del sistema radical y una subsiguiente incapacidad para la absorción de agua y nutrientes del medio (Barceló et al. 1986). Reportaron que el decremento en las raíces de *Salix viminalis* cualquiera que fuera su longitud, ninguna fue más afectada por otros metales como por el cromo.

Se ha reportado que la respuesta general de crecimiento de la raíz disminuyó debido a que la toxicidad del Cr podría ser debido a la inhibición de la división celular, al alargamiento o a la extensión del ciclo celular en las raíces (Breckle, 1991).

Los efectos adversos de Cr sobre la altura de planta y crecimiento de los brotes se han notificado (Rout et al. 1997). Cuando el Cr se añadió en 2, 10 y 25 ppm a soluciones de nutrientes en cultivos de avena en arena se observó 11%, 22% y 41% de reducción en la altura de la planta, respectivamente, sobre el control (Anderson et al. 1972). Hubo una reducción significativa en la altura de la planta en *Sinapsis alba* cuando el Cr fue adicionado en 200 o 400 mg kg^{-1} de suelo junto con fertilizantes de N, P, K y S (Hanus y Tomás 1993). La reducción de la altura de la planta podría ser debida principalmente a la reducción del crecimiento de las raíces y la consecuente reducción de nutrientes y de agua a las partes superiores de la planta. Además de esto, el transporte de Cr a la parte aérea de la planta puede tener un efecto directo sobre el metabolismo celular de los brotes, lo que contribuye a la reducción de la altura de la planta. (Shanker et al. 2005).

1.6 Tolerancia de las plantas al Cromo

Los mecanismos de tolerancia al Cr en las plantas no se han esclarecido, sin embargo, se ha observado que algunos miembros de la familia *Brassicaceae* acumulan grandes cantidades de Cr, los cuales se han utilizado como un modelo para el estudio de la resistencia natural a metales pesados (Zayed et al. 1998). Las plantas son capaces de reducir el Cr(VI) a Cr(III) en las raíces y se sugiere que este proceso podría estar catalizado por reductasas de Cr similares a las encontradas en bacterias, sin embargo, hasta la fecha estas enzimas no se han identificado (Lytle et al. 1998).

1.7 Nutrición vegetal

Todos los seres vivos deben obtener materias primas de su entorno (Sadava et al. 2006). Las plantas son organismos cuyos requerimientos vitales son cubiertos por la luz, el CO₂, el agua, y el suministro de nutrientes minerales por el suelo. Únicamente ciertos elementos químicos son esenciales para las plantas. Un elemento esencial se define como aquel que es un componente intrínseco de la estructura o metabolismo del organismo y cuya ausencia causa severas anomalías en el crecimiento, desarrollo o reproducción (Taiz y Zeiger 2006). Estos nutrientes incluyen los ingredientes principales de macromoléculas: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. El carbono es captado como dióxido de carbono atmosférico, a través de las reacciones de fijación de carbono de la fotosíntesis. El hidrógeno y el oxígeno entran en las plantas principalmente como agua, por lo que estos elementos están en suministro abundante (Sadava et al. 2006).

En las plantas las concentraciones de los distintos elementos varía ampliamente. Considerando las concentraciones usuales, los nutrientes inorgánicos esenciales se pueden dividir en dos grandes grupos: los macronutrientes que son elementos

necesarios en grandes cantidades y los micronutrientes que son los que se necesitan en poca cantidad o en trazas (Hamilton et al. 1992). Tabla 2.

Tabla2.Elementos esenciales para las plantas (Modificada de Taiz y Zeiger 2006).

Elemento	Símbolo químico	Forma disponible al Vegetal	Concentraciones en tejido seco		Número relativo De átomos comparado con el de molibdeno
			mg/kg	(%)	
Molibdeno	Mo	MoO_4^{2-}	0.1	0.00001	1
Níquel	Ni	Ni^{2+}	<0.1	<1	<1
Cobre	Cu	Cu^+ , Cu^{2+}	6	0.0006	100
Zinc	Zn	Zn^{2+}	20	0.0020	300
Manganeso	Mn	Mn^{2+}	50	0.0050	1000
Boro	B	H_3BO_3	20	0.002	2000
Hierro	Fe	Fe^{3+} , Fe^{2+}	100	0.010	2000
Cloro	Cl	Cl^-	100	0.010	3000
Azufre	S	SO_4^{2-}	1000	0.1	30000
Fósforo	P	H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}	2000	0.2	60000
Magnesio	Mg	Mg^{2+}	2000	0.2	80000
Calcio	Ca	Ca^{2+}	5000	0.5	125000
Potasio	K	K^+	10000	1.0	250000
Nitrógeno	N	NO_3^- , NH_4^+	15000	1.5	1000000
Oxígeno	O	O_2 , H_2O	450000	45	30000000
Carbono	C	CO_2	450000	45	35000000
Hidrógeno	H	H_2O	60000	6	60000000

De entre los órganos de la planta, las raíces son las que obtienen la mayoría de los nutrientes minerales necesarios para crecimiento. Al crecer a través del suelo, las raíces buscan nuevas fuentes de nutrientes minerales y agua, eso ayuda al crecimiento de las hojas y los tallos. El crecimiento de las hojas permite que una planta tenga luz segura y dióxido de carbono, que a su vez permite que las raíces puedan continuar su crecimiento en el suelo. (Taiz y Zeiger 2006).

1.8 Transporte de macronutrientes

Las plantas poseen proteínas de transporte (transportadores) para la captación de los nutrientes y su movilización a los diferentes tejidos y compartimentos celulares, las cuales difieren entre sí no únicamente en su localización, sino también en su modo de activación, su especificidad y afinidad por el sustrato (Amtmann y Blatt 2008). Casi todos los macronutrientes forman parte de macromoléculas como las proteínas (N y S), ácidos nucleicos (N y P), fosfolípidos (P) y la clorofila (Mg). El P y Mg tienen funciones adicionales en la conservación y conversión de la energía (Mg-ATP). De acuerdo con estas funciones, la regulación de los transportadores de N, P, S y Mg tienen el objetivo general de suministrar a la planta moléculas esenciales para la producción de biomasa y energía durante su crecimiento y desarrollo (Amtmann y Blatt 2008).

El K y el Ca difieren en varios aspectos con otros macronutrientes. Estos no son metabolizados y permanecen en su forma elemental iónica. Además, poseen la peculiaridad de actuar como osmolitos, impulsando el crecimiento y manteniendo el contenido de agua de la planta (Blatt 2000).

1.9 Fósforo

En el suelo, el P se encuentra en diferentes formas, como P orgánico y P inorgánico (Pi). Con frecuencia es un nutriente limitante debido a su baja disponibilidad y movilidad. El transporte de P a través de la membrana implica un gasto energético, debido a la concentración relativamente alta de éste en el citoplasma y al potencial negativo de membrana característico de las células. El fosfato (HPO_4^{2-}) del suelo es absorbido por las raíces de las plantas a través de un transportador e incorporado a diferentes compuestos orgánicos, incluidos azúcares fosfato, fosfolípidos y nucleótidos. El principal punto de entrada del fosfato en las rutas de asimilación es la formación de ATP.

En *A. thaliana* hay múltiples transportadores de Pi. La familia *Pht1* contiene transportadores de alta afinidad e incluye 17 de los 18 genes de transportadores de Pi en plantas (Mudge et al. 2002). De la familia *Pht1*, al menos 12 genes se inducen en raíz en respuesta a la deficiencia de Pi, los cuales se expresan diferencialmente, mientras que algunos son fuertemente regulados por deficiencia de Pi, otros tienen expresión constitutiva (Mudge et al. 2002).

La absorción de nutrientes del suelo por parte de la mayoría de las plantas superiores aumenta notablemente por la presencia natural de hongos micorrizógenos asociados a sus sistemas radicales. Las micorrizas son especialmente importantes en la absorción y en la transferencia del fósforo (Taiz y Zeiger 2006)

1.10 Azufre

El azufre es un elemento esencial para la célula, debido a que está presente en los aminoácidos cisteína, metionina y en muchas biomoléculas importantes implicadas en la estructura y actividad biológica de las proteínas (Davidian y

Kopriva 2010). El azufre está disponible para las plantas principalmente en la forma de sulfato (SO_4^{2-}) (Leustek y Saito 1999). Una vez que el SO_4^{2-} ingresa por las células de la raíz, éste se acumula transitoriamente en las vacuolas, o bien entra a la compleja ruta metabólica de reducción de SO_4^{2-} en los cloroplastos de las hojas.

En *A. thaliana* se han reportado 14 genes para transportadores de sulfato. Los transportadores de alta afinidad se expresan exclusivamente en la raíz, mientras que los de baja afinidad se expresan constitutivamente. (Davidian y Kopriva 2010).

La coordinación del transporte de SO_4^{2-} del suelo a la raíz y a través de la planta requiere la existencia de mecanismos específicos de señalización que permiten controlar y regular a las proteínas involucradas en su captación y transporte, así como su asimilación (Davidian y Kopriva 2010). Estas proteínas reguladoras se expresan en respuesta a las señales internas y externas de disponibilidad de SO_4^{2-} percibidas por la planta.

1.11 Nitrógeno

El Nitrógeno (N) es un nutriente mineral requerido en grandes cantidades y su disponibilidad es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo vegetal (Kraiser et al. 2011). Las plantas adquieren N del suelo en su forma inorgánica, como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). La abundancia relativa de estos dos iones es muy variable y en gran medida depende de la velocidad de dos procesos microbianos: la mineralización y la nitrificación (Crawford y Forde 2002). La nitrificación hace que casi todo el nitrógeno que absorben las plantas sea en forma de nitrato (Hamilton et al. 1992).

