

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y
MEDICINA**

**PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EFFECTO DE LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE DE CALCIO,
HIERRO Y ZINC EN LA CAPTACIÓN DE CADMIO Y PLOMO EN
PLANTAS FITORREMEDIADORAS**

PRESENTA:

M. en C. MAYRA CECILIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE

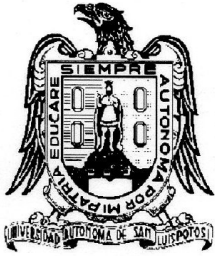
CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. IMELDA BONIFAS ARREDONDO

ASESOR:

DR. JOSÉ LUIS FLORES FLORES

San Luis Potosí, S. L. P., Abril de 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y
MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN
CIENCIAS AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EFFECTO DE LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE DE CALCIO,
HIERRO Y ZINC EN LA CAPTACIÓN DE CADMIO Y PLOMO EN
PLANTAS FITORREMEDIADORAS**

PRESENTA:

M. en C. MAYRA CECILIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre

CO- DIRECTOR: Dra. Imelda Bonifas Arredondo

ASESOR: Dr. José Luis Flores Flores

SINODALES:

PRESIDENTE: Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre

SECRETARIO: Dra. Imelda Bonifas Arredondo

VOCAL: Dr. José Luis Flores Flores

VOCAL: Dr. Juan Antonio Reyes Agüero

VOCAL: Dra. Ma. Guadalupe de la Rosa Álvarez

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

CON FINANCIAMIENTO DE:

Proyecto CONACYT No. J-2007-84962

Proyecto CONACYT No. 90228

Proyecto PROMEP Red Ciencia y Tecnología Ambiental

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

Efecto del pH y la selectividad del metal en la capacidad de sorción de Pb y Cd por medio de plantas de junco (*Typha latifolia*)

Movilidad y retención de metales pesados en residuos minerales y humedales

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-
TESIS**

Becario No. 201755

*Esta tesis está dedicada a mi hijo Neithan, mi maestro de vida.
Para Adrián, por estar siempre a mi lado y por todo su apoyo, con amor.*

Agradezco infinitamente a la *Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre*, por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo, por sus enseñanzas, su guía, su paciencia y ejemplo.

Dra. Imelda Bonifas, gracias por permitirme fortalecer el desarrollo de esta investigación en su grupo de trabajo; gracias por su consejos, sus recomendaciones y su amistad.

Dr. José Luis Flores, agradezco su apoyo, sus atinados consejos y observaciones.

Gracias al *Dr. Juan Antonio Reyes Agüero* y a la *Dra. Ma. Guadalupe de la Rosa Álvarez* por sus consejos desde el inicio de este trabajo, que sin duda, fueron esenciales para el desarrollo de la investigación. Gracias por aceptar formar parte de este proceso de graduación.

Agradezco al *Dr. Gerardo Argüello Astorga* por permitirnos usar las instalaciones de su laboratorio para la realización de las pruebas de biología molecular, además, agradezco sus observaciones en el desarrollo de la parte experimental.

Dr. Ramón Fernando García de la Cruz, agradezco su siempre apoyo y asesoría.

Agradecemos al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP; Huichihuayán, SLP, México), especialmente al *Ing. Rolando Ávila Ayala* por proveernos de las plantas de Vetiver.

Dr. Bernardo Bañuelos Hernández, gracias por su asesoría, paciencia y apoyo.

Dr. Omar Patiño Rodríguez, por haber subido a la base de datos del NCBI las secuencias del gen *TPC1* de Vetiver y Espadaña.

Agradezco a la *M. en I. Gladis J. Labrada Delgado*, del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) del IPICYT, por asistirme en las sesiones de microscopía electrónica de barrido.

Gracias a toda la gente bonita que conocí y que me acompañó durante este proceso, de cada uno me llevo una gran enseñanza; gracias *René* pues de ti entendí el significado de compañerismo, gracias *Vicky, Adriana, Jacob, Lula, Litza, Mayra, Benita, Rosy, Aida, Sra. Rosy* gracias por su amistad.

A pesar de la gran distancia, a mis amigas inseparables *March* y *Gaby*, con quienes compartí esta experiencia del doctorado y muchas otras. De la misma manera gracias a mis amigas *Dra. Denisse* y *Dra. Lluvia* quienes siempre me han guiado en la experiencia de la investigación.

Agradezco a la vida por permitirme hacer lo que más me gusta

ÍNDICE

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	i
<u>LISTA DE TABLAS</u>	iv
<u>RESUMEN</u>	v
CAPÍTULO 1: Síntesis	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Contaminación por metales pesados.....	3
2.2 Procesos de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados.....	5
2.3 Aplicación de la fitorremediación en la remoción de metales pesados.....	7
2.3.1 Mecanismos de interacción metal-planta.....	7
2.3.2 Mecanismos de transporte de membrana.....	9
2.3.2.1 Mecanismo de captación de elementos esenciales (Ca, Fe, Zn) a través de la membrana.....	10
2.3.2.2 Mecanismos de captación de Pb y Cd.....	14
2.3.3 Homeostasis celular.....	16
2.3.4 Plantas Fitorremediadoras.....	17
2.3.4.1 <i>Typha latifolia</i> (Espadaña o Tule) y <i>Vetiveria zizanioides</i> (Vetiver).....	18
3. RELEVANCIA DEL PROYECTO.....	20
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo General.....	22
4.2 Objetivos particulares.....	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1 Colecta y propagación de las especies vegetales.....	23
5.2 Influencia de Ca, Fe y Zn en la remoción y acumulación de Cd y Pb en Vetiver y Espadaña.....	24
5.3 Efecto de Ca, Cd y Pb en la expresión de <i>TPC1</i> en Vetiver y Espadaña.....	26
5.3.1 Clonación y secuenciación.....	26
5.3.2 Análisis de la expresión del gen <i>TPC1</i>	27
5.4 Aislamiento de protoplastos.....	28
5.5 Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Elección de las especies vegetales de estudio.....	29

6.2 Influencia del estatus nutricional de Ca, Fe y Zn en la cinética de remoción y en la acumulación de Cd y Pb.....	30
6.2.1 Remoción de Cd y Pb por plantas de <i>Vetiveria zizanioides</i>	30
6.2.2 Determinación de la composición de las soluciones nutritivas.....	32
6.2.3 Influencia de Ca, Fe y Zn en la remoción de Cd y Pb por las plantas.....	34
6.2.3.1 Vetiver.....	34
6.2.3.2 Espadaña.....	37
6.3 Efecto de Ca, Cd y Pb en la expresión del gen que codifica para el canal de calcio dependiente de voltaje <i>TPC1</i> en plantas de Vetiver y de Espadaña.....	40
6.3.1 Clonación y secuenciación.....	40
6.3.2 Análisis de la expresión de <i>TPC1</i>	41
6.4 Aislamiento de protoplastos de raíces de Espadaña y Vetiver como base para estudios electrofisiológicos.....	43
7. CONCLUSIONES.....	45
8. TRABAJO FUTURO.....	47
REFERENCIAS	48
CAPÍTULO 2: Influencia de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb por <i>Vetiveria zizanioides</i>	56
Resumen.....	57
Abstract.....	58
1. INTRODUCTION.....	59
2. MATERIALS AND METHODS.....	61
2.1 Plant Material.....	61
2.2 Experimental Design.....	61
2.3 Removal and Distribution of Metals in the Plants.....	63
2.4 Statistical Analysis.....	63
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	64
3.1 Capacity of Removal and Accumulation of Cd and Pb by Vetiver.....	64
3.2 Influence of Ca, Fe and Zn on Pb and Cd Removal and Accumulation by Vetiver Plants.....	66
4. CONCLUSIONS.....	69
REFERENCES.....	70
CAPÍTULO 3: <i>VzTPC1</i> es sobreexpresado en las raíces de Vetiver bajo estrés por Cd y Pb	80
Resumen.....	81
Abstract.....	82

1. INTRODUCTION.....	83
2. MATERIALS AND METHODS.....	84
2.1 Plant material.....	84
2.2 Design of degenerate primers.....	84
2.3 PCR amplification of Vz <i>TPC1</i> by Nested-PCR.....	85
2.4 Sequencing of PCR product from vetiver.....	85
2.5 Design of specific primers.....	86
2.6 Effect of Ca, Cd and Pb on vetiver <i>TPC1</i> gene expression.....	86
2.7 Statistical Analysis.....	87
3. RESULTS.....	87
3.1 Cloning and sequencing <i>TPC1</i>	87
3.2 Effect of Ca, Cd and Pb on vetiver <i>TPC1</i> gene expression.....	87
4. DISCUSSION.....	88
REFERENCES.....	92
CAPÍTULO 4: Incremento en la acumulación de Cd y Pb por deficiencia de Ca y Fe en <i>Typha latifolia</i>: Un estudio de las respuestas del gen <i>TPC1</i>.....	103
Resumen.....	104
Abstract.....	105
1. INTRODUCTION.....	106
2. MATERIALS AND METHODS.....	108
2.1 Plant material.....	108
2.2 Influence of Ca, Fe and Zn on Cd and Pb uptake by <i>T. latifolia</i> plants.....	109
2.3 Distribution of Metals in the Plants.....	110
2.4 PCR amplification and sequencing of <i>TITPC1</i>	111
2.5 Design of specific primers.....	111
2.6 Expression analysis.....	112
2.7 Statistical Analysis.....	112
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	113
3.1 Influence of Ca, Fe and Zn on Cd and Pb uptake by <i>T. latifolia</i> plants.....	113
3.2 Cloning and sequencing <i>TPC1</i>	117
3.3 Effect of Ca, Cd and Pb on <i>TPC1</i> gene expression in <i>T. latifolia</i>	118
4. CONCLUSIONS.....	119
REFERENCES.....	121
CAPÍTULO 5: Aislamiento de Protoplastos de Raíces de Espadaña y Vetiver.....	135
1. INTRODUCCIÓN.....	135
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	136

2.1 Material vegetal.....	136
2.2 Aislamiento de protoplastos.....	137
2.3 Lavado.....	137
2.4 Purificación y conteo.....	137
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	138
4. CONCLUSIONES.....	140
Referencias.....	141
ANEXO A: Establecimiento de las condiciones experimentales: Biodisponibilidad de Fe y Pb.....	147
Introducción.....	147
Metodología.....	147
Resultados y discusión.....	148
Referencias.....	149
ANEXO B: Efecto de las soluciones nutritivas en Vetiver y Espadaña.....	153
Metodología.....	153
Resultados.....	153
Referencias.....	153
ANEXO C: Contenido de Ca, Fe y Zn en las soluciones de experimentación.....	155
Descripción.....	155
Ca en Vetiver.....	155
Fe en Vetiver.....	155
Zn en Vetiver.....	156
Ca y Zn en Espadaña.....	156
Referencias.....	157

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Síntesis

- Figura 1.** Modelo del movimiento de solutos a través de las membranas vegetales (Adaptado de Ridge 2002 y Taiz y Zeiger 2010)..... 11
- Figura 2.** Modelo de la estrategia I y II en plantas mayores para la solubilización y captación de hierro (Autor: Adaptación de Römheld y Marschner 1986, por Hell y Stephan 2003)..... 13
- Figura 3.** Principales mecanismos celulares que intervienen en la desintoxicación de metales y en los mecanismos de tolerancia en plantas mayores. 1. Restricción del movimiento del metal a las raíces por micorrizas. 2. Unión a la pared celular y exudados de la raíz. 3. Influjos reducidos a través de la membrana plasmática. 4. Eflujo activo hacia el apoplasto. 5. Quelación en el citosol por varios ligandos. 6. Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés. 7. Transporte de complejos PQ-Cd a la vacuola. 8. Transporte y acumulación de metales en la vacuola (Autor: Hall 2002)..... 17
- Figura 4.** Plantas de Espadaña (A) y Vetiver (B) desarrolladas en el invernadero y vivero de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP..... 29
- Figura 5.** Aspectos de las plantas de *Pistia stratiotes* en el sitio de colecta (humedal Ciénega de Tamasopo) y en el invernadero (Facultad de Ciencias Químicas, UALP) durante las pruebas de propagación..... 30
- Figura 6.** Microfotografías y espectros EDX de la parte interna de las raíces de Vetiver expuestas a Pb (A, C) y Cd (B, D) obtenidas con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM Quanta 200)..... 33