En *A. thaliana* se han identificado dos familias de transportadores, *NRT1* y *NRT2*. La familia de genes *NRT2*, codifica transportadores de NO_3^- de alta afinidad, mientras que *NRT1* codifica transportadores de baja afinidad, con excepción de *NRT1.1*, el cual es un transportador de afinidad dual involucrado en la captación de NO_3^- tanto de baja como de alta afinidad (Kraiser et al. 2011).

1.12 Hierro

Las funciones y efectos fisiológicos del hierro en las plantas dependen de los cambios en sus estados de oxidación, entre Fe^{2+} y Fe^{3+} y de la formación de complejos con radicales orgánicos e inorgánicos. Se ha demostrado que las raíces de las plantas reducen Fe^{3+} a Fe^{2+} y este proceso parece que es un requisito esencial para absorberlo a partir de la solución del suelo. Después de su absorción, el Fe^{2+} se oxida y se transporta a la parte aérea en forma de citrato férrico, parte del hierro puede almacenarse en las hojas en forma de fosfoproteína férrica: fitoferritina, que sirve de reserva para el desarrollo de los plastos y en consecuencia para la fotosíntesis (Wild 1988). El transporte de hierro a larga distancia en el xilema de la planta probablemente es mediado por los ácidos orgánicos, tales como el citrato y el malato (Vianders et al. 1999).

1.13 Manganeso

El principal papel comprobado para el Mn es el que juega en la evolución del oxígeno en la fotosíntesis (Wild 1988). La absorción de Mn por las plantas depende principalmente de la forma en que este elemento se encuentre en el suelo. En suelos ácidos el Mn^{4+} es reducido a la forma bivalente Mn^{2+} que es absorbido en grandes cantidades, tóxicas para las plantas, afectando principalmente la parte aérea y en menor grado el sistema radical. El efecto tóxico del Mn generalmente ocurre en suelos ácidos, con un pH inferior a 5.5.

El exceso de Mn en el suelo tiene dos efectos en la planta:

- 1.- Por su antagonismo con el Fe, el Mn bloquea la absorción de dicho nutrimento por la planta e induce una deficiencia de Fe.
- 2.- El manganeso absorbido por la planta se acumula en el tejido foliar, principalmente en las hojas viejas causando toxicidad al tejido foliar, lo que se manifiesta por manchas o puntos necróticos de color pardo (Salinas et al. 1981).

1.14 Zinc

La planta absorbe las formas iónicas (Zn^{2+}) y probablemente también, el Zn combinado en complejos. Existe sinergia con el de CaCl_2 , ya que en presencia de éste aumenta el contenido de Zn en la planta. Esta sinergia puede explicarse por la alta solubilidad de ZnCl_2 . El maíz es uno de las especies de plantas más exigentes en Zn (Urbano 1992).

1.15 Efectos del Cromo en el metabolismo de nutrientes minerales

La toxicidad del Cr puede ser explicada en parte por la interferencia en el metabolismo de los nutrientes (Zayed y Terry 2003). El Cr (VI) disminuye la entrada de fósforo (P), potasio (K), hierro (Fe), magnesio (Mg) y manganeso (Mn) (Turner y Rust 1971). Terry (1981) reportó que concentraciones tóxicas de Cr (VI) ($>2\text{mg/kg}$) en plantas de remolacha, inhiben la absorción de calcio (Ca). Barceló et al. (1985) describieron la inhibición en la captación de P, K, Zn, Cu y Fe, en plantas de frijol expuestas a Cr(VI) en una solución nutritiva; además, reportaron que el Cr agrava la clorosis por deficiencia de Fe, al interferir con su metabolismo. Algunos de los efectos inhibitorios en el crecimiento de la raíz y del follaje podrían ser causados por la competencia del CrO_4^{2-} con este nutriente, mediante la interacción de ambos en el transporte al interior de las células.

La entrada del Cr(VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un transporte activo, pero se carece de información concluyente sobre los mecanismos de transporte involucrados. Se ha estudiado la inhibición en la captación de Cr(VI) por algunos aniones que forman elementos del grupo VI de la tabla periódica, en mayor medida por SO_4^{2-} , el cual ejerce una inhibición competitiva debido a la similitud estructural de los iones (Shewry y Peterson 1974).

1.16 El Maíz (*Zea mays*)

El maíz es una especie monocotiledónea que pertenece a la familia *Poaceae* de gran valor comercial y cultural en Mesoamérica. Recientemente el maíz se ha establecido como un organismo modelo en la investigación básica para generar información sobre la biología de los cereales (Demostrables y Scanlon 2009).

El ciclo de vida del maíz puede dividirse en dos grandes etapas: i) un estadio vegetativo y ii) la fase reproductiva. La primera, comprende desde la germinación hasta la emergencia de las inflorescencias masculinas (panoja), mientras que la etapa reproductiva involucra el desarrollo de las inflorescencias femeninas (espigas). Posteriormente la polinización de las espigas da lugar a la formación de los granos de la mazorca (Monasterio et al. 2007).

La raíz del maíz al igual que en otras plantas, participa en la captación de agua y nutrientes del suelo, además provee soporte estructural y es el sitio de interacción con factores bióticos y abióticos que con frecuencia determinan la productividad del cultivo (Liedgens et al. 2000, Hochholdinger et al. 2004a). El desarrollo del sistema radicular del maíz puede ser embrionario y post-embrionario. El primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en las células del cigoto dando lugar a la formación del suspensor y al embrión.

Después de las divisiones antes indicadas aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical-foliar y radicular en el coleoptilo.

Finalmente, se desarrollan estructuras embrionarias tales como el primer primordio de la hoja, la raíz primaria (RP) y las raíces escutelares seminales (RES) (Figura1) (Nardmann y Werr 2009).

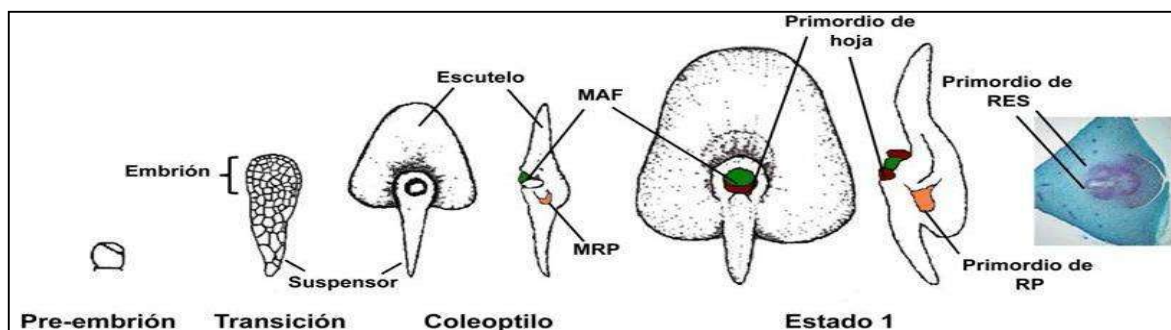


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales en maíz.

La raíz del maíz muestra una estructura radicular compleja comparada con el sistema radicular más simple de *Arabidopsis thaliana* (Figura 2). En el primer caso, las raíces se forman endógenamente en el embrión y consisten de la raíz primaria y de las raíces escutelares que aparecen durante la germinación. Las raíces escutelares seminales son una parte importante para la captación inicial de agua, nutrientes y para el establecimiento de la plántula en el suelo. Las raíces post-embrionarias se forman después de la germinación y continúan creciendo hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en las plantas adultas. El sistema radicular post-embrionario está formado por raíces de corona o nodales (RC) y de raíces aéreas (RA) que surgen tardíamente en los nodos del tallo (Figura 3) (Singh et al. 2010, Hochholdinger y Feix, 1998).

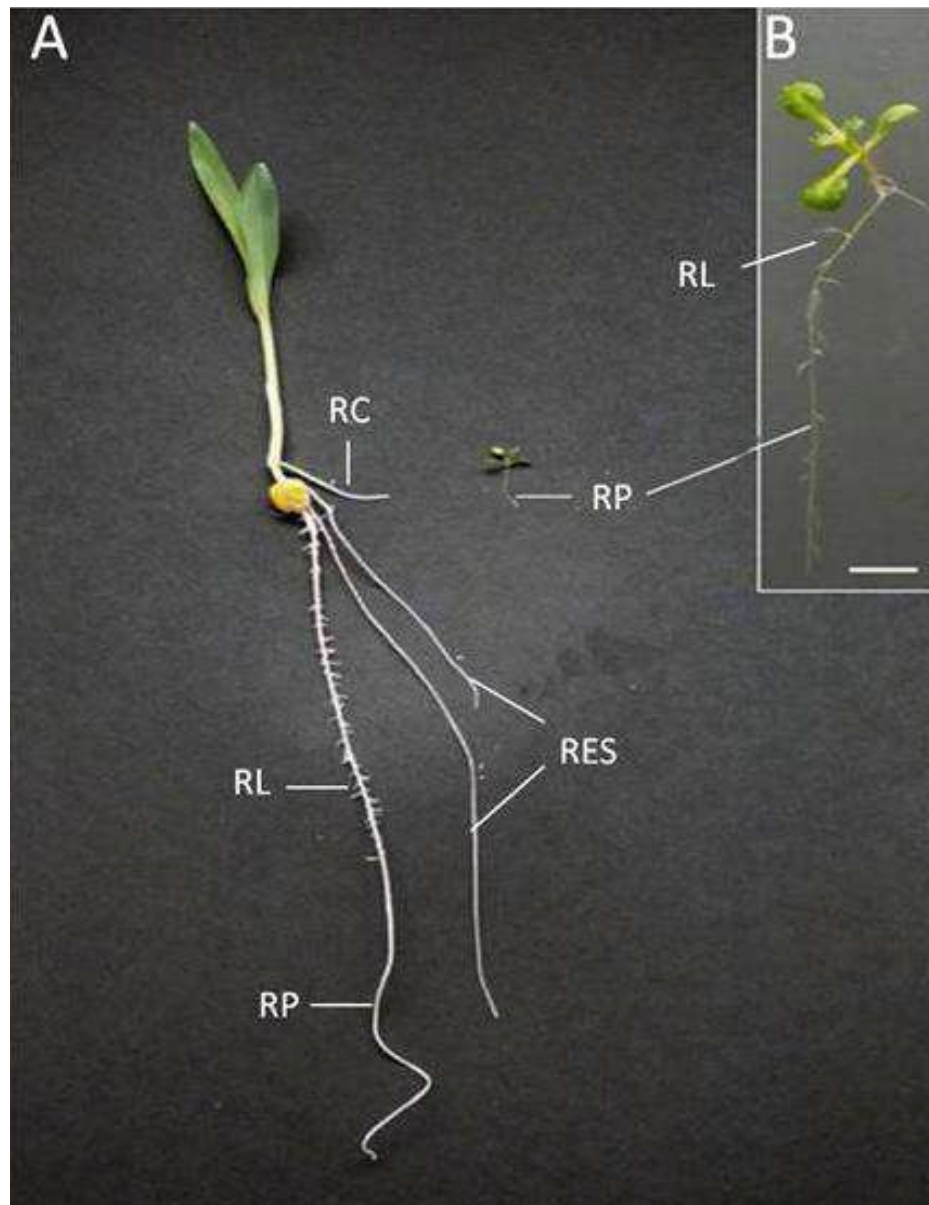


Figura 2. Fotografía comparativa de la plántula de maíz (*Zea mays*). (A) y *Arabidopsis thaliana*(B) de 14 días de edad. Las fotografías muestran la complejidad de la arquitectura de la raíz de la plántula de maíz comparada con *A. thaliana*. RP: Raíz primaria; RES: Raíz escutelar seminal; RC: Raíz de corona; RL: Raíz lateral. Fotografía adaptada de Hochholdinger y Zimmermann (2008).

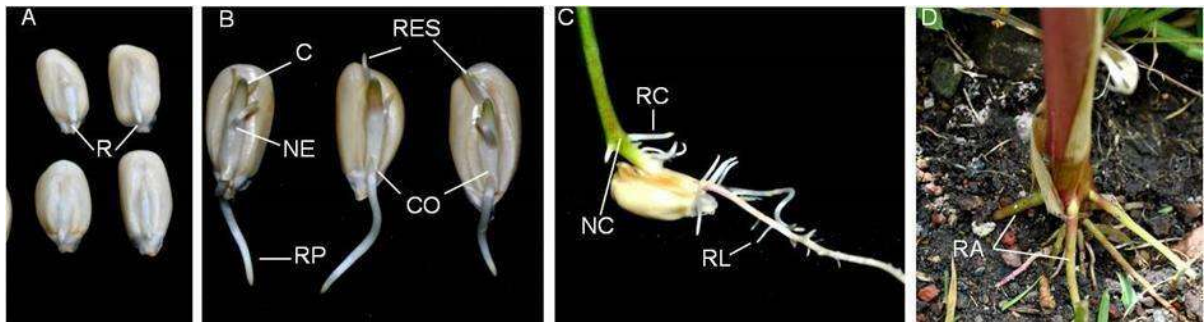


Figura 3. Desarrollo del sistema radicular del maíz. (A) Germinación de semillas por 48 hrs, se puede apreciar la salida de la radícula (R). (B) A los tres días de edad se puede observar la emergencia de la raíz primaria (RP) a través de la coleoriza (CO) y de las raíces escutulares seminales (RES) que se desarrollan a partir del nodo escutelar (NE). (C) A los ocho días de edad se observa la formación de las raíces de corona o nodales (RC) en el nodo del coleoptilo (NC) y de raíces laterales sobre la RP. (D) A las seis semanas de edad se aprecia la formación de las raíces aéreas (RA) en los nodos del tallo.

El tallo del maíz es erguido, sencillo y nudoso. Tiene surcos longitudinales en la parte inferior. Tiene una altura de unos 2 metros (lo más común aunque hay de mayor altura) con una serie de entrenudos de unos 16 cm. El primer tallo que emerge de la semilla se llama mesocotilo, que se alarga más o menos según la profundidad de siembra, al final de este tallo se forma la corona y luego el tallo final y las raíces. (Jalopez 2005).

Las hojas del maíz son alternas, abrazadoras, anchas, paralelinervas, lanceoladas y ásperas. Su longitud es de 40-45 cm y 6-8 cm de anchura. El número es constante para cada variedad. La planta tiene de 4 a 5 hojas embrionarias que van protegidas hasta que salen a la superficie por el coleoptilo, que se rompe saliendo la primera hoja.

El maíz es una planta monoica, en la cual se distinguen dos tipos de flores: Las flores femeninas, que se encuentran en la axila de algunas hojas, están formando una inflorescencia en espiga rodeada por largas brácteas que la cubren por completo. A la espiga se la llama mazorca y está formada por una serie de espiguillas, cada una de las cuales está formada por dos flores de las cuales la inferior aborta. Por lo tanto, cada espiguilla, en caso de fecundación dará un grano. La flor masculina está en la extremidad del tallo agrupada en panículas que se llaman vulgarmente penachos. Está formada por 3 a 10 filas de espiguillas emparejadas, cada una de ellas compuesta por dos glumas y contiene dos flores con tres estambres cada una siendo las dos flores fértiles. La fecundación es cruzada, cuando se realiza la fecundación con polen de otras variedades puede aparecer granos de coloración diferente. (Jalopez 2005).

El grano de la mazorca de maíz se dispone en hileras longitudinales y hay varios cientos en una mazorca. Es generalmente aplastado en un plano perpendicular al eje de la mazorca, como es el caso de la mayoría de los híbridos actuales. El grano se inserta a la mazorca por el pedúnculo de la flor. (Jalopez 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento del efecto de nutrientes en la captación del Cr(VI) en plantas, es un aspecto necesario para establecer propuestas de fitoremediación, mediante el uso de especies vegetales adecuadas. El maíz por ser una especie ampliamente cultivada en nuestro país, puede ser una alternativa para ser utilizado en remediación de suelos contaminados con Cr(VI), por lo que en este trabajo, como una primera etapa, se analizó el efecto de fosfato, sulfato y nitrato en la captación de Cr(VI) en condiciones *in vitro*.

III. HIPÓTESIS

La captación de Cr(VI) en plantas de maíz (*Zea mays*) es afectada por la disponibilidad de nutrientes en el medio, particularmente por fosfato y sulfato, que tienen una geometría similar.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Establecer el efecto del fosfato, sulfato y nitrato en la captación de Cr(VI) en plantas de maíz.

4.1 Objetivos particulares

- Seleccionar una variedad híbrida de maíz adecuada para los estudios *in vitro*
- Determinar el efecto de la concentración de Cr(VI), en la captación de este metal por plantas de maíz crecidas en medio nutritivos a diferentes tiempos de exposición.
- Determinar el efecto de fosfato, sulfato y nitrato en la captación de Cr(VI).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) híbrido “Canelo”, debido a que esta variedad presenta un alto porcentaje de germinación, además de su homogeneidad genética.

5.2. Preparación de semillas

Las semillas se sometieron a una desinfección, utilizando cloro comercial Cloralex® al 50% v/v por 7 minutos, con agitación constante de los tubos de plástico Corning®, pasado este tiempo se desechó el cloro y se agregó alcohol etílico incubando durante 15 minutos manteniendo en agitación constante, finalmente se desechó el alcohol y se hicieron 6 lavados con agua desionizada estéril.

5.3. Germinación de semillas, crecimiento y selección de plantas

Las semillas fueron sembradas en placas petri que contenían medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 10% de sacarosa y con 1% de agar. Cuatro días después, cuando las semillas germinaron, se seleccionaron sólo aquellas que tuvieron un tamaño aproximado de 2 cm y se transfirieron a vasos con tierra preparada para el cultivo de *A. thaliana* (comprada en CINVESTAV-IPN), dejando crecer las plantas por un periodo de 8 días más. Se seleccionaron plantas con un tamaño similar para los experimentos de captación de Cr.

5.4. Tratamientos con Cr y suplementos minerales

Las plantas de maíz seleccionadas, de 12 días de edad, se transfirieron a tubos Corning® de 50 ml, con medios líquidos MS 0.2x, suplementados con diferentes concentraciones de cromato de potasio (0, 200 ó 250 μM), con ó sin suplementos de fosfato de potasio, sulfato de potasio ó nitrato de potasio 3 mM. Sólo la raíz de cada planta se sumergió en el medio líquido. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las plantas se mantuvieron por 24 ó 48 horas, para posteriormente ser procesadas para su análisis. Los tratamientos utilizados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos utilizados para analizar la captación de Cr y el efecto de fosfato, sulfato ó nitrato.

Suplemento de nutrientes	Concentración de Cromato de potasio (μM)		
	0	200	250
Sin suplemento	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)
Fosfato de potasio (3 mM)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)
Sulfato de potasio (3 mM)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)
Nitrato de potasio (3 mM)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)	(24 y 48 h)

5.5. Procesamiento de las plantas y análisis de la captación de Cr y otros nutrimentos

Una vez que las plantas cumplían con el tiempo establecido en el medio líquido, se enjugaban en agua y se realizaban mediciones de peso y altura, tanto de la raíz como de la parte aérea. Las plantas se dejaban secar en una incubadora a 40°C por 1 semana, manteniendo por separado la parte aérea y la raíz, y se trituran en un mortero.