CAPÍTULO 2: Influencia de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb por *Vetiveria zizanioides*

- Figure 1.** Removal of Cd (A) and Pb (B) by *V. zizanioides* exposed during ten days to single solutions of those metals. The data correspond to the mean \pm SD of experiments done in triplicate..... 76
- Figure 2.** Distribution of Cd (A) and Pb (B) between the solution and the plant tissues of *V. zizanioides*. Plants were exposed during ten days to the indicated concentrations in single treatments with Cd and Pb. The results are presented as the mean \pm SD of experiments done in triplicate..... 77
- Figure 3.** Influence of Ca, Fe and Zn concentrations on the distribution of Pb (A, C, E) and Cd (B, D, F) by *V. zizanioides*. Plants were exposed during 10 days to a nutrient solution containing 10 μ M Pb or 10 μ M Cd. After ten days of exposure time, plant tissues were dried and digested for further analysis of metals (AAS-F). The results are presented as the mean \pm SD of experiments done in triplicate. Asterisks indicate a significant difference respect to controls (0 M of Ca, Fe or Zn) according to the Tukey test ($p < 0.05$)..... 78

Figure 4. Variation of Ca content in growth solutions during the experimental period. Calcium concentration in Pb (A) and Cd (B) solutions. Movement of Ca under Pb (C) and Cd (D) exposure..... 79

CAPÍTULO 3: VzTPC1 es sobreexpresado en las raíces de Vetiver bajo estrés por Cd y Pb

Figure 1. Multiple amino acid alignments of the predicted TPC1 sequence from vetiver with its orthologous proteins. The alignment was obtained with ClustalX. * Protein sequence of hypothetical TPC1 of *Sorghum bicolor* (XM_002458269.1), ** protein sequence of TPC1 of *Zea mays* (EU954499.1), *** hypothetical fragment of TPC1 protein of *V zizanioides*..... 99

Figure 2. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *VzTPC1* expression. Differential expression of *TPC1* in vetiver roots and leaves. Single plants were exposed to nutrient solutions without (-) and with (+) Ca²⁺. First-Strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from roots followed by PCR. Data were normalized to *ACTIN1*. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. **(A)** *VzTPC1* expression in leaves, **(B)** *VzTPC1* expression in roots..... 100

Figure 3. Expression of *TPC1* in vetiver roots exposed to Cd²⁺ or Pb²⁺. Single plants were exposed separately to 10 µM of Cd²⁺ and Pb²⁺. First-Strand cDNA was synthesized from total RNA extracted from roots and amplified by RT-PCR. Data were normalized to *ACTIN1*. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis..... 101

Figure 4. Effects of Ca (A), Cd (B) and Pb (C) concentration on *VzTPC1* expression in vetiver roots after 4 h exposure to each treatment. Data were normalized to *ACTIN1*. Error bars represent the mean value ± SD (n=3). Asterisks indicate a significant difference with respect to control according to the ANOVA test (p < 0.05) . 102

CAPÍTULO 4: El papel del estatus de Ca, Fe y Zn en la estimulación de la captación de Cd y Pb en *Typha latifolia*: Un estudio de las respuestas del gen *TITPC1*

Figure 1. Removal of Pb (A,C,E) and Cd (B, D, F) by *T. latifolia* exposed to nutrient solutions containing different concentrations of Ca, Fe or Zn. The data correspond to the mean ± SD of experiments done in triplicate..... 130

Figure 2. Iron concentration in the experimental solutions during the exposure of *T. latifolia* to Pb (A, C, E) or Cd (B, D, F) in nutrient solutions with varying concentration of Fe (A, B), Ca (C, D) or Zn (E, F)..... 131

Figure 3. Distribution of Pb (A,C,E) and Cd (B,D,F) into the adsorbed and accumulated fractions (root and shoot, respectively) of *T. latifolia* as a function of the Fe, Ca and Zn concentrations supplemented in the nutrient solutions. The results are presented as the mean ± SD from triplicate experiments. The asterisks indicate a significant difference respect to controls (0 µM of Ca, Fe or Zn) according to the

Tukey test ($p < 0.05$).....	132
Figure 4. Expression of <i>TPC1</i> in cattail roots (A) and leaves (B) exposed to solutions with or without calcium. First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from the roots and amplified by RT-PCR. The data were normalized to <i>ACTIN1</i> . The errors bars represent the mean values \pm SD ($n=3$). The statistical analysis of the data was performed using Tukey's test ($p < 0.05$).....	133
Figure 5. Effects of Ca (A), Cd (B) and Pb (C) concentration on <i>TITPC1</i> expression in <i>T. latifolia</i> roots after 4 h exposure to each treatment. First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from the roots and amplified by RT-PCR. The data were normalized to <i>ACTIN1</i>	134
CAPÍTULO 5: Aislamiento de Protoplastos de Raíces de Espadaña y Vetiver	
Figura 1. Protoplastos aislados de <i>T. latifolia</i> . A) 6 h de incubación sin purificar, B) 8 h de incubación sin purificar, C y D) 16 h de incubación sin purificar, E y F) 16 h de incubación semipurificadas.....	145
Figura 2. Protoplastos aislados de <i>V. zizanioides</i> . A, B y C) 16 h de incubación sin purificar, D, E y F) 38 h de incubación sin purificar.....	146
ANEXO A: Establecimiento de las condiciones experimentales:	
Biodisponibilidad de Fe y Pb	
Figura 1. Comparación de la concentración de plomo total soluble (A) y hierro total soluble (B) en las distintas soluciones experimentales obtenidas por modelamiento químico (MINEQL) y las concentraciones experimentales.....	151
Figura 2. Concentración de plomo y hierro en Espadaña (A, C) y Vetiver (B, D). Las plantas fueron expuestas durante 10 días a soluciones nutritivas de distinta composición, los tejidos de la planta se secaron y digirieron para el posterior análisis de los metales (EAA-F). Los resultados son presentados como promedio \pm DE de los experimentos realizados por triplicado.....	152
ANEXO C: Contenido de Ca, Fe y Zn en las soluciones de experimentación	
Figura 1. Contenido de calcio en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb y Cd (10 μ M) bajo diferentes condiciones de Ca, Fe y Zn.....	158
Figura 2. Contenido de hierro en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb y Cd (10 μ M) bajo diferentes condiciones de Ca, Fe y Zn.....	159
Figura 3. Contenido de zinc en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb y Cd (10 μ M) bajo diferentes condiciones de Ca, Fe y Zn.....	160
Figura 4. Contenido de calcio en las soluciones de experimentación de Espadaña conteniendo Pb y Cd (10 μ M) bajo diferentes condiciones de Ca, Fe y Zn.....	161
Figura 5. Contenido de zinc en las soluciones de experimentación de Espadaña conteniendo Pb (A, C, E) y Cd (B, D, F) a la concentración de 10 μ m bajo diferentes condiciones de Ca (A, B), Fe (C, D) y Zn (E, F).....	162

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1: Síntesis

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunas de las técnicas utilizadas en el tratamiento de aguas contaminadas con metales.....	6
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	8
Tabla 3. Cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental de plantas de <i>V. zizanioides</i> expuestas durante 10 días a diferentes tratamientos de Pb y Cd ($n = 3 \pm DS$).	35
Tabla 4. Cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental de plantas de <i>T. latifolia</i> expuestas durante 10 días a diferentes tratamientos de Pb y Cd ($n = 3 \pm DS$).	38

CAPÍTULO 2: Influencia de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb por *Vetiveria zizanioides*

Table 1. Growth index (GI), leaf elongation (LE) and chlorophyll a/b ratio (Chl a/b ratio) of <i>V. zizanioides</i> plants exposed for 10 days to different treatments of Pb and Cd. ($n = 3 \pm SD$)	74
---	----

CAPÍTULO 3: VzTPC1 es sobreexpresado en las raíces de Vetiver bajo estrés por Cd y Pb.....

Table 1. GenBank accession numbers of the sequences used to design degenerate primers..	95
Table 2. Composition of the treatments used.....	96
Table 3. Sequence identity of VzTPC1 cDNA with mono and dicots.....	97

CAPÍTULO 4: El papel del estatus de Ca, Fe y Zn en la estimulación de la captación de Cd y Pb en *Typha latifolia*: Un estudio de las respuestas del gen TITPC1

Table 1. Sequence homology of TITPC1 cDNA with mono and dicotyledonous plants.....	128
---	-----

CAPÍTULO 5: Aislamiento de Protoplastos de Raíces de Espadaña y Vetiver.

Tabla 1. Enzimas que se utilizan para el aislamiento de protoplastos.....	143
--	-----

ANEXO A: Establecimiento de las condiciones experimentales: Biodisponibilidad de Fe y Pb

Tabla 1. Composición de la soluciones experimentales.....	150
Tabla 2. Principales especies de Pb y Fe en las soluciones experimentales.....	150

ANEXO B: Efecto de las soluciones nutritivas en Vetiver y Espadaña

Tabla 1. Índice de crecimiento (IC), elongación de hojas (EH), clorofila total (Chl total) de plantas de <i>T. latifolia</i> y <i>V. zizanioides</i> desarrolladas durante 10 día en distintos tratamientos de Ca, Fe y Zn ($n = 3 \pm SD$).....	154
---	-----

RESUMEN

Los metales pesados incluyendo Cd y Pb son compuestos tóxicos, liberados en mayor medida al ambiente por las actividades humanas como la minería, producción de energía, actividades agrícolas, entre otras; originando grandes riesgos ecológicos. Las tecnologías convencionales de tratamiento de los sitios contaminados por metales pesados han demostrado ser efectivas para pequeñas áreas o pequeños volúmenes, sin embargo, poseen la principal desventaja de un alto costo y en algunos casos, no son bien aceptadas por el público en general. La fitorremediación es tecnología simple, ambientalmente amigable y consume menos energía que otras tecnologías basadas en principios fisicoquímicos. Varios son los procesos que gobiernan la tecnología de fitorremediación, como lo son la captación, complejación, secuestro y transporte de los metales. El entendimiento de estos procesos básicos es importante para la realización de mejoras en las metodologías basadas en fitorremediación.