La concentración de Cr, Fe, P, Mn y Zn fue determinada mediante la técnica de Espectrometría de masas con ionización por plasma acoplado (IPC), solicitando los servicios de LANGEBIO, del campus del CINVESTV-IPN, unidad Irapuato.

5.6. Análisis estadístico

Los datos de las cuantificaciones obtenidas fueron procesados con el paquete estadístico SPSS 19.0, con un análisis de varianza y prueba de significación de Tukey para $P \leq 0.05$. Los intervalos de confianza fueron calculados en el programa Excel del paquete Microsoft Office para Windows 10.0.

VI. RESULTADOS

Para determinar la captación de Cr(VI) en plantas y la interferencia de nutrientes minerales en este proceso, se utilizó como modelo el maíz (*Zea mays*) var. Canelo. Previamente se compararon porcentajes de germinación y homogeneidad de crecimiento de 2 variedades de maíz híbridas, “Canelo” y “Pantera”, obteniéndose mejores resultados con la variedad Canelo (Figura 4). Los nutrimentos analizados fueron el fosfato y sulfato, los cuales presentan una similitud geométrica con el cromato. Se utilizó además el nitrato, el cual no presenta la similitud mencionada, aunque si tiene carga negativa. Las plantas de maíz de 12 días de edad, de tamaños similares fueron utilizadas por triplicado y se sumergió la raíz en los medios líquidos MS 0.2x, en tubos de plástico de 50 ml (Figura 5).



Figura 4. Pruebas de germinación y crecimiento de la variedad de maíz Canelo.

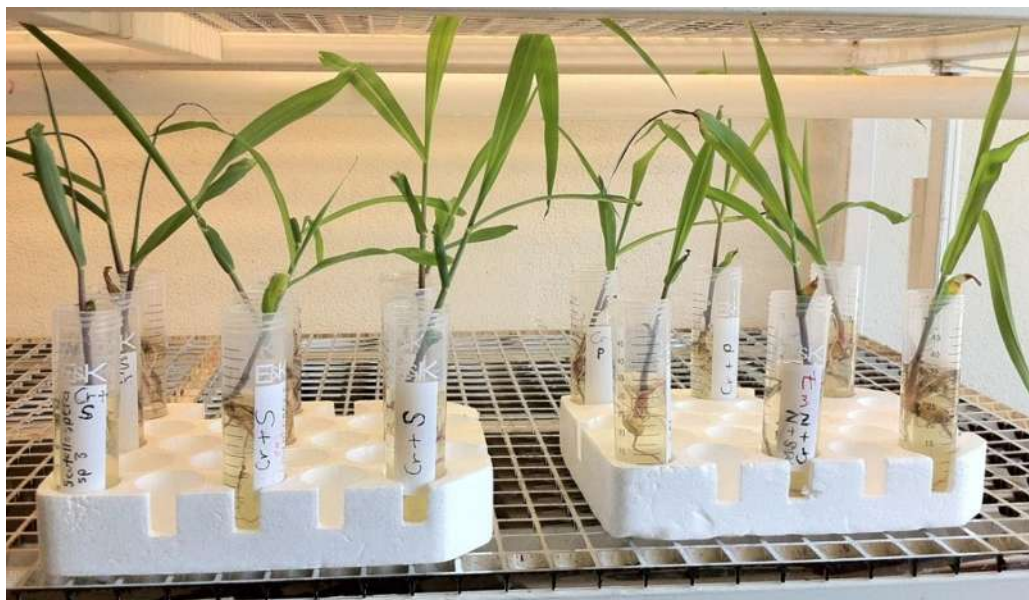


Figura 5. Plantas de maíz de tamaños similares en los tratamientos de medio MS+Cr y suplementos

Los resultados de la cuantificación de Cr de las plantas colocadas en soluciones de 200 μM de cromato de potasio se presentan en la figura 6. Se puede destacar que la mayor cantidad de Cr se ubica en las raíces, tanto a 24 como a 48 horas. A las 24 horas, en la parte de la raíz, el fosfato y el sulfato interfirieron en la captación de cromato, lo que posiblemente se deba a sus estructuras similares. No obstante, a las 48 horas no hubo diferencias en la concentración de Cr en la raíz.

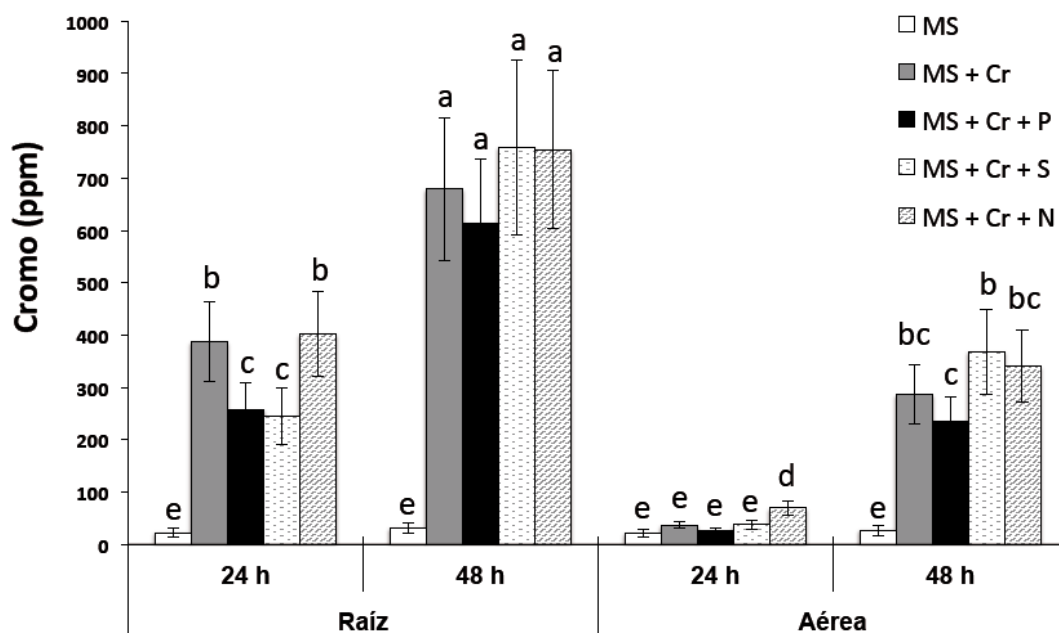


Figura 6. Cuantificación de Cr en la raíz y la parte aérea de plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.2X con cromato de potasio 200 μ M durante 24 ó 48 horas.

Los resultados de la cuantificación de Cr de las plantas colocadas en soluciones de 250 μ M de cromato de potasio se presentan en la figura 7. Se puede destacar que al igual que el tratamiento de 200 μ M de Cr, la mayor cantidad de éste se encuentra en las raíces. En lo referente a los suplementos de nutrimentos, la entrada a la raíz no se inhibió y por el contrario aumentó con la adición de sulfatos ó nitratos a las 24 horas. En cambio, el transporte a la parte aérea a las 24 horas disminuyó con la adición de fosfato.

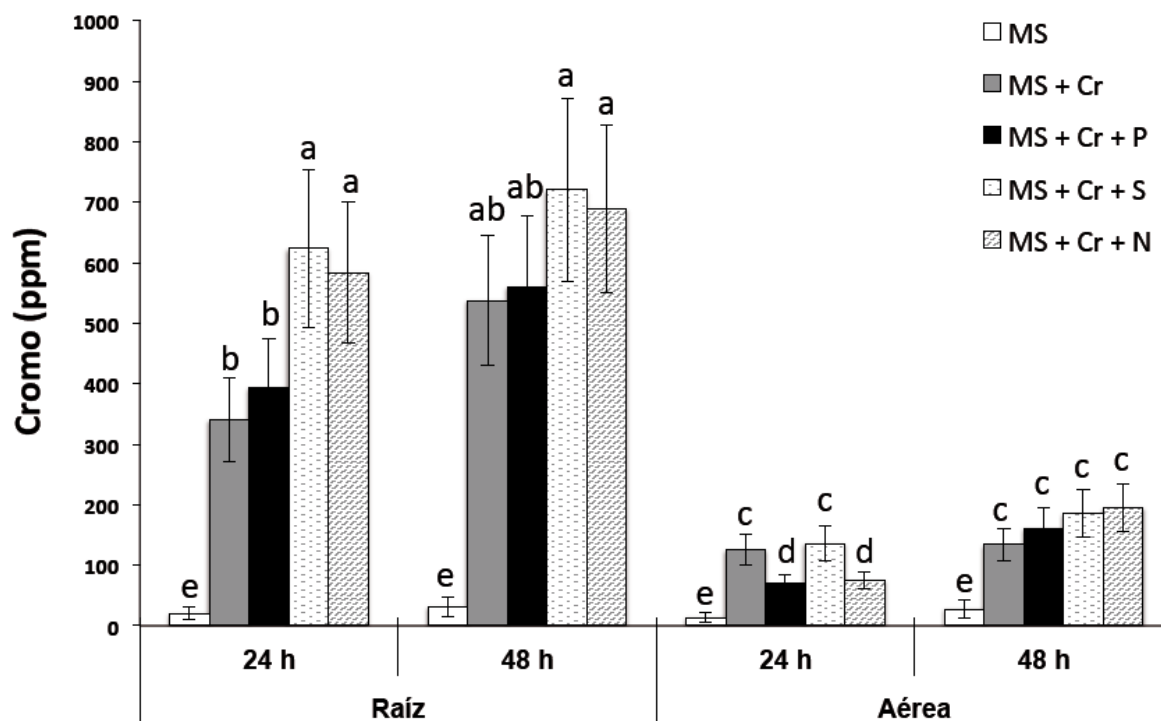


Figura 7. Cuantificación de Cr en la raíz y la parte aérea de plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.2X con cromato de potasio 250 μ M durante 24 ó 48 horas.

La concentración total de Cr en las plantas, considerando la parte aérea y la raíz se presenta en la figura 8. A las 24 horas, sin suplemento de nutrientes, hubo igual cantidad de Cr en las plantas colocadas en 200 y 250 μ M de Cr, pero con el suplemento de sulfato y fosfato la cantidad de Cr fue mayor cuando las plantas se colocaron en la solución con 250 μ M de Cr. No obstante, a las 48 horas no hubo diferencia significativa en el Cr acumulado en las plantas colocadas en las diferentes concentraciones de Cr.

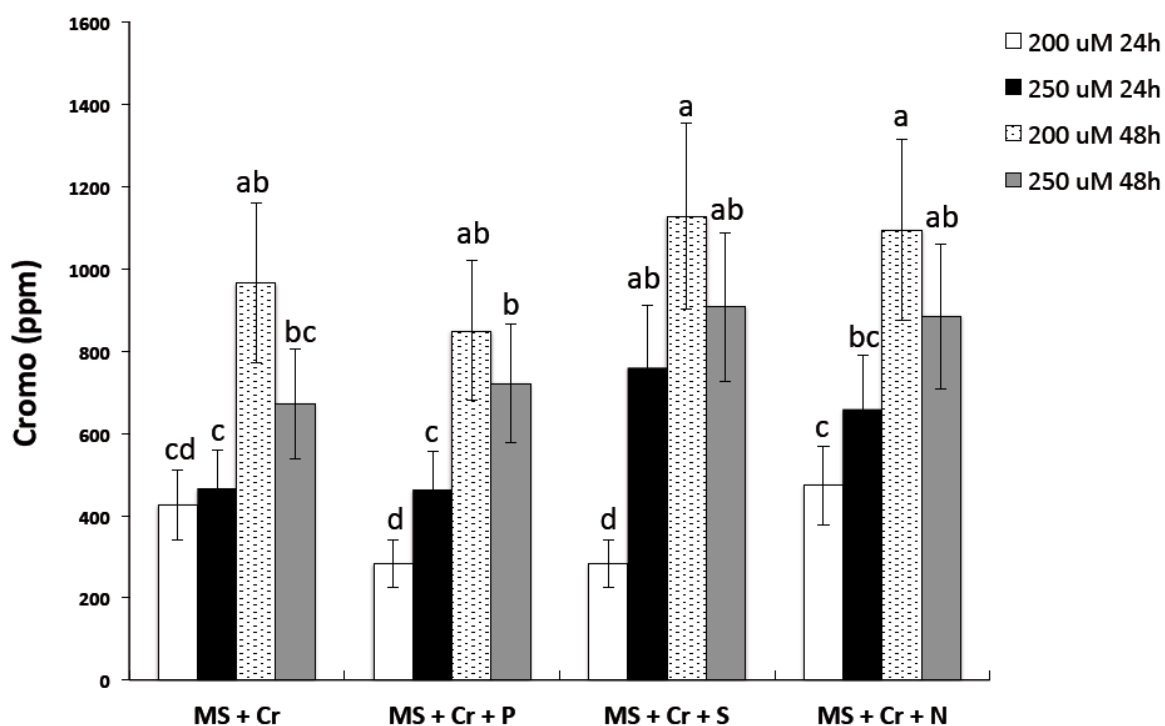


Figura 8. Cuantificación de Cr total en plantas de maíz var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.2X con cromato de potasio 250 μ M durante 24 ó 48 horas, con suplementos de nutrientes.

Para determinar cómo influye la concentración de Cr de la solución y los suplementos de nutrientes en la relación de Cr entre la parte aérea y la raíz, se hicieron los cálculos que se presentan en la figura 9. En esta gráfica una relación de 1 indicaría que hay cantidades iguales en la parte aérea respecto a la raíz, o bien 50% en la parte aérea y 50% en la raíz. A las 24 horas, la relación estuvo entre 0.15 y 0.20 (7.5 a 10% del Cr se encuentra en la parte aérea) en la concentración de 200 μ M, mientras que a 250 μ M la relación en el tratamiento sin suplemento de

nutrientes aumentó a 0.4 (20% del Cr), mientras que en los tratamientos con suplementos de nutrientes sólo se encontró el 10% del Cr en la parte aérea. A las 48 horas, el Cr en la parte aérea se mantuvo alrededor del 20% (0.4 de relación) en los tratamientos con solución de 200 μ M, de manera similar a los tratamientos con 250 μ M de Cr cuando hubo suplementos de nutrientes. No obstante, cuando el medio con Cr en la concentración de 250 μ M no tuvo suplementos de nutrientes, en la parte aérea de la planta se encontró hasta un 40% del Cr (Relación de 0.8).

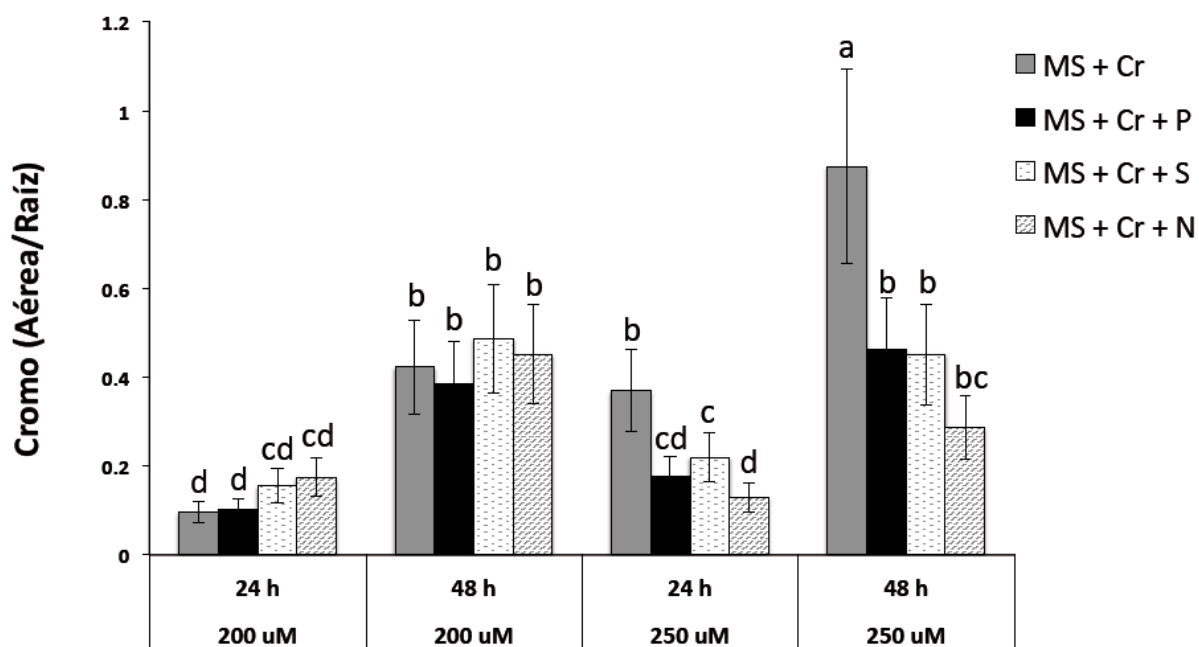


Figura 9. Relación de Cr entre la parte aérea y la raíz en plantas de maíz (*Zea mays*) var. Canelo, mantenidas en solución de MS 0.2X con cromato de potasio 200 ó 250 μ M durante 24 ó 48 horas, con suplementos de nutrientes.

El mayor transporte de Cr a la parte aérea en la concentración de 250 μM puede deberse a que el daño ocasionado a la planta ya no permitió controlar este transporte, lo cual si fue posible con los suplementos de nutrientes, sobre todo de nitrato. Los suplementos de nutrientes posiblemente le proporcionaron a la planta mejores condiciones nutricionales que le permitieron seguir controlando el transporte a la parte aérea. Sin embargo, no se descarta que los nutrientes pudieran interferir con el transporte del Cr de la raíz a la parte aérea, aunque esto no ocurrió en la concentración de 200 μM .

Se ha reportado que la presencia de Cr(VI) puede causar interferencia con la captación de otros nutrientes, particularmente del hierro (Fe). Para determinar si esta situación se presentaba en el sistema experimental del maíz, manteniendo las plantas en soluciones líquidas con 200 ó 250 μM de Cr, se cuantificaron los siguientes elementos: fósforo (P), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn). Los resultados de las cuantificaciones se presentan en las figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17.

En lo referente al fósforo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En cambio, el Fe si cambió su concentración en algunos tratamientos. A las 24 horas, en el medio con 200 μM de Cr, el Fe disminuyó su concentración en la parte aérea (Figura 11), pero se restableció la concentración con los diferentes suplementos de nutrientes. En cambio, en el medio con 250 μM de Cr, a las 48 horas, el Fe disminuyó su concentración tanto en la parte aérea como en la raíz (Figuras 16 y 17) y los suplementos de nutrientes no restablecieron la concentración de este metal.

El restablecimiento de la concentración de Fe por los suplementos de nutrientes en una menor concentración de Cr, sugiere que las plantas pueden todavía controlar algunos mecanismos que permiten hacer los ajustes necesarios

para la captación de nutrientes, lo cual no es posible a concentraciones mayores de Cr (250 μ M), posiblemente por el daño que se ha ocasionado a la plantas.