En este proyecto se analizó la ruta de ingreso de Cd y Pb en *Vetiveria zizanioides* (Vetiver) y *Typha latifolia* (Espadaña) y su relación con los mecanismos de transporte de Cd, Fe y Zn. Para lo anterior, inicialmente se establecieron las condiciones ideales para llevar a cabo el desarrollo experimental. Respecto a las especies vegetales, con base en reportes previos para *T. latifolia* y en experimentos realizados en el presente trabajo para *V. zizanioides*, en donde se evaluaron los parámetros de índice de crecimiento, elongación de hojas y contenido de clorofila total y a/b de plantas de Vetiver expuestas en condiciones hidropónicas a Cd y Pb a las concentraciones de 2.5 - 15 mgL⁻¹; se estableció la concentración de 10 µM de Cd ó Pb como la ideal para estudiar los procesos de transporte de éstos metales, evitando los efectos tóxicos de los mismos sobre los tejidos vegetales. Por otra parte se realizó un modelamiento químico empleando el programa MINEQL ver 4.5 para asegurar la solubilidad de las especies químicas contenidas en la solución nutritiva, incluyendo elementos esenciales (principalmente Ca, Fe y Zn) y de los elementos no esenciales (Cd y Pb). Se determinó que una solución nutritiva libre de fosfatos permite la presencia de altos porcentajes de formas químicas biodisponibles para las plantas. Mediante mediciones de índice de crecimiento, elongación de hojas y contenido de clorofila, se comprobó que la composición de la soluciones nutritivas elegidas para la realización de este trabajo no afecta el crecimiento y desarrollo de ambas especies vegetales durante el periodo de tiempo comprendido en los experimentos, un

total de 20 días por experimento. Posteriormente, plantas de Espadaña y de Vetiver fueron crecidas durante 10 días en soluciones nutritivas conteniendo Ca 1 mM, Fe 8.31 μ M y Zn 1.3 μ M (aclimatación), luego se expusieron durante 10 días a soluciones nutritivas conteniendo concentraciones variadas de Ca (0, 0.33, 0.67, 1 mM), Fe (0, 2.77, 5.54, 8.31 μ M) o Zn (0, 0.43, 0.87, 1.3 μ M), adicionadas con Pb ó Cd 10 μ M (periodo experimental). Durante el periodo experimental se tomaron muestras de las soluciones; al día 10 las plantas se seccionaron en raíz y parte aérea y los tejidos fueron digeridos en un medio ácido. Se determinó Cd, Pb, Ca, Fe y Zn en las soluciones y Cd y Pb en las digestiones. Lo análisis se llevaron a cabo por Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) mediante el método de flama u horno de grafito. Los resultados mostraron una remoción rápida de los metales al primer día de exposición, alcanzando porcentajes de remoción de Pb y Cd en las soluciones nutritivas de Vetiver de 74 y 64%, respectivamente; y en las soluciones nutritivas de Espadaña de 85 y 49%, respectivamente.

La remoción de los metales durante el resto del periodo experimental fue gradual, alcanzando remociones al día 10 de exposición en los sistemas de Vetiver de 85-92% de Pb y de 68-87% de Cd; en los sistemas de Espadaña se observaron remociones al día 10 de 86-92% de Pb y de 69-96% de Cd, respectivamente.

De los tres elementos esenciales (Ca, Fe y Zn), Ca fue quien tuvo una mayor influencia en la remoción de Cd y Pb; se observó que la remoción de ambos metales fue inversamente proporcional a la concentración de Ca añadida. Éstos resultados fueron congruentes con la fracción de los metales cuantificados en los tejidos, donde se encontró que la cantidad de Pb y Cd acumulada aumentó al disminuir la concentración de Ca en el medio nutritivo de Espadaña y Vetiver. En el caso de Cd, el aumento en la fracción acumulada fue estadísticamente significativo en ambas especies vegetales. Además, se observaron elevadas correlaciones entre la acumulación de Cd y Pb y la concentración de Ca en el medio. En los tratamientos de Espadaña en donde se varió la concentración de Fe, se observó un comportamiento similar al determinado al variar las concentraciones de Ca, el contenido de plomo acumulado en los tratamientos sin Fe fue significativamente mayor que en las soluciones donde se añadió Fe; en este sentido, la oxidación de Fe(II) a Fe(III) pudo favorecer la formación de la placa de hierro en la superficie de las raíces de Espadaña y de esta forma modular la adsorción de Pb.

El análisis de Ca en las soluciones nutritivas de Vetiver reveló que la concentración de éste durante el experimento tuvo un comportamiento particular; al primer día de experimentación, la concentración de Ca se incrementó en las soluciones conteniendo Cd y Pb, sin embargo, durante el resto del periodo experimental la concentración de Ca se incrementó en el caso de las soluciones conteniendo Pb, mientras que en las soluciones conteniendo Cd la concentración de Ca disminuyó. Éstos resultados sugieren que existe un mecanismo de interacción de Cd/Pb y Ca en común al inicio del periodo experimental, posteriormente operan diferentes mecanismos de internalización para Pb y Cd en Vetiver. Debido a la elevada influencia de Ca en la remoción y acumulación de Cd y Pb en plantas de Vetiver y Espadaña, se procedió a investigar el papel de un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (TPC1) en la captación de Cd y Pb en ambas especies. Para lo anterior, inicialmente se clonó y secuenció el gen que codifica para este canal de los tejidos de Espadaña (*TITPC1*) y Vetiver (*VzTPC1*). Posteriormente se determinó el grado de expresión de este gen en respuesta a diferentes concentraciones de Ca, Cd ó Pb en la solución nutritiva. Los resultados mostraron que la expresión de *VzTPC1* fue dependiente de la exposición de la planta a concentraciones crecientes de Ca ($r=1.0$) o Cd ($r=0.9984$), y fue independiente de la exposición de la planta a Pb. Mientras que la expresión de *TITPC1* fue dependiente de la exposición de la planta a concentraciones crecientes de Ca ($r=0.8793$), Cd ($r=0.8628$) y Pb ($r=0.8446$).

Los protoplastos son un sistema ideal para la investigación de los procesos de transporte en membrana, en este trabajo se estableció el protocolo para la obtención de protoplastos de raíces de Espadaña y Vetiver como base para futuras pruebas electrofisiológicas.

CAPÍTULO 1

Síntesis

1. INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo industrial en los últimos 150 años se ha incrementado la liberación de metales pesados al ambiente, principalmente procedentes de fuentes antropogénicas (Pinto et al. 2004; Volesky 2003). De estos elementos, el cadmio (Cd) y el Plomo (Pb) se encuentran dentro de los más peligrosos para el ambiente debido a su toxicidad y riesgo (Malkowski et al. 2005; Volesky 2003). Los metales pesados pueden ser absorbidos por especies vegetales que crecen en sitios contaminados, y a su vez, las plantas pueden experimentar los efectos tóxicos de los metales pesados: estrés oxidativo, clorosis, inhibición de crecimiento, desórdenes de la fotosíntesis, deshidratación, irregularidades en la captación de nutrientes e inhibición de las actividades enzimáticas (Paradiso et al. 2008; Sharma and Dubey 2005). Algunas plantas han desarrollado un sistema complejo de mecanismos homeostáticos que regulan los procesos de captación, transporte, acumulación y desintoxicación (Arazi et al. 1999; Clemens 2001; Clemens et al. 1998). Esta función de las plantas ha sido aprovechada por el hombre para remover metales pesados así como otros compuestos inorgánicos y orgánicos de sitios contaminados, proceso conocido como *fitorremediación*.

En los últimos años, la fitorremediación ha recibido mucha atención por considerarse una alternativa de tratamiento de sitios contaminados relativamente sencilla y de bajo costo, que proporciona beneficios estéticos y puede ser usada como un proceso de remediación a largo plazo (Meagher 2000). El principal desafío de esta tecnología radica en la dificultad para establecer y mantener las especies vegetales en sitios altamente contaminados (Trapp y Karlson 2001). Debido a lo anterior, es de gran importancia la elección de especies vegetales que posean las características adecuadas para aplicarse en fitorremediación, como lo son: rápido crecimiento, alta producción de biomasa, raíces profundas, ser de fácil cosecha y deben tolerar y acumular metales pesados en sus partes cosechables (Clemens et al. 2002). Una gran variedad de especies vegetales han sido estudiadas en su capacidad de tolerar y acumular metales pesados como Pb y Cd; por ejemplo, plantas terrestres como arroz (*Oryza sativa*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), lechuga (*Lactuca sativa*), ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*), junco (*Scirpus*), mostaza (*Brassica juncea*) y acuáticas como salvinia (*Salvinia herzogii*), *Hydromistia stolonifera*, helecho de agua (*Azolla filiculoides*) y lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) (Farzadfar et

al. 2012; He et al. 2007; Maine et al. 2001; Meyers et al. 2009; Liao et al. 2007). Así también plantas hiperacumuladoras de Cd, por ejemplo, *Thlaspi caerulescens* y *Arabidopsis halleri*, e hiperacumuladoras de Pb, *Brassica pekinensis* (Xiong 1998; Zhao et al. 2002). La mayoría de las especies hiperacumuladoras poseen poca biomasa, son de lento crecimiento o incrementan el riesgo ambiental al ser comestibles algunas de ellas. En el presente trabajo se decidió por las especies de *Vetiveria zizanioides* y *Typha latifolia*; dos alternativas interesantes para su estudio en cuestiones de fitorremediación debido a que poseen la mayoría de las características requeridas para éste propósito, como se describe a continuación.

Vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, syn. *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Poaceae y fue usada inicialmente con propósitos de conservación de suelos y agua (Danh et al. 2009; Srivastava et al. 2008). El interés en este pasto ha incrementado en los últimos años debido a sus características morfológicas y fisiológicas, por ejemplo, poseer un sistema radical masivo y profundo y su tolerancia a una gran amplitud de condiciones climáticas y edáficas adversas, incluyendo la presencia de sustancias tóxicas (Truong 2000). Existen estudios que demuestran la capacidad de Vetiver de tolerar y acumular metales como Pb, Cu, Zn, Al, Mn, Cd, Cr, Ni, Hg y metaloides como As (Chen et al. 2004; Chiu et al. 2005; Srivastava et al. 2008).

La Espadaña (*Typha latifolia* L.) es un macrófito emergente, monocotiledónea perenne perteneciente a la familia Thyphaceae. Crece en pantanos, lagos y lagunas con una variedad de condiciones ambientales. Es una planta de rápido crecimiento, fácil propagación y cosecha (Boyd 1970). *T. latifolia* posee la habilidad de remover y acumular elementos, tales como Cr, Cd, Pb, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn y As (Bah et al. 2011; Leura-Vicencio et al. 2013; Lyubenova et al. 2012; Zazo et al. 2008).

Mediante el entendimiento de las estrategias que las plantas realizan para captar, translocar y compartimentalizar los metales pesados, sería posible inducir la remoción y acumulación de éstos elementos. Desde el punto de vista biotecnológico, esto es importante debido a que es posible mejorar los métodos de fitorremediación para descontaminar agua y suelo (ej. fitoextracción). Entre los procesos involucrados en fitorremediación, los sistemas de transporte de membrana juegan un papel importante debido a su participación en el proceso de captación y transporte a partes aéreas y en la regulación del almacenamiento de los metales pesados en paredes celulares y en organelos como las vacuolas (Cherian y Oliveira 2005; Hall et al. 2003).

Estudios realizados hasta la fecha sugieren que debido a su similitud química con elementos esenciales, los metales pesados no esenciales podrían ser captados por las plantas empleando los mecanismos de captación utilizados para la internalización de éstos nutrientes (Bughio et al. 2002; Cohen et al. 1998; Lombi et al. 2002). Algunos reportes soportan esta hipótesis. Se ha demostrado que la acumulación de Fe y otros metales como Cd, Mg y Zn puede ser incrementada bajo deficiencia de hierro (Clemens et al. 1998; Cohen et al. 1998; Lombi et al. 2002; Rodecap et al. 1994). Kim et al. (2002) sugieren que la captación de Cd y Pb por plantas de arroz (*Oriza sativa* L.) es regulado por transportadores o canales de Ca en la membrana celular de las raíces. La aplicación de Pb y Cd afectó la acumulación y distribución de Ca en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) y en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) (Małkowski et al. 2005; Varga et al. 1999). En el presente proyecto se analizó la ruta de ingreso de cationes divalentes de cadmio (Cd^{2+}) y plomo (Pb^{2+}) en *Vetiveria zizanioides* y *Typha latifolia* y su relación con los mecanismos de transporte de elementos esenciales como calcio (Ca^{2+}), hierro (Fe^{2+}) y zinc (Zn^{2+}). Además, se determinó la expresión del gen que codifica para el canal de calcio dependiente de voltaje *TPC1* en raíces de las plantas creciendo en presencia de Cd y Pb. Finalmente, se desarrolló el protocolo para la obtención de protoplastos de *T. latifolia* y *V. zizanioides* como base para futuras pruebas electrofisiológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados incluyen principalmente metales de transición, algunos metaloides, lantánidos y actínidos (Babula et al. 2008). Entre éstos metales, Fe, Mo y Mn son importantes como micronutrientes, mientras Zn, Ni, Cu, Co, V y Cr son elementos tóxicos de tipo elementos traza. Otros como Ag, As, Hg, Cd, Pb y Sb no tienen función como nutrientes y se ha mostrado que son capaces de causar toxicidad (Rascio y Navari-Izzo 2011).