El Mn y el Zn tuvieron un incremento en la concentración en la parte aérea, cuando las plantas se mantuvieron por 24 horas en la concentración de Cr 200 μ M (Figura 11), pero no en tiempos mayores de esta concentración de Cr. Esto demuestra un efecto positivo en la captación de Mn y Zn, como respuesta de ajustes metabólicos, posiblemente para el uso de estos micronutrientes en las actividades enzimáticas

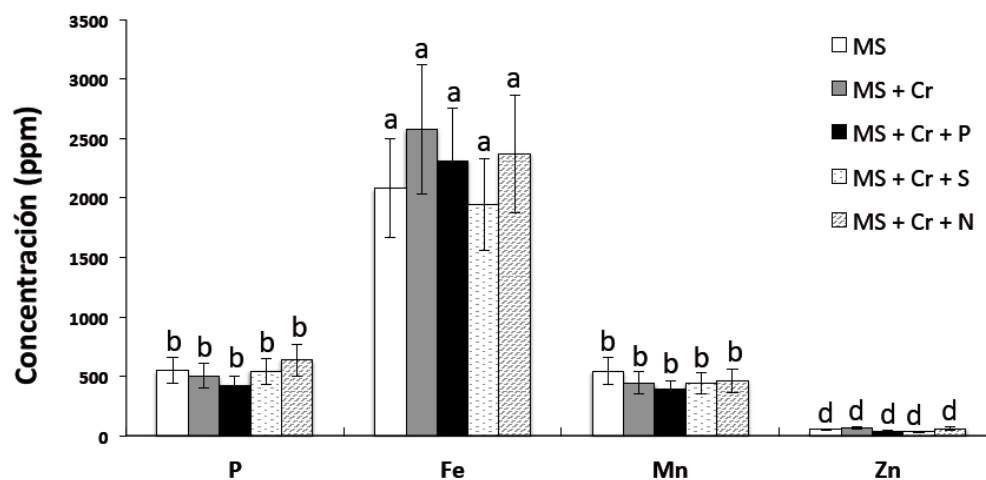


Figura 10. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 200 μ M por 24 horas.

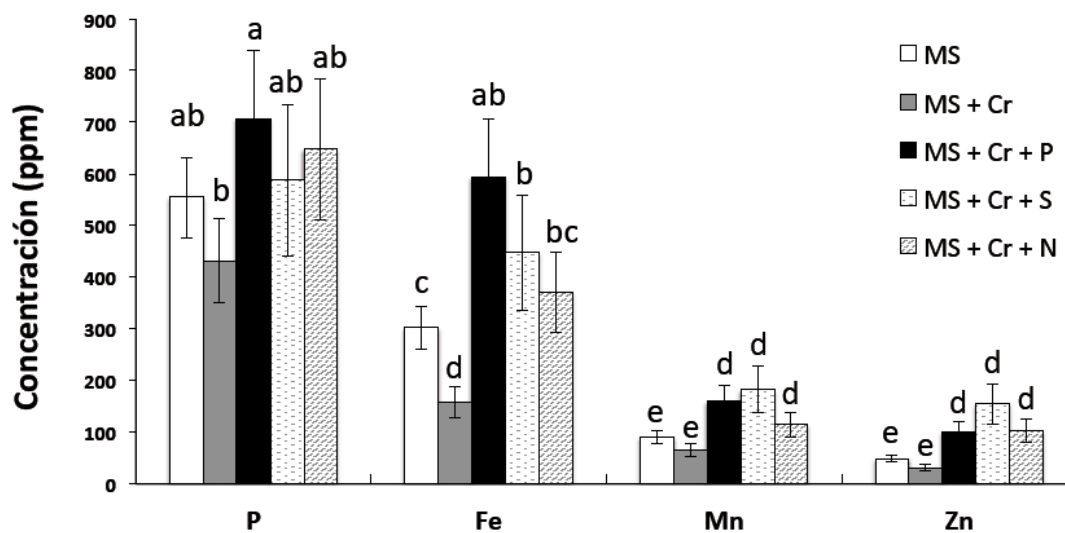


Figura 11. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 200 μ M por 24 horas.

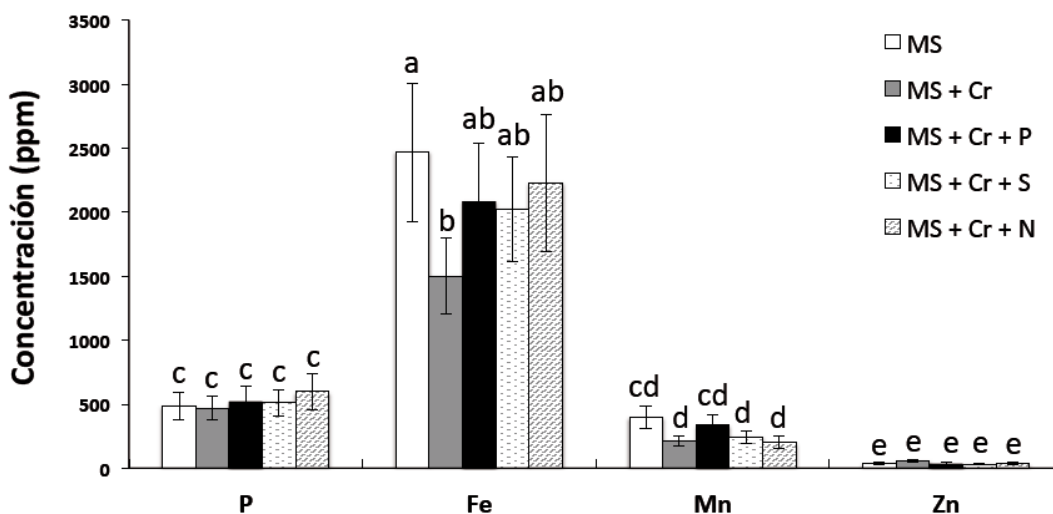


Figura 12. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 200 μ M por 48 horas.

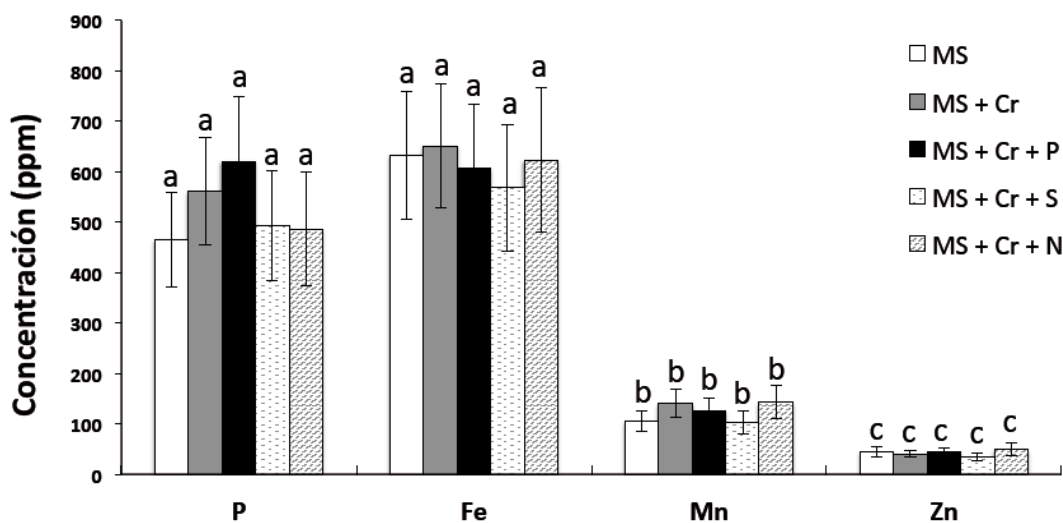


Figura 13. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 200 μ M por 48 horas.

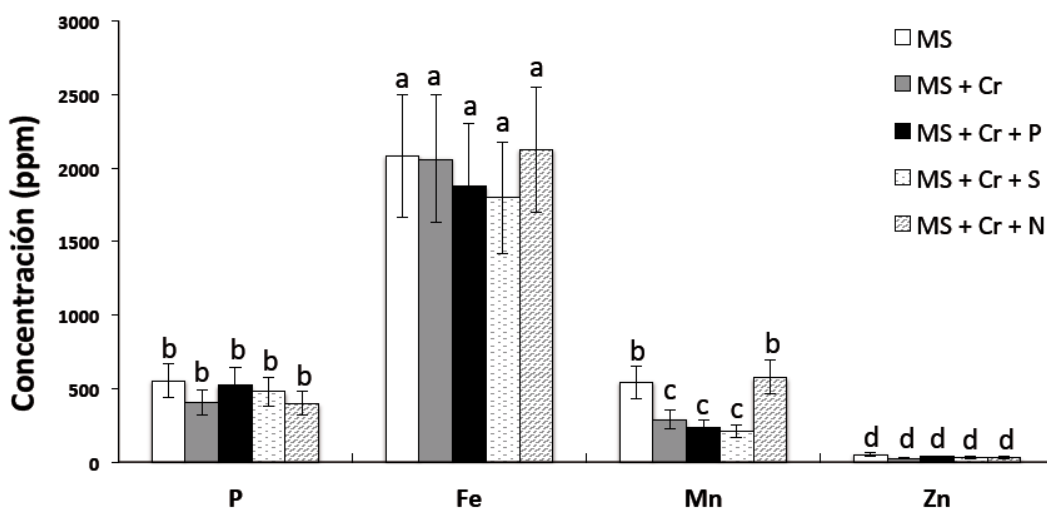


Figura 14. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 250 μ M por 24 horas.