Los metales Cu, Cd, Pb y Hg se derivan de un número creciente de diversas fuentes antropogénicas (efluentes industriales y desechos, escorrentía urbana, plantas de tratamiento de aguas residuales, escurrimientos de fungicidas derivados de la agricultura, depósitos de basura domésticos, minería y quema de combustibles fósiles) que han afectado progresivamente los ecosistemas, siendo de gran preocupación los aspectos de movilidad, transformación de especies o bioacumulación de metales (Arazi et al. 1999;

Babula et al. 2008). Volesky (2003) describe como prioritarios en términos de toxicidad e impacto ambiental a Hg, Pb y Cd.

En México, para el 2011 ya se tenían registrados 582 pasivos ambientales y en el periodo 2008-2011 se identificaron 514 sitios contaminados por emergencias ambientales; estos lugares contenían diversos contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica, entre ellos, metales pesados; sin embargo, se estima que el número de sitios es mayor debido a la existencia de sitios de depósito clandestinos (Semarnat, 2013). Dentro de los contaminantes que se consideran prioritarios en México debido a su alta toxicidad se encuentran: Hg, Pb, Cr y Cd (Volke-Sepúlveda y Velasco 2002).

La dispersión antropogénica de los metales en el ambiente parece ser rival y algunas veces excedida a las movilizaciones naturales. Los metales liberados al ambiente por actividades antropogénicas son por lo tanto un gran problema, generando elevados niveles de metales biodisponibles (Manahan 1994; Prasad 2004). El cadmio es un elemento no esencial y poco abundante en la corteza terrestre, a bajas concentraciones puede llegar a ser tóxico para todos los organismos vivos. Este metal presente en el ambiente se distribuye a los distintos compartimientos ambientales. De la atmósfera, el polvo se deposita sobre la tierra y es arrastrado por los ríos hacia el mar, en donde se encuentra la mayor reserva del metal. Durante el transporte a través de los diferentes compartimientos el metal puede permanecer por largos periodos de tiempo en otros lugares del ambiente, produciéndose un mayor riesgo en su absorción y aumentando los efectos adversos (Repetto 1995).

El plomo es uno de los principales contaminantes de los ecosistemas terrestres y acuáticos. A pesar de las medidas regulatorias adoptadas en muchos países para limitar la entrada de plomo al ambiente, éste sigue catalogado como uno de los contaminantes más peligrosos para el humano. Como muchas de las fuentes contaminantes de Pb son indispensables para la vida moderna, probablemente la contaminación del suelo con Pb no disminuya en un futuro lejano. Los suelos contaminados con Pb causan disminuciones en la productividad de cultivos por lo tanto son un serio problema para la agricultura (Repetto 1995; Sharma y Dubey 2005). La mitad de la materia particulada que contiene plomo cae sobre la tierra alrededor de 100 pies sobre las autopistas y después es dispersado en la atmósfera, de donde puede ser acarreado a una distancia considerable por movimientos del aire antes de ser eventualmente depositado, se acumula en las calles

y carreteras, transportándose por agua de lluvia llegando a contaminar agua y suelo (Sharma y Dubey 2005).

La toxicidad generada por los metales pesados en mamíferos generalmente involucra alteraciones en el sistema nervioso, hígado, riñones y en el sistema pulmonar. Las diferencias en la solubilidad, su capacidad para absorberse, transportarse y su reactividad química dan como resultado diferencias específicas en su toxicidad. La forma química de los metales en solución es dependiente del tipo de metal, el pH, la presencia de otros iones, entre otros factores (Kim et al. 2002). Los metales pesados en plantas se unen a grupos sulfhidrilo en proteínas estructurales y enzimas, produciéndose un plegamiento incorrecto, inhibición de la actividad enzimática y/o interferencia con la regulación enzimática redox (Hall 2002). Además, a concentraciones tóxicas, los metales pesados estimulan la formación de radicales libres y de especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés), resultando en estrés oxidativo (Hall 2002; Rodríguez-Serrano et al., 2008; Sharma y Dubey 2005). En la membrana celular el daño puede resultar por varios mecanismos, incluyendo la oxidación y cruzamiento de grupos tioles de las proteínas, inhibición de proteínas de membrana como las H⁺-ATPasas o cambios en la composición y fluidez de los lípidos de la membrana (Hall 2002).

2.2 Procesos de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados

La remoción de los metales pesados presentes en el agua es complicada, principalmente debido al elevado costo de los métodos de tratamiento convencionales. Por ejemplo, se estima que para la remediación ambiental 6-8 billones de dólares son gastados por año en los Estados Unidos y 25-50 billones son gastados por año en el mundo (Pilon-Smits 2005).

Los métodos más comúnmente empleados para remover los metales de soluciones acuosas son: precipitación química, oxidación o reducción química, tratamiento electroquímico, ósmosis inversa, intercambio de iones, adsorción, evaporación, biosorción (Manahan 1994; Volesky 2003). En la Tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de algunas de las técnicas para el tratamiento de aguas contaminadas con metales (Kurniawan et al., 2006; Manahan 1994; Volesky 2003).

No existe un tratamiento universal para la eliminación de los metales pesados en aguas, la selección del tratamiento depende de factores como la concentración inicial de metal, el

rendimiento global, la flexibilidad y fiabilidad del tratamiento, así como criterios económicos y ambientales (Kurniawan et al. 2006).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de algunas de las técnicas utilizadas en el tratamiento de aguas contaminadas con metales.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Precipitación química	Bajo costo de inversión Operación simple Fácil implementación	Proceso sensible y poco confiable Generación de fango Costo de tratamiento de los fangos
Electrodialisis	Ajustable a sistemas de pequeña o gran escala Pocos requisitos de mantenimiento y funcionamiento	Gasto de energía elevado Constante ensuciamiento de membranas No se puede usar para aguas con dureza superior a 1 ppm
Ósmosis inversa	Alta eficiencia Capaz de remover todo tipo de contaminante Fácil de operar y mantener	Caudales de tratamiento bajos Altamente costoso Mantenimiento frecuente
Intercambio de iones	Bajo gasto de energía Facilidad de automatización y adaptación a situaciones específicas	El crecimiento microbiano disminuye su eficiencia Frecuente cambio de resinas Alto costo
Adsorción	Bajo consumo energético Elevada selectividad Fácil de operar y mantener	Caudales de tratamiento bajos Alto costo Mantenimiento frecuente
Biológico	Eficiente Tolerante a cambios en la composición del residuo Flexibilidad de operación	No aplicable a altas concentraciones

2.3 Aplicación de la fitorremediación en la remoción de metales pesados

La fitorremediación es un tipo de tratamiento biológico en donde se emplea a los vegetales para remover, degradar o confinar contaminantes de suelos, sedimentos, agua subterránea, agua superficial y aún de la atmósfera (Cunningham y Berti 1993; Garcinuño et al. 2006).

La utilización de plantas para la remoción de contaminantes de aguas tiene varias ventajas sobre otras tecnologías, principalmente su bajo costo. Por ejemplo, la fitorremediación en los Estados Unidos comprende alrededor de \$100-150 millones por año, comparado con los 6-8 billones de dólares que son gastados por año empleando técnicas de tratamiento convencionales (Pilon-Smits 2005). Esta tecnología puede ser implementada en una amplia variedad de sitios y sobre innumerables contaminantes (Newman y Reynolds 2004). El proceso es estéticamente agradable, utiliza como fuente de energía la radiación solar, posee una aplicabilidad a largo plazo, requiere una manipulación mínima de materiales y puede ser usada en conjunción con otro método terminal (Meagher 2000). Dentro de las limitantes de esta tecnología se incluye la dificultad para establecer y mantener la vegetación en sitios de desecho. En la Tabla 2 se mencionan algunas ventajas y desventajas de la fitorremediación (Nuñez-Lopez et al. 2004; Trapp y Karlson 2001).

Dependiendo del sitio o del tipo de contaminante a tratar, se emplean diferentes posibilidades de fitorremediación (Salt et al., 1998): **a) Fitoextracción:** Se refiere al uso de plantas acumuladoras de contaminantes para remover metales o compuestos orgánicos del suelo o agua y concentrarlos en sus tejidos cosechables. **b) Fitodegradación:** Representa la extracción y biotransformación de contaminantes orgánicos a compuestos menos tóxicos e inocuos. **c) Rizofiltración:** Descontaminación de aguas contaminadas y aguas residuales por absorción o captación en raíces. **d) Fitoestabilización:** Reduce la movilidad de los contaminantes de su entorno. **e) Fitovolatilización:** Favorece la volatilización de los contaminantes ya extraídos del suelo o agua.

2.3.1 Mecanismos de interacción metal-planta

Para que las plantas logren captar los metales, éstos tienen que encontrarse en una forma biodisponible. La biodisponibilidad de los metales depende de varios factores, entre ellos las características químicas del metal, grado de carga, pH, capacidad de intercambio catiónico (CEC), potencial redox, contenido de materia orgánica, la naturaleza de la

superficie del suelo, el tamaño de las partículas y la presencia de otros compuestos inorgánicos (Prasad 2004; Sanità di Toppi et al. 2007). Así como factores de la planta como área de la superficie de las raíces, exudados de la raíz, micorrización y grado de transpiración (Sharma y Dubey 2005). La habilidad de los metales y metaloides para formar complejos con compuestos en suelo y agua juega un papel importante en el incremento de la biodisponibilidad y captación de éstos (Babula et al. 2008).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
Es una tecnología sustentable	Es un proceso relativamente lento (cuando se emplean árboles y arbustos)
Es eficiente para tratar diversos tipos de contaminantes <i>in situ</i>	Es dependiente de la fenología
Es aplicable a ambientes con concentraciones de contaminantes de bajas a moderadas	El crecimiento de la vegetación puede estar limitado por extremos de la toxicidad ambiental
Es de bajo costo, no requiere personal especializado para su manejo ni consumo de energía	Los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser liberados nuevamente al ambiente durante el otoño
Es poco perjudicial para el ambiente	Los contaminantes pueden acumularse en maderas para combustión
Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable	No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras
Evita la excavación y el tráfico pesado	La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes
Tiene una versatilidad potencial para tratar una gama diversa de materiales peligrosos	
Se pueden reciclar recursos (agua, biomasa, metales)	

Al tener contacto con las plantas, los metales son captados en el apoplasto de las raíces; posteriormente una fracción de la cantidad total de los metales es transportado a las células, mientras que otra fracción se une a la pared celular. La pared primaria celular consiste de una red de celulosa, hemicelulosa (incluyendo pectinas) y glucoproteínas. Una porción de pectinas consiste de ácidos poligalacturónicos y sus grupos carboxílicos cargados negativamente funcionan como intercambiadores de cationes. Parte del metal

que ha sido captado en el apoplasto es posteriormente transportado hacia la membrana plasmática (Babula et al. 2008; Prasad 2004). Algunos estudios realizados hasta la fecha sugieren que debido a su similitud química con elementos esenciales, los metales pesados no esenciales podrían ser internalizados por las plantas empleando los mecanismos de captación utilizados para la absorción de éstos nutrientes (Kim et al. 2002; Prasad y Strzalka 2002).

2.3.2 Mecanismos de transporte de membrana

El movimiento selectivo y la redistribución de iones son de gran importancia para el crecimiento de la planta y su homeostasis celular. Debido a esto, las plantas han desarrollado proteínas (proteínas de transporte) que facilitan el transporte de nutrientes a través de las membranas celulares y de los organelos. En general el término proteínas de transporte involucra tres principales categorías (canales, transportadores y bombas) (Buchanan et al. 2002; DalCorso et al. 2008).

Los canales son proteínas transmembranales que funcionan como poros selectivos en donde las moléculas o iones pueden difundir a través de las membranas. El tamaño del poro, la densidad y la naturaleza de las cargas de la superficie determinan su especificidad de transporte. El transporte a través de canales es siempre pasivo (a favor del potencial electroquímico) y es limitado principalmente a iones o agua; la dirección neta del flujo del ion o el soluto a través del canal es determinado únicamente por el gradiente electroquímico actuando sobre ese ion (Figura 1) (Buchanan et al. 2002; Taiz y Zeiger 2010). A diferencia de los canales, los transportadores no tienen poros, la sustancia a ser transportada es inicialmente unida a un sitio específico de la proteína transportadora. Este requerimiento permite que este sistema de transporte sea altamente selectivo para un sustrato en particular. Los transportadores se especializan en el transporte de iones específicos u moléculas orgánicas. La unión del sustrato con el transportador causa un cambio conformacional en la proteína, la cual expone la sustancia hacia el otro lado de la membrana. El transporte es completado cuando la sustancia se disocia del sitio de unión del transportador (Taiz y Zeiger 2010). Debido a que se requiere un cambio conformacional en la proteína para transportar una molécula o un ion, el grado de transporte de un transportador es en muchos órdenes de magnitud menor que el de un canal. Típicamente, los transportadores transportan 100-1000 iones o moléculas por

segundo, mientras que 10^8 iones pasan por un canal abierto en el mismo periodo de tiempo (Buchanan et al. 2002).

El transporte mediado por una proteína transportadora puede llevarse a cabo de forma pasiva o activa. El transporte por vía pasiva efectuado por un canal o un transportador es comúnmente llamado difusión facilitada. El transporte activo (en contra del potencial electroquímico) puede efectuarse por bombas y por transportadores (Figura 1). El transporte activo primario está acoplado a una fuente de energía como la hidrólisis de ATP o una reacción de oxidación-reducción; las proteínas que efectúan este tipo de transporte son las bombas (Ridge 2002). Muchas bombas transportan H^+ o Ca^{2+} ; sin embargo, bombas provenientes de la familia Casete de Unión de ATP (ABC; por sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette*) pueden transportar grandes moléculas orgánicas (Taiz y Zeiger 2010). Mediante el transporte activo primario los protones son extruidos del citosol por H^+ -ATPasas que operan en la membrana plasmática y en la membrana vacuolar. Consecuentemente un potencial de membrana y un gradiente de pH es creado a expensas de la hidrólisis de ATP. Este gradiente de potencial electroquímico para H^+ referido como PMF (por sus siglas en inglés, *proton motive force*), representa la energía almacenada en la forma del gradiente de H^+ (Ridge 2002).

Otra importante forma en la que los solutos son activamente transportados a través de la membrana es por acoplamiento del transporte de un soluto en contra de su potencial electroquímico con el transporte de otro que se encuentra a favor de su potencial electroquímico. Este tipo de co-transporte es denominado transporte activo secundario. En el transporte activo secundario se utiliza el PMF para efectuar el transporte de muchas otras sustancias en contra de sus gradientes de potencial electroquímico (Buchanan et al. 2002). Existen dos tipos de transporte activo secundario: simporte y antiporte. En el transporte simporte dos sustancias se mueven en la misma dirección a través de la membrana. El transporte antiporte se refiere al transporte acoplado de un soluto en la dirección opuesta (Figura 1) (Taiz y Zeiger 2010).

2.3.2.1 Mecanismo de captación de elementos esenciales (Ca, Fe, Zn) a través de la membrana

El potencial de membrana que podría exceder los -200 mV en células epidermales de la raíz, provee una fuerza motriz fuerte para la captación de cationes (Buchanan et al. 2002). A continuación se describe como ocurre la captación de los elementos esenciales.

Iones calcio. Se ha reportado que la captación de Ca^{2+} es regulada por tres diferentes sistemas: la Ca^{2+} -ATPasa, los canales de calcio y el sistema antiporte $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (membranas celulares y vacuolares) (Hirschi et al. 1996). La actividad de éste último sistema transportador de Ca^{2+} se ha demostrado ser predominante comparado con la actividad del sistema Ca^{2+} -ATPasa. Las enzimas Ca^{2+} -ATPasas pueden ser divididas en dos grupos: IIA y IIB. El grupo IIA son Ca^{2+} -ATPasas que pueden ser encontradas en el retículo endoplásmico mientras que en el grupo IIB, las Ca^{2+} -ATPasa es localizada en diferentes endomembranas; los genes de ambas ya se han identificado en plantas (Prasad y Strzalka 2002).

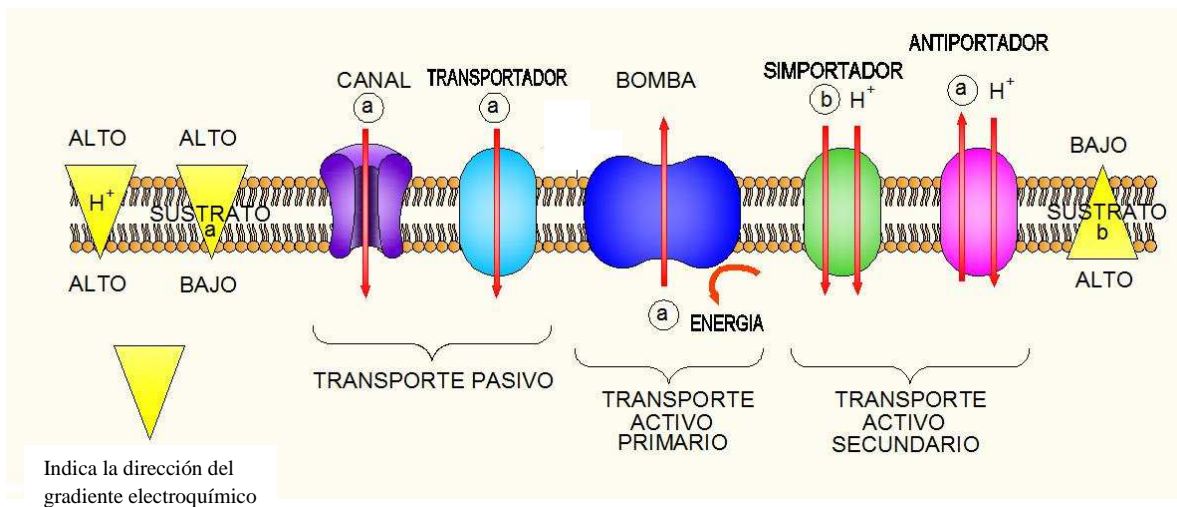


Figura 1. Modelo del movimiento de solutos a través de las membranas vegetales (Adaptado de Ridge 2002 y Taiz y Zeiger 2010).

Los canales de Ca^{2+} están involucrados principalmente en las señales de transducción. Su apertura resulta en un incremento de la concentración de calcio citoplasmático. La luz roja, gravedad, tacto, bajas temperaturas, inductores fúngicos, hormonas, o estrés salino generan la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (White 2000). El calcio es transportado de los organelos y del apoplasta hacia el citosol, de esta forma activa las rutas de señales de transducción. El calcio es activamente exportado por Ca^{2+} -ATPasas de alta afinidad y transportadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ hacia fuera de la célula o hacia los organelos (ej. Vacuola o retículo endoplásmico) para mantener la concentración citosólica de Ca^{2+} ($\leq 0.1 \mu\text{M}$). Esto previene la activación de la ruta de señalización en la

transducción hasta que se detecta otro estímulo (Fox y Guerinot 1998; White y Broadley 2003). Los canales permeables a calcio se han identificado en la membrana plasmática, tonoplasto, retículo endoplasmático, y membrana de cloroplastos y nuclear (White 2000). Aunque los canales permeables a calcio han sido investigados mediante técnicas electrofisiológicas, bioquímicas y moleculares, sólo un número limitado de genes que codifican a estos canales han sido aislados y funcionalmente estudiados. En trigo se encontró el gen *LCT1* que codifica para un transportador catiónico de baja afinidad y que podría complementar una mutante de levadura, con un defecto en el gen *MIDI*, que codifica para un canal catiónico no selectivo, permeable a calcio (Amtmann et al. 2001). Además, se han identificado candidatos de genes que codifican para canales de Ca^{2+} , TPCs (two-pore voltaje-gated channels) (Furuichi et al. 2001; Hashimoto et al. 2004; Kadota et al. 2004; Kurusu et al. 2004; Wang et al. 2005). Las proteínas TPCs son estructuralmente similares a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCCs) de células animales (Hashimoto et al. 2004). Además, se ha sugerido que Cd^{2+} y Pb^{2+} interactúan con los sitios de unión de las proteínas VDCCs (Marchetti 2013). Los resultados anteriores sugieren un posible papel de las proteínas TPC en el transporte de Cd y Pb.

iones hierro y zinc. La adquisición de hierro por las plantas es llevada a cabo por dos procesos clasificadas como estrategia I y estrategia II (Mori 1999). La estrategia I es llevada a cabo por todas las plantas mayores, excepto gramíneas las cuales emplean la estrategia II. Modelos de plantas para la investigación de la estrategia I incluyen dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* y *Pisum sativum*. Ellas optimizan la captación de hierro por tres reacciones: (i) la excreción de protones a través de una ATPasa tipo P en la membrana plasmática para acidificar la solución circundante y por lo tanto, incrementar la solubilidad de Fe^{3+} ; (ii) reducción de Fe^{3+} por una Fe^{3+} -quelato reductasa a su forma más soluble Fe^{2+} ; (iii) transporte a través de la membrana plasmática empleando los transportadores de Fe^{2+} . Los tres componentes de esta estrategia incrementan sus actividades durante la deficiencia de hierro. En la estrategia II, las plantas (gramíneas) liberan a través de la membrana plasmática de las raíces, fitosideróforos (FSs) quelando a su vez el Fe^{3+} en la rizósfera, proteínas de transporte específicas para los complejos Fe^{3+} -PS son las encargadas de internalizarlos hacia el citosol (Figura 2) (Römheld y Marschner 1986).

La captación de Fe^{2+} y Zn^{2+} es mediada por un grupo de transportadores pertenecientes a la familia ZIP (por sus siglas en inglés, Zinc-Iron Permease), proteínas análogas ZRT/IRT (Fox y Guerinot 1998), encontradas en un diverso rango de eucariotas. Los miembros de ZIP se han identificado en varias especies, así como en bacterias, hongos y animales. Además, los resultados indican que éstas proteínas se encuentran involucradas en el transporte de cationes divalentes a través de las membranas (DalCorso et al. 2008).

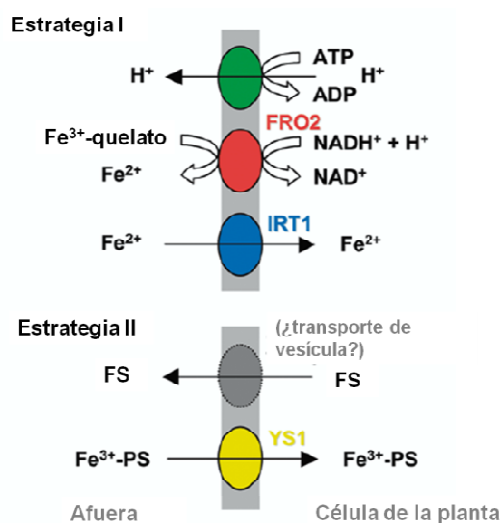


Figura 2. Modelo de la estrategia I y II en plantas mayores para la solubilización y captación de hierro (Autor: Adaptación de Römheld y Marschner 1986, por Hell y Stephan 2003).