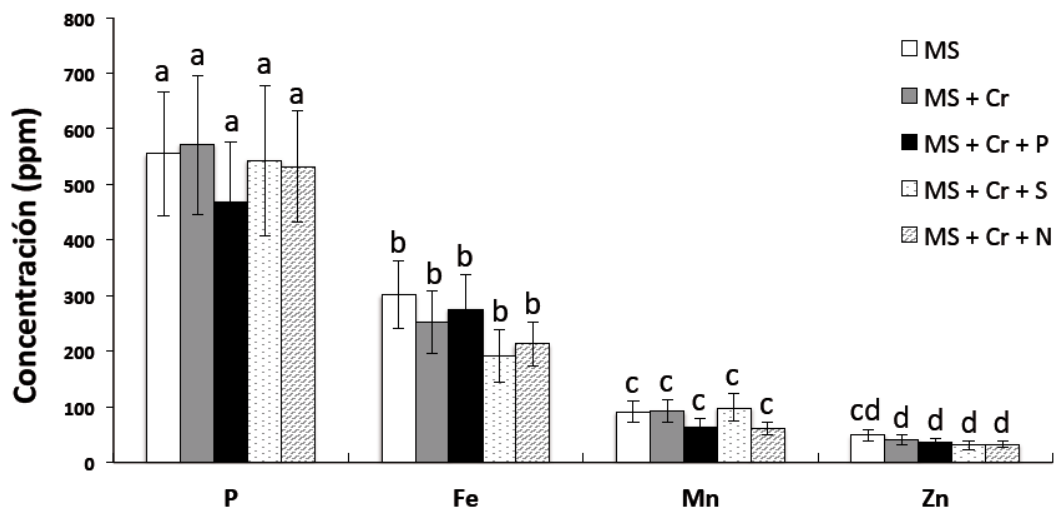


Figura 15. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 250 μ M por 24 horas.

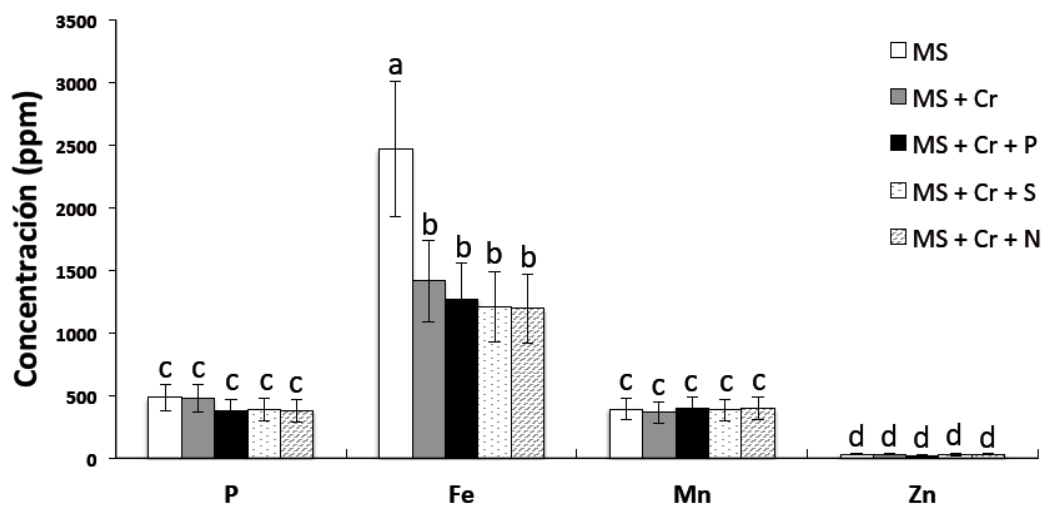


Figura 16. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la raíz de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 250 μ M por 48 horas.

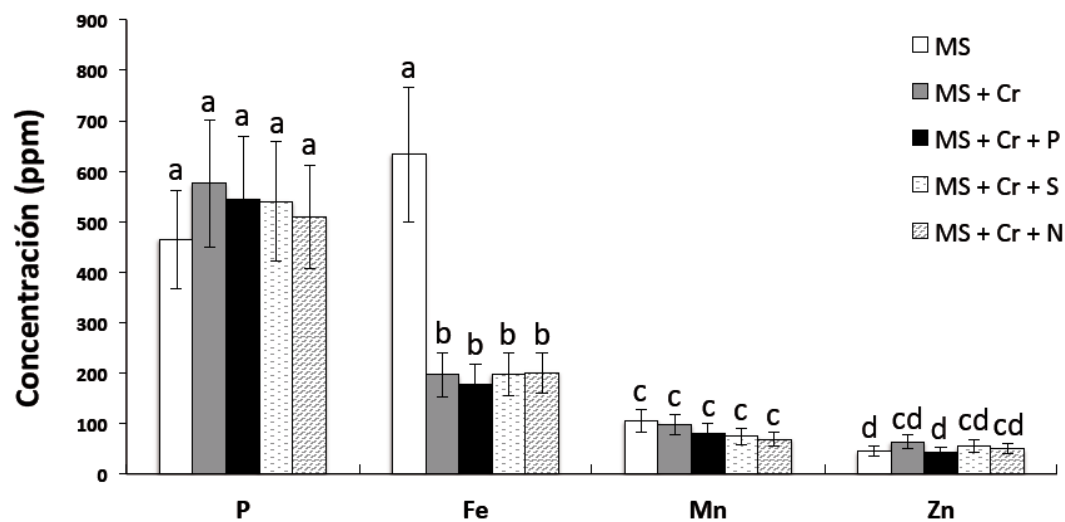


Figura 17. Concentraciones de fósforo, hierro, manganeso y zinc en la parte aérea de plantas mantenidas en medio MS 0.2x con Cr(VI) 250 μ M por 48 horas.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la captación de Cr(VI) en el maíz (*Zea mays*), una especie ampliamente cultivada en nuestro país, con numerosas variedades criollas e híbridos comerciales. En las condiciones *in vitro* utilizadas fue posible demostrar que la captación de cromato está influenciada por la concentración de este compuesto en el medio y por las concentraciones de fosfato y sulfato, dos compuestos con una geometría similar al cromato. Además, la presencia de cromato, en ciertas condiciones ocasiona la disminución de hierro (Fe) en las plantas.

La acumulación de Cr total en las plantas de maíz utilizadas dependió principalmente del tiempo en que éstas se mantuvieron en la solución con Cr (Figura 8), ya que a las 48 h se encontraron concentraciones de aproximadamente 1000 ppm, mientras que a las 24 h las concentraciones oscilaron entre 400 y 600 ppm. En cambio, en plantas de arroz de 15 días de edad, mantenidas por 7 días en tratamiento, se encontraron diferencias en la acumulación de Cr dependiendo de la concentración de este metal en la solución, 3000 y 5000 ppm de Cr en las soluciones de 100 y 250 μM de Cr, respectivamente (Dubey et al. 2010). La diferencia entre lo encontrado en maíz y arroz puede deberse a que en el último caso las plantas se mantuvieron por más tiempo en solución (7 días), lo que les permitió acumular más Cr, y por otro lado, las diferencias en las concentraciones de las soluciones fueron de mayor magnitud (100 y 250 μM), con relación al experimento de maíz (200 y 250 μM).

Se ha reportado con anterioridad que el Cr captado por las plantas se acumula principalmente en la raíz, lo que podría deberse a que éste se inmoviliza en las vacuolas de las células de la raíz, lo hace menos tóxico (Shanker et al. 2004).

En este trabajo confirmamos que el Cr se acumula principalmente en la raíz y existe influencia de la concentración de Cr en la solución nutritiva, ya que sin suplemento de nutrientes (Figura 9, MS + Cr) a las 24 horas, se encontró el 5% y 20% del Cr en la parte aérea, en las plantas mantenidas en medios con 200 y 250 μM de Cr, respectivamente, y del 20% y 40% en las plantas mantenidas por 48 h en los medios con 200 y 250 μM de Cr, respectivamente. De manera similar, en arroz el porcentaje de Cr acumulado en la parte aérea (10%, 20% y 24%) se incrementa al aumentar la concentración del Cr en el medio de cultivo (50 μM , 100 μM y 250 μM), respectivamente. De manera extrema, cuando se utilizan cantidades pequeñas de Cr en solución (0.004 μM), en la parte aérea se acumula menos del 1% del Cr total acumulado, en plantas de lechuga, tomate, papa, trigo y frijol (Huffman y Allaway 1973). Este comportamiento puede deberse a que la capacidad de almacenamiento del Cr en la raíz es rebasada y el exceso de Cr es transportado hacia la parte aérea, lo que se apoya por lo reportado por Kaszycki et al. (2005) de que la velocidad de transporte de Cr(VI) en la célula es más alta que su tasa de reducción a Cr(III), que es la forma en que se almacena en la vacuola.

Debido a la similitud estructural de los compuestos del Cr con los derivados de algunos elementos esenciales como SO_4^{2-} y PO_4^{3-} , estos pueden afectar la nutrición de las plantas de manera compleja (Shanker et al. 2005), interfiriendo con la captación, translocación y/o acumulación de varios nutrientes (Gardea-Torresdey et al. 2005). En nuestros resultados encontramos una interferencia del sulfato y fosfato en la acumulación de Cr en las plantas, en la solución de 200 μM de Cr (Figuras 6 y 8). Además, se encontraron interferencias del fosfato, sulfato y nitrato, en el transporte hacia la parte aérea cuando las plantas se incubaron en la solución de 250 μM (Figura 9).

Estas interferencias pueden ser debidas a la similitud geométrica de los iones cromato con el sulfato ó fosfato (Ortiz-Castro et al. 2009) y/o a la mejor condición nutricional de la planta con la adición de estos nutrientes.