La primera proteína aislada fue la IRT1 de *Arabidopsis* (Eide et al. 1996). Ésta proteína encontrada principalmente en dicotiledóneas, suprime los defectos de crecimiento de mutantes de *S. cerevisiae fet3 fet 4* deficientes en el transporte de hierro y bajo condiciones limitantes de éste metal. La transcripción de *IRT1* es inducida en las raíces de *Arabidopsis* por deficiencia de hierro. Estudios adicionales en levadura mostraron que IRT1 posee un amplio rango de sustratos y además aceleró la captación de Mn^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} (Korshunova et al. 1999). Briat y Lobréaux (1997) observaron que la proteína IRT1 en plantas es inhibida por los cationes divalentes: Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . Cohen et al. (1998) observaron que en plantas deficientes de hierro la captación de Cd^{2+} se incrementó notablemente de la misma forma que se detectó la salida de protones al medio. En condiciones normales de hierro así como bajo deficiencia de hierro se expresa el gen *Fet4* que codifica para una proteína de transporte de baja afinidad, éste sistema es más

específico para Fe^{2+} que para Fe^{3+} y es capaz de transportar otros cationes divalentes como Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} (Prasad y Strzalka 2002). En plantas transgénicas de tabaco que expresaron los genes reductores de Fe^{3+} en levadura (*Fre 1* y *Fre2*) bajo exposición a diversos metales, se incrementó la concentración de Fe^{2+} en hojas y además la concentración de Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} en los tejidos (Mok et al. 2000).

2.3.2.2 Mecanismos de captación de Pb y Cd

El transporte de Pb^{2+} a través de la membrana podría ocurrir a través del sistema Ca^{2+} -ATPasas, el sistema antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ o a través de los canales de calcio (Prasad y Strzalka 2002; Sharma y Dubey 2005). En la membrana plasmática de células de la raíz de plantas de trigo se caracterizó un canal de calcio dependiente de voltaje empleando vesículas de la membrana plasmática (right-side-out) (Huang et al. 1994). Posteriormente, Huang y Cunningham (1996), encontraron que Pb^{2+} inhibe significativamente la actividades de estos canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en raíces de trigo. La inhibición de los canales de calcio por plomo podría derivarse de la obstrucción del canal o debido al transporte competitivo a través del canal de calcio. Otros hallazgos indican que el transporte de Pb^{2+} es bloqueado por nifedipina (un bloqueador de los canales cálcicos) e incrementado por BAY K8644 (un agonista de los canales de calcio) (Sharma y Dubey 2005). Lo anterior podría estar relacionado con lo encontrado por Antosiewicz (2005) y Kim (2002) quienes en sus estudios con plantas de maíz, arroz, centeno, tomate y mostaza, determinaron que el efecto tóxico por Pb se incrementó conforme la concentración de calcio disminuyó en el medio; sugiriendo que Pb^{2+} podría ingresar a las células vía los transportadores de Ca^{2+} . Estos autores encontraron que la cantidades de Pb^{2+} y Cd^{2+} adsorbidas a la pared celular no fue considerable, por lo que es probable que los efectos de Ca^{2+} sobre la captación de Pb^{2+} y Cd^{2+} no se dé por competencia por los sitios de unión en la pared celular, sino por competencia por el transporte a nivel de la membrana plasmática. Además, se ha demostrado que el Pb interviene en la captación de los elementos esenciales Ca, Fe, Zn y Cu (Sharma y Dubey 2005).

Se ha documentado que bajo deficiencia de hierro se incrementa la captación de otros iones metálicos debido a la inducción de transportadores bajo éstas condiciones; tal fue el caso en plantas de chícharo (*Pisum sativum* L. cv Sparkle), que bajo deficiencia de hierro se incrementó la captación de Cd^{2+} , en donde se comprobó que la deficiencia de Fe^{2+} induce la expresión del transportador *IRT1* (Cohen et al. 1998). Se ha obtenido evidencia

para las actividades de transporte de Cd^{2+} por medio de IRT1, ZNT1 y de AtNramp3 (Clemens 2001). Clemens (1998) reportó que la proteína LCT1 de trigo le confiere a células de *S. cerevisiae* una mayor sensibilidad a Cd^{2+} . Además se observó que la expresión de *LCT1* incrementó la captación de Cd^{2+} y Ca^{2+} . Por otra parte, se ha demostrado que el Cd^{2+} inhibe el transporte de Fe^{2+} hacia partes aéreas en plantas de *Arabidopsis*, en las plantas deficientes de Fe^{2+} un 98-99% de Fe^{2+} captado permaneció en las raíces. La deficiencia de Fe^{2+} no sólo incrementó el grado de captación de Fe^{2+} sino que además incrementó la acumulación de Cd^{2+} y Mg^{2+} (Rodecap et al. 1994).

Miembros de la familia de genes ZIP son capaces de transportar metales de transición incluyendo Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} (Guerinot 2000; DalCorso et al. 2008). La proteína de transporte AtIRT1, localizada en la membrana plasmática de las células de la raíz, es el sistema de transporte primario de hierro en *Arabidopsis*, pero podría transportar cantidades significantes de Cd^{2+} (Korshunova et al. 1999). El transportador de metales pesados ZNT1 (por, Zn transporter), se clonó de *T. caerulescens* por complementación funcional en levadura, se demostró que participa en la captación de alta afinidad de Zn^{2+} así como en la captación de baja afinidad de Cd^{2+} . Se demostró que este transportador es expresado en niveles muy altos en las raíces y en la parte aérea de la planta hiperacumuladora (Pence et al. 2000). Por otra parte se ha asumido que el Cd^{2+} puede ingresar a la célula a través del sistema de transporte de Ca^{2+} . La disminución o el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} pueden alterar la distribución de Cd^{2+} en frijol. A baja concentración de Ca^{2+} más Cd^{2+} es translocado a partes aéreas, a altas concentraciones de Ca^{2+} más Cd^{2+} es encontrado en las raíces (Skórzynska-Polit et al. 1998). Estudios revelaron que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron AtNramp3 presentaron mayor acumulación de Cd^{2+} y por lo tanto mayor sensibilidad a este. La disrupción del gen ligeramente incrementó la tolerancia a Cd^{2+} (Thomine et al. 2000). Wei et al. (2009), observaron que la expresión de *TcNRAMP3* en las raíces de *Thlaspi caerulescens* fue inducida por la presencia de Cd^{2+} . La expresión de *TcNRAMP3* incrementó la sensibilidad y el contenido de Cd^{2+} en *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, la expresión de *TcNRAMP3* en plantas de tabaco no afectó de manera significativa el crecimiento de la raíz, lo que sugiere que la proteína *TcNRAMP3* presente en la planta hiperacumuladora *T. caerulescens* a diferencia de la expresada en *A. thaliana* (AtNramp3) no moviliza grandes cantidades de cadmio de la vacuola al citosol.

En fases tempranas de germinación de semillas de rábano, se observó que el Cd entró a las células a través de los canales de calcio en la membrana plasmática (Rivetta et al. 1997). De manera similar, se ha reportado que los canales de calcio son permeables a Cd en plantas de trigo (White 2000). Perfus-Barbeoch et al. (2002), observaron que al aplicar inhibidores de los canales cálcicos se inhibió el efecto fitotóxico de Cd en plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Vicia faba*; además, aplicando la técnica de Patch-Clamp en protoplastos de células guarda de *V. faba* se encontró que los canales de calcio fueron permeables a Cd^{2+} por lo que proponen que el Cd^{2+} es capaz de mimetizar al Ca^{2+} y entrar a las células guarda a través de los canales de Ca^{2+} ; resultados similares fueron obtenidos en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) (He et al. 2009).

2.3.3 Homeostasis celular

Para poder enfrentar las concentraciones tóxicas de los metales o mantener el nivel de los metales esenciales entre los rangos fisiológicos, las plantas han desarrollado mecanismos complejos que sirven para el control de la captación, acumulación y desintoxicación de metales (Hossain et al. 2012). La sensibilidad o tolerancia de las plantas a los metales pesados depende de estos mecanismos fisiológicos y moleculares que incluye la captación, transporte y acumulación de los metales a través de la unión con exudados extracelulares y la pared celular, complejación de los iones dentro de la célula por varias sustancias, las respuestas generales de defensa al estrés bioquímico, como la inducción de enzimas antioxidantes y la activación o modificación del metabolismo de la planta para permitir un adecuado funcionamiento de las rutas metabólicas y la adquisición de una rápida homeostasis después del daño celular (Hossain et al. 2012).

La tolerancia además podría involucrar la membrana plasmática, de manera que puede reducir la captación de los metales pesados o estimulando el eflujo de los metales que han ingresado al citosol. Dentro del protoplasto una variedad de mecanismos potenciales existen, por ejemplo, la formación de complejos de coordinación con proteínas (metalotioneínas), ácidos orgánicos (citrato, malato, oxalato), aminoácidos (cisteína) y péptidos cortos (glutación y fitoquelatinas); los queladores contribuyen a la desintoxicación del metal moderando las concentraciones citosólicas de los cationes metálicos. Finalmente los complejos sufren una compartimentalización en sitios celulares específicos, principalmente en la vacuola. Estos mecanismos se resumen en la Figura 3

(Arazi et al. 1999; Clemens 2001; DalCorso et al. 2008; Hall 2002; Sanità di Toppi y Gabbrielli 1999).

2.3.4 Plantas Fitorremediadoras

Las plantas acuáticas han sido empleadas frecuentemente en el tratamiento de aguas residuales para remover sólidos suspendidos, nutrientes, metales pesados, compuestos orgánicos tóxicos provenientes del drenaje ácido de minas, rellenos sanitarios agrícolas y escurrimientos de agua de lluvia en ciudades (Singh y Tripathi 2007). Las macrófitas son plantas disponibles universalmente y costo efectivas, su habilidad para sobrevivir condiciones adversas y grados de colonización hace que sean excelentes herramientas para estudios en fitorremediación. Las plantas terrestres, por otro lado, ofrecen la oportunidad de limpiar suelos contaminados con compuestos orgánicos o inorgánicos (por ejemplo, sitios mineros) por medio de la tecnología de fitorremediación.

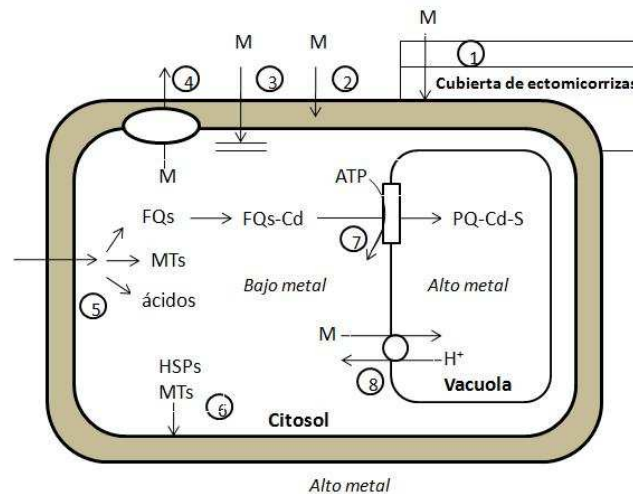


Figura 3. Principales mecanismos celulares que intervienen en la desintoxicación de metales y en los mecanismos de tolerancia en plantas mayores. **1.** Restricción del movimiento del metal a las raíces por micorrizas. **2.** Unión a la pared celular y exudados de la raíz. **3.** Inlujo reducido a través de la membrana plasmática. **4.** Eflujo activo hacia el apoplasto. **5.** Quelación en el citosol por varios ligandos. **6.** Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés. **7.** Transporte de complejos PQ-Cd a la vacuola. **8.** Transporte y acumulación de metales en la vacuola (Autor: Hall 2002).

Para la aplicación de la tecnología de fitorremediación es de suma importancia la elección de una especie vegetal con las características adecuadas para ser desarrollada con este propósito. Además, la eficiencia de remoción de contaminantes durante el proceso de fitorremediación dependerá principalmente de la especie de planta utilizada, el estado de

crecimiento de las plantas, su estacionalidad y el tipo de metal a remover. Por lo mismo, para lograr buenos resultados, las plantas a utilizar deben tener las siguientes características: tener una rápida tasa de crecimiento y alta productividad de biomasa, ser raíces profundas, ser de fácil cosecha y que posea los mecanismos bioquímicos y fisiológicos para tolerar y acumular contaminantes (Clemens 2002; Nuñez-Lopez et al. 2004). Con base en lo anterior hemos elegido a *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides* como modelos de estudio para evaluar el comportamiento de captación de metales.

2.3.4.1 *Typha latifolia* (Espadaña o Tule) y *Vetiveria zizanioides* (Vetiver)

Typha latifolia es una planta perenne, acuática emergente, crece en humedales de agua dulce y en la ribera de lagos y lagunas en una variedad de condiciones climáticas. Es una angiosperma de fácil propagación, posee alta capacidad de crecer en reservorios contaminados con desechos industriales y posee elevadas velocidades de crecimiento y reproducción, llegando a medir hasta 3.5 m de altura y con una biomasa de 2.9 kg m⁻¹. Espadaña acumula metales pesados en condiciones naturales o en ambientes contaminados (Amaya-Chávez et al. 2006; Calheiros et al. 2007; Crowe et al. 2001; McManus et al. 2002). Asimismo, *T. latifolia* se ha usado para el biomonitoreo de Ni, Cr, Co, Zn, Mn, Pb, Cd, Cu, Hg y Fe en un amplio rango de bioensayos de toxicidad (Singh y Tripathi 2007).

Vetiveria zizanioides es una planta que proviene de la familia Poaceae, es un pasto perenne con fuerte adaptabilidad ecológica, no invasiva, genera alta biomasa, fácil de propagar, es capaz de crecer en diferentes condiciones del suelo y posee la habilidad de crecer rápidamente después de ser afectado por las condiciones adversas del medio. Es una planta con un desarrollo rápido, llegando a medir hasta 2 m de altura. Es una planta que posee una eficiencia fotosintética de tipo C4, con un sistema radical vertical largo (3-4m), masivo, voluminoso, aerenquimatoso y complejo, el cual puede penetrar fácilmente las capas profundas del suelo y estabilizarlo (Roontanakiat et al. 2003; Srivastava et al. 2008). Su sistema radical específico le provee la tolerancia a un amplio rango de condiciones climáticas y edáficas, incluyendo contaminación por metales pesados. Vetiver es capaz de soportar condiciones ambientales extremas, crece en una amplitud de temperaturas de -15 a 55°C y es altamente tolerante a medios de crecimiento ácidos y alcalinos (pH 3.3-9.5) y salinos (ECse 47.5 dS m⁻¹) (Danh et al. 2009). Se ha comprobado que vetiver tiene la habilidad de soportar altas concentraciones de metales pesados y

extraerlos de suelo y agua. Tiene una especial afinidad a Pb, Cu y Zn y se ha comprobado que es capaz de tolerar metales como Al, Mn, Cd, Cr, Ni, Hg y metaloides como As, principalmente como As (V) en presencia de agentes quelantes (Chen et al. 2004; Chiu et al. 2005; Srivastava et al. 2008).

Como se indica anteriormente, Vetiver y Espadaña han sido estudiadas en su capacidad para remover y acumular metales esenciales y no esenciales, sin embargo, no existen estudios que describan los mecanismos bioquímicos y moleculares de captación y acumulación de los metales por éstas plantas.

3. RELEVANCIA DEL PROYECTO

A partir de los siglos XIX y XX se incrementaron las actividades de la minería y de la industria, de manera conjunta se elevó la contaminación por metales pesados causando serios problemas ambientales. Dentro de los metales pesados, Cd y Pb son considerados contaminantes prioritarios debido a su toxicidad y el impacto que generan al ambiente (ATSDR/EPA 2007; Volesky 2003). Se han empleado diferentes métodos para tratar el agua y suelos contaminados con metales pesados, sin embargo, las metodologías convencionalmente utilizadas presentan varias desventajas, entre ellas el alto costo. La fitorremediación es una tecnología de bajo costo, puede ser aplicada en una variedad de sitios y sobre un gran número de contaminantes, por lo que es una alternativa interesante para la remediación de sitios contaminados con metales pesados.

Para llevar a cabo el proceso de fitorremediación de metales pesados, las plantas emplean los mecanismos de evasión, complejación, compartimentalización y translocación. El entendimiento de estos procesos básicos es importante para la realización de mejoras en las metodologías basadas en fitorremediación. Por ejemplo, se ha observado que la remoción y acumulación de metales pesados en plantas está íntimamente relacionado con los mecanismos de adquisición y movimiento de nutrientes, encontrando que el metabolismo de calcio tiene una alta correlación con el contenido de cationes en plantas (Antosiewicz 2005; Broadley et al. 2001; Kim et al. 2002; Lombi et al. 2002). Mediante el entendimiento de estos mecanismos básicos y su interrelación con nutrientes sería posible anticipar el grado de remoción y acumulación de los metales pesados por plantas. Adicionalmente, estos datos, permitirían predecir las respuestas de las comunidades de las plantas a cambios ambientales de nutrientes. Otra alternativa para incrementar la eficiencia de la fitorremediación es el uso de ingeniería genética para modificar los procesos implicados en la fitorremediación de metales pesados (captación, transporte y secuestro) para lo cual el conocimiento de los mecanismos moleculares es necesario.

Los estudios revelan que las especies hiperacumuladoras presentan una mayor expresión de los genes que codifican para sistemas de transporte de metales (Clemens et al. 1998; Pence et al. 2000). Por lo tanto, se propone que la captación de los metales pesados es uno de los factores limitantes para la hiperacumulación de estos por las plantas. Además, una idealidad de la estrategia de fitorremediación sería que las plantas logran translocar los metales pesados tóxicos hacia el tejido aéreo. Diversos estudios han demostrado que

los transportadores a nivel de membrana son un elemento determinante para tal propósito (Arazi et al. 1999).

Los estudios basados en el entendimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares de captación y acumulación de los metales pesados se han realizado empleando plantas con intereses agronómicos (Cohen et al. 1998; He et al. 2009) y en plantas clasificadas como hiperacumuladoras (Cosio et al. 2004; Lombi et al. 2002). Fu et al. (2008) demostró que el crecimiento de especies comestibles (ej. arroz) en sitios contaminados genera un elevado riesgo a la salud humana. Por otra parte, la mayoría de las plantas hiperacumuladoras producen poca biomasa y son de lento crecimiento, lo que las hace inviables para su uso en fitorremediación (Souza et al. 2013).

Vetiver y Espadaña son alternativas potenciales para su uso en fitorremediación, así como del estudio de los mecanismos moleculares involucrados, debido a que poseen características requeridas para este propósito, como un rápido crecimiento, elevada biomasa, crecen en sitios altamente contaminados además de su capacidad para remover y acumular metales pesados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar la ruta de ingreso de los cationes divalentes Cd y Pb en plantas con propósitos de fitorremediación y su relación con los mecanismos de transporte de Ca, Fe y Zn considerados como elementos esenciales.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Elegir las especies de estudio en función de la factibilidad del desarrollo de la metodología para la adaptación y propagación de las especies vegetales.
- ✓ Analizar la influencia de Ca, Fe y Zn en la cinética de remoción de Cd y Pb de una solución sintética contaminada.
- ✓ Examinar las bases del proceso de captación de Cd y Pb a través del sistema del transporte de calcio utilizando técnicas de biología molecular.
- ✓ Estudiar la participación de los canales de calcio en la captación de Cd y Pb mediante técnicas electrofisiológicas.
 - Establecer un protocolo básico para la preparación de protoplastos a partir de las especies en estudio para futuros desarrollos metodológicos sobre el papel de los canales cálcicos en la captación de Cd y Pb.

5. METODOLOGÍA

5.1 Colecta y propagación de las especies vegetales

Para llevar a cabo el análisis de los mecanismos de captación de Cd y Pb a través de los sistemas de transporte de Ca, Fe y Zn, inicialmente fueron consideradas tres especies vegetales, *Typha latifolia* (L.) [Espadaña], *Pistia stratiotes* (L.) [Lechuga de agua] y *Vetiveria zizanioides* (L.) [Vetiver]. Dos de estas especies vegetales serían elegidas con base en la factibilidad para su propagación y desarrollo en el invernadero de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Vetiver y Espadaña fueron colectadas de sitios no contaminados con Cd y Pb, posteriormente fueron llevadas al invernadero de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, en donde fueron propagadas. Las condiciones de recolecta y propagación de cada especie se describen en la sección de Materiales y Métodos de los Capítulos 2 y 4.

Por otra parte, plantas de *Pistia stratiotes*, fueron colectadas del humedal Ciénega de Cabezas, Tamasopo, S. L. P., transportadas en recipientes de plástico al invernadero de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP. Para su crecimiento y desarrollo bajo condiciones de hidroponía se analizó el efecto de dos soluciones nutritivas de distintas composiciones (A y B). La composición de la solución A fue: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.25 mM, KNO_3 1.5 mM, KH_2PO_4 0.5 mM, MgSO_4 0.5 mM, NaCl 0.25 mM y H_3BO_3 10.5 μM , MnCl_2 2.3 μM , H_2MoO_4 0.026 μM y FeEDTA 11.2 μM (Odjegba y Fasidi 2004). La composición de la solución B fue con base en N, P y K (Triple 17 ®); para esta última se estimó el efecto de su aplicación a varias concentraciones, siendo éstas 0.5, 1.0 y 1.5 gL^{-1} . Las soluciones se mantuvieron a un pH de 5.7-6 y se reemplazaron semanalmente por otras con la misma composición.

La evaluación de la propagación de las plantas se realizó mediante la contabilización de los individuos de cada especie vegetal producidos a los cuatro meses de su desarrollo en condiciones de invernadero o vivero.

El estudio del efecto de Ca, Fe y Zn sobre la remoción y acumulación de Cd y Pb, así como el análisis molecular de la captación de Cd y Pb a través del sistema de transporte de Ca se realizó exclusivamente en las especies de *Vetiveria zizanioides* y *Typha latifolia* debido a que no se logró la propagación de *Pistia stratiotes* bajo las condiciones analizadas.

5.2 Influencia de Ca, Fe y Zn en la remoción y acumulación de Cd y Pb en Vetiver y Espadaña

Para analizar el efecto de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb en las plantas de Vetiver y Espadaña, el conocimiento del grado de tolerancia de éstas plantas hacia Cd y Pb es esencial para evitar que éstas especies vegetales experimenten efectos tóxicos ocasionados por los metales, y por lo tanto, preservar la integridad de la membrana plasmática. Estudios previos realizados en plantas de Espadaña revelaron que a la concentración de 7.5 mgL^{-1} (66.7 y $36.2 \text{ }\mu\text{M}$) de Cd y Pb, respectivamente, las plantas no mostraron diferencias significativas en su crecimiento respecto el control (Alonso-Castro et al. 2009). Por otra parte, debido a la carencia de estudios que describieran la tolerancia de Vetiver a Cd y Pb en condiciones de hidroponia, se determinó la concentración de Cd y Pb adecuada para llevar a cabo los estudios en ésta planta, buscando concentraciones a las que Vetiver no presentara efectos tóxicos ocasionados por éstos metales. Para ello, plantas de Vetiver fueron expuestas a soluciones conteniendo Cd y Pb a las concentraciones de $2.5 - 15 \text{ mgL}^{-1}$ ($22 - 133 \text{ }\mu\text{M}$ de Cd y $12 - 72 \text{ }\mu\text{M}$ de Pb, respectivamente). Mediante el análisis de crecimiento, elongación de hojas y clorofila, se confirmó que las plantas de Vetiver no sufrieron efectos tóxicos por los metales a las concentraciones analizadas. Con base en lo anterior se estableció una concentración equimolar de Cd y Pb ($10 \text{ }\mu\text{M}$) para emplearse durante el desarrollo experimental.