Nuestros resultados también demostraron una interferencia del Cr(VI) con la acumulación del Fe en las plantas, particularmente cuando éstas se mantuvieron en la solución de 250 μM por 48 h (Figuras 14 y 15). Estos efectos del Cr han sido confirmadas por los estudios que se han hecho en *Amaranthus viridis*, en el que la absorción y la acumulación de Fe se asoció con la presencia de Cr en los sitios contaminados (Zou et al. 2006). Además, Hernández-Madrigal (2010) reportó que hay inhibición en la expresión de genes relacionados con la captación y acumulación de Fe, en plantas de *A. thaliana* crecidas en medios con Cr(VI) 140 μM . La interferencia del Cr(VI) con el metabolismo del Fe está relacionada en parte a la capacidad de Cr para desplazar otros metales (en particular Fe) de centros enzimáticas de importancia fisiológica (Cervantes y Campos-García 2007).

VIII. CONCLUSIÓN

Considerados de manera conjunta, los resultados de este trabajo establecen que la captación y transporte de Cr(VI) en maíz, está influenciada por la concentración de este compuesto en el medio, el tiempo de exposición a este metal y a la presencia de nutrientes, particularmente el fosfato y el sulfato. Además, el Cr en altas concentraciones disminuye la acumulación de Fe en las plantas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, AJ, DR Meyer, FK Mayer** (1972). Heavy metal toxicities: levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plants associated with visual symptoms and variation in growth of an oat crop. *Australian Journal of Agriculture Research*.24:557-71.
- Amtmann A, Blatt MR** (2008) Regulation of macronutrient transport. *New Phytol*,35-52
- Aportela P, González Y** (2001). Evaluación toxicológica del dicromato de potasio en plantas de lechuga, *lactuca sativa*, L. Centro de toxicología y biomedicina. 1-2
- Barceló J, Porchenrieder CH, Ruano A, Gunse B** (1985). Leaf water potential in Cr(VI) treated bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Physiol*, 163-174
- Barceló J, Poschenrieder CH, Gunse B** (1986). Water relations of chromium VI, treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress conditions. *J Exp Bot*, 178-187.
- Blatt MR** (2000). Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 221-241
- Breckle SW** (1991). Growth under stress: heavy metals in: Plant root: The hidden half. (Eds.)Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi), Marcel Dekker, NY, USA. pp. 351-373.
- Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutierrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R** (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants, *FEMS microbiology reviews*, 336-338, 342
- Cervantes C, Campos-García J** (2007). Reduction and efflux of chromate in bacteria. In: Nies DH, Silver S (Eds.) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin.
- Crawford NM, Forde BG** (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In CR Somerville, EM Meyerowitz, (Eds.) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, tab.0011, www.aspb.org/publications/arabidopsis/

- Davidian JC, Kopriva S** (2010). Regulation of sulfate uptake and assimilation—the same or not the same? *Mol Plant*, 314-325
- Demostrables J, Scanlon MJ** (2009). Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harb. *db.em*132.
- Dubey S, Misra P, Dwivedi S, Chatterjee S, Bag SK, Mantri S, Asif MH, Rai A, Kumar S, Shri M, Tripathi P, Tripathi RD, Trivedi PK, Chakrabarty D, Tuli R** (2010). Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress. *BMC genomics* (11), 1-18
- Gardea-Torresdey JL, De la Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Cruz-Jiménez G, Cano-Aguilera I** (2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 225-232
- González - Pineda B, Velásquez - Manzanares M, Amador - Hernández J, Ramírez - Fuentes E, Trujillo-Tapia MN** (2006). Efecto de la aplicación del cromo en el crecimiento y producción de maíz (*Zea mays*). Universidad del mar, Puerto Ángel, Oaxaca, 1-3.
- Hamilton Raven P, Evert FR, Eichhorn SE** (1992). *Biología de las plantas*. Reverté (Ed.) 4ta edición 473 pp. Barcelona.
- Hayat S, Khalique G, Irfan M, Arif Shafi Wani, Tripathi BN, Ahmad A** (2011). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. Springer - Verlag, 2-13.
- Hernández-Madrigal F** (2010). Efectos del cromo (VI) sobre la expresión global de genes en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis profesional de Maestría en Ciencias. Morelia, Michoacán, México
- Hochholdinger F, Feix G** (1998). Early post-embryonic root for motion is affected in the maize mutant *lrt1*. *Plant J*. 16: 247-255.

- Hochholdinger F, Park WJ, Sauer M, Woll K (2004a).** From weeds to crops: Genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.* 9: 42-48.
- Hochholdinger F, Zimmermann R. (2008).** Conserved and diverse mechanisms in root development. *Pubmed.com.* 11:70-4
- Huffman EW, Allaway WH (1973).** Chromium in plants: distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J AgricFood Chem* 21: 982-986
- Jalopez (2005).** Anejo V, Generalidades del cultivo de maíz. 68-81.
- Kaszycki P, Gabry H, Appenroth KJ, Jaglarz A, Sedziwy S, Walczak T, KoloczekH (2005).** Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Cell Environ* 28:260-268
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011).** A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot*, 1455-1466
- Leustek T, Saito K (1999).** Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol*; 637-643
- Liedgens M, Soldati A, Stamp P, Richner W (2000).** Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop Sci* 40: 1665-1672.
- Lytle CM, Lytle FW, Yang N, Qian J-H, Hansen D, Zayed, Terry N (1998).** Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *EnvironSciTechnol*, 3087-3093.
- Monasterio P, Velásquez L, Alejos G, Lugo L, Maturat W, Tablante J, Rodríguez L, D Araujo (2007).** Propuesta para la evaluación fenológica del cultivo de maíz en Venezuela. *Ciencia y producción vegetal.* INIA Divulga 59-63.

- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW** (2002). Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphatetransporters in Arabidopsis. *Plant J*, 341-353.
- Nardmann J, Werr W** (2009). Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. P. 105-119. En: *Hand book of maize: It's biology*, (Eds.) J.L Ben net zen y S.C Hake. Springer, New York.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J** (2007). Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *PlantScience*, 684-691.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Carreón-Abud Y** (2009). Restauración del crecimiento radical por nutrimentos inorgánicos en *Arabidopsis thaliana* L. expuesta a cromo. *Terra Latinoamericana* 27 (2): 97-103.
- Pandey N, Sharma CP** (2003). Chromium interference in iron nutrition and waterrelations of cabbage. *EnvironExpBot* 49: 195-200
- Peralta JR, GardeaTorresdey JL, Tiemann KJ, Gomez E, Arteaga S, RasconE, et al.** (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) L. *B Environ ContaToxicol* 66(6):727- 34.
- Rout GR, Samantaray S, Das P** (1997). Differential chromium tolerance among eight mungbean cultivars grown in nutrient culture. *Journal of PlantNutrition*. 20:473-83.
- RizzottoM, Sala LF** (1992). Significación Biológica de los Diferentes Estados de Oxidación del Cromo. *Universidad Nacional de Rosario Suipacha* 531. 1-3.
- Sauve S, Henderson W, Allen HE.** (2000). Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ SciTechnol* 34: 1125-1131.
- Sadava D, Gordon H, Orians H, Heller C, Hillis DM, Purves WK** (2006). *Life the science of Biology*. Freeman W. H. (Ed.) 8th Edition. New York.
- Salinas J, Sanz J** (1981). Síntomas de Deficiencia de Micronutrimentos y de Toxicidades Minerales en pastos tropicales. *Maria Lucia C. de Posada* (Ed.) 27: 18-19.

- Singh V, Van Oosterom EJ, Jordan DR, Messina CD, Cooper M, Hammer GL** (2010). Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil* 1-2: 287-299.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ Int*, 739-753
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Sudhagar R, Chandrashekar CN, Pathmanabhan G** (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vignaradiata*(L.)R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Sci*, 1035-1043.
- Shewry PR, Peterson PJ** (1974). The uptake and transport of chromium by barleyseedlings (*Hordeumvulgare*L.). *J Exp Bot*, 785-797
- Shupack SI** (1991). The Chemistry of Chromium and Some Resulting Analytical Problems. *Environmental Health Perspectives* (Vol. 92), 1-5.
- Skeffington RA, Shewry PR, Petersen PJ** (1976). Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeumvulgare*. *Planta* 132: 209-214.
- Spain A** (2003). Implications Of Microbial Heavy Metals Tolerance in the Environment. (Reviews In Undergraduate Research) 2:1-6.
- Taiz L, Zeiger E** (2006). *Plant physiology* 6ta Ed. Sinauer Associates Inc. Usa.
- Terry N** (1981). An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to phytotoxic trace elements. II. Chromium. Final report to the Kearney Foundation of Soil Science. July 1975-June 1980
- Torres Rios SJ, Hernández Madrigal F, Solis Guzman G, Martinez Trujillo M** (2011). Análisis bioinformático de genes de función desconocida que modifican su expresión es concentraciones estimuladoras e inhibitorias de Cr(VI). PP. 1-20.
- Turner MA, Rust RH** (1971). Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *SoilSciSoc Am Proc*, 755-8

- Urbano P** (1992). Tratado de fitotecnia general. 2da Edición. Mundi-Prensa libros. (853) pp. México.
- Viander S., Vicente A. F., Vicente J., Vicente O** (1999). Egondi Artes Graficas (Ed.) XIII Reunión Española de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (442). 21
- Wild Alan** (1988). Longman Group UK Limited (Ed.) Las condiciones del suelo y el desarrollo de las plantas según Russell. (1047), 94-98
- Zayed AM, Terry N** (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. Plant and Soil, 139-156
- Zayed AM, Lytle CM, Qian JH, Terry N** (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. Planta, 293-299
- Zou J, Wang M, Jiang W, Liu D** (2006). Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L. Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica 48(1): 7-12
- Zhang Q, Davis LC, Erick LE** (2000). Heavy Metal. In: Hazardous Substance Res. 2 (4):1.