Con la finalidad de definir las concentraciones a las cuales se tiene la mayor proporción de Cd o Pb disueltos, así como de los nutrientes Ca, Fe y Zn; se modeló la solución experimental para estimar su especiación y de esta forma elegir aquellas condiciones en las que el mayor porcentaje de los metales estuviese en forma de especies químicas disueltas (biodisponibles). Para tal efecto, se llevó a cabo un modelamiento químico de soluciones nutritivas de diferentes composiciones empleando el programa MINEQL+ver. 4.5 (Schecher y McAvoy 2003). Los resultados de dicho modelamiento químico indicaron que una solución nutritiva sintética libre de fosfatos garantiza la solubilidad de los metales, especialmente Fe y Pb. De manera paralela se realizaron pruebas experimentales en donde se analizó la solubilidad de los metales bajo las diferentes composiciones de las soluciones nutritivas propuestas; además, los resultados fueron corroborados al adicionar plantas de Espadaña y Vetiver a éstas soluciones. Finalmente, se determinó el contenido de los metales en las plantas; éstos resultados se describen en el Anexo A. La

composición de la solución nutritiva (SN) establecida fue KNO_3 1 mM, KCl 50 μM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM, FeSO_4 8.31 μM y $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ 1.3 μM .

Para analizar el efecto de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb en Vetiver y Espadaña, las plantas de ambas especies vegetales se aclimataron durante 10 días. Al día 0 las plantas fueron crecidas en un medio suplementado con la solución SN. Al día 6 se cambió la composición de las soluciones por otras en donde se varió la concentración de Ca, Fe o Zn, es decir, se indujeron diferentes estatus nutricionales en las plantas. Las concentraciones fueron Ca (0, 0.33, 0.67, 1 mM), Fe (0, 2.77, 5.54, 8.31 μM) o Zn (0, 0.43, 0.87, 1.3 μM). Hierro y Zn fueron mantenidos a 8.31 μM y 1.3 μM , respectivamente, cuando se varió la concentración de Ca en la solución nutritiva. Cuando la concentración de Fe varió, Ca permaneció a 1 mM y Zn a 1.3 μM ; en el caso de Zn, Ca fue añadido a 1 mM y Fe a 8.31 μM . Se comprobó que la composición de las soluciones nutritivas no afectó el crecimiento y desarrollo de las plantas, para ello se determinaron los parámetros de índice de crecimiento, clorofila y elongación de hojas de las plantas expuestas a las soluciones anteriormente mencionadas; los resultados se presentan en el Anexo B. Al día 10, las soluciones nutritivas fueron cambiadas por otras con la misma composición de nutrientes de las soluciones empleadas al día 6. En esta etapa de la experimentación, se añadió Cd o Pb a la concentración de 10 μM . De manera simultánea se realizaron pruebas control adicionando las soluciones nutritivas conteniendo Cd y Pb a vasos de polietileno sin plantas, éstos vasos fueron empleados en todas las pruebas.

Durante los 10 días del periodo experimental en donde se estudió el efecto tóxico de Cd y Pb en Vetiver, así como la influencia de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb en Espadaña y Vetiver, se tomaron muestras de las soluciones para determinar la remoción en función del tiempo, de los metales (Cd o Pb) y nutrientes (Ca, Fe y Zn). Los metales y los nutrientes se analizaron por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) mediante el método de flama (EAA-F; Varian SpectrAA 220FS) u horno de grafito (EAA-HG; Varian SpectrAA220Z). Al finalizar el periodo experimental las plantas se lavaron con HNO_3 0.5% por 5 min para desorber los metales adsorbidos en la superficie de las raíces. Las plantas se separaron en raíz y parte aérea, se secaron y se sometieron a una digestión ácida. Se determinó Cd y Pb por EAA en los blancos y en muestras de planta digeridas. Adicionalmente, el material vegetal de referencia de *Lagarosiphon major* (CBR, Material de referencia No. 60) fue digerido bajo las mismas condiciones de blancos y muestras de plantas expuestas a Cd y Pb, este procedimiento se realizó por triplicado. La recuperación

de Cd y Pb en las muestras de la planta de referencia digerida se encontró en el rango de 90% y 110%. Los límites de detección del método analítico fueron 0.01 y 0.02 mg/kg para Cd y Pb, respectivamente.

El diseño experimental así como las condiciones de análisis se describen en las secciones de Materiales y Métodos del Capítulo 2 para Vetiver y en el Capítulo 4 en el caso de Espadaña.

5.3 Efecto de Ca, Cd y Pb en la expresión de *TPC1* en Vetiver y Espadaña

Como se mencionó anteriormente, el calcio es uno de los elementos esenciales que tienen mayor influencia en la captación de Cd y Pb en las plantas; el canal de Ca^{2+} -dependiente de voltaje (*TPC1*) es una proteína transportadora de Ca que ha sido recientemente caracterizada y además, se ha sugerido su participación en el transporte de Cd y Pb (Perfus-Barbeoch et al. 2002). En el presente trabajo nosotros analizamos la participación del canal *TPC1* en el transporte de Cd y Pb; para ello se clonó y secuenció el gen que codifica para el canal *TPC1* de Espadaña y Vetiver, y posteriormente se analizó y se comparó la expresión de éste gen en las plantas creciendo en presencia de Ca, Cd ó Pb.

5.3.1 Clonación y secuenciación

A partir de la base de datos (GenBank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), se realizó un alineamiento empleando secuencias de genes *TPCs* de las plantas *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* y *Nicotiana tabacum*. El propósito de este alineamiento fue el de elaborar primers (iniciadores) degenerados diseñados a partir de las regiones conservadas de las secuencias de otras especies vegetales y con éstos multiplicar el gen por medio de una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) de los tejidos de cada especie vegetal para posibilitar el análisis de la secuencia. En el caso de Vetiver, fue necesario la realización de una RT-PCR anidada para la amplificación del gen *TPC1*. Para ello, se emplearon los primers degenerados *TPC1Fwd* (5' CACMACMTCMAAYAATCCWGAYGTMTGG 3') y *TPC1Rev2* (5' ACCATDCCA YTKGGRTAGTCATTGAAG -3') en la primera reacción. El producto de esta PCR fue utilizada para una segunda reacción empleando los primers *TPC1Fwd* (5'

CACMACMTCMAAYAATCCWGAYGTMTGG 3') y TPC1Rev1 (5' CTTSCVAKRAGAAGRTAYCGRATCC 3'). Las condiciones de la amplificación se describen en la Sección de Materiales y Métodos del Capítulo 3.

Como requisito previo a la secuenciación, el producto de la amplificación de *TPC1* de Vetiver por PCR se clonó en el plásmido pGEM-T Easy para transformación en *Escherichia coli*. La secuenciación se realizó empleando un secuenciador automático (3130 Genetic Analyzer). A partir de la secuencia obtenida del cDNA *TPC1* de Vetiver se diseñaron los primers específicos, TPC F2 (5' TCATCGACACTAACGGTCTG 3') y TPC R2 (5' AGAAAAGGAAGCGTTGATGGG 3'), los cuales se usaron para amplificar por RT-PCR el gen *TPC1* de Espadaña. Posteriormente se procedió a la secuenciación del gen *TPC1* de Espadaña según el procedimiento indicado previamente para Vetiver. Cada secuencia obtenida fue confirmada usando el programa Blast (NCBI-BLAST). Finalmente los primers empleados en el estudio de la expresión del gen *TPC1* bajo diferentes concentraciones de Ca, Cd y Pb en Vetiver y Espadaña fueron TPC1-Vet-F (5' TCAAGGTTACCGCCGAGGAAT 3'), TPC1-Vet-R (5' GATGGGGAGGCAAATGTCAGG 3') para Vetiver y TPC1-Ty-F (5' GGA ACTATGGCAAGAGGTTG 3'), TPC1-Ty-R (5' GGGAGCAATAGACACAGAGAAC 3') para Espadaña. El procedimiento de amplificación y secuenciación del gen *TPC1* en Espadaña y Vetiver se describe en la Sección de Materiales y Métodos de los Capítulos 3 y 4.

5.3.2 Análisis de la expresión del gen *TPC1*

Con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de Ca, Cd y Pb en la expresión del gen *TPC1* en hojas y raíces de Espadaña y Vetiver; inicialmente se estableció un procedimiento adecuado para la extracción de ARN de raíces y hojas de ambas especies vegetales empleando el reactivo TRIzol; posteriormente se analizó la expresión del gen *TPC1* en raíces y parte aérea de Vetiver y Espadaña. Se determinó que el tiempo de exposición a Ca, Cd y Pb adecuado para el análisis de la expresión del gen *TPC1* en ambas especies vegetales fue de 4 h.

Se determinó el efecto de la concentración de Ca, Cd y Pb en la expresión del gen *TPC1* en Vetiver y Espadaña, las plantas fueron crecidas en una solución nutritiva conteniendo KNO_3 1 mM, KCl 50 μM , FeSO_4 8.31 μM , y $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ 1.3 μM , adicionadas con Ca a las concentraciones de 0, 0.33, 0.67 o 1 mM; Cd y Pb se adicionaron a las concentraciones de 0, 10, 30 o 50 μM (para ambos metales). Cada metal (Ca, Cd o Pb) fue añadido de

manera individual. Después de 4 h se tomaron muestras de las raíces y se analizó la expresión del gen *TPC1* por RT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron con Actina 1 (No de Acceso. NM_001155179.1). El diseño experimental y las condiciones para el análisis se describen en la Sección de Materiales y Métodos de los Capítulos 3 y 4.

5.4 Aislamiento de protoplastos

Con el objetivo de promover el crecimiento de raíz de las plantas de Espadaña y Vetiver, ambas plantas fueron crecidas en una solución de KNO_3 durante 10 días. Posteriormente, aproximadamente 1 g de raíz fue desinfectada y seccionadas en trozos de aproximadamente 2-3 mm. Los restos vegetales fueron incubados en una solución enzimática conteniendo las enzimas celulasa y pectinasa. Se analizaron diferentes tiempos de incubación, 6- 16 h para Espadaña y 6-38 h para Vetiver. Después de cada periodo de incubación, la solución enzimática se filtró y el tejido vegetal fue lavado con una solución conteniendo manitol, MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado) y CaCl_2 . Las soluciones de incubación y de los lavados fueron centrifugadas y la pastilla conteniendo los protoplastos se resuspendió en una solución isotónica. Finalmente, se realizó la purificación de los protoplastos y conteo de los mismos empleando una Cámara de Neubauer. El procedimiento detallado para la obtención de protoplastos de raíces de Vetiver y Espadaña se describe en el Capítulo 5.

5.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos mencionados en las secciones 5.2 y 5.3 se realizaron por triplicado, los datos se evaluaron estadísticamente empleando un análisis de varianza (ANOVA, GraphPad InStat). Se realizó la prueba de Tukey para comparar las medias a un nivel de significancia de 5%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Elección de las especies vegetales de estudio

Las condiciones de colecta y propagación, así como de las características de las plantas de Vetiver y Espadaña empleadas en los experimentos se detallan en los Capítulos 2 y 4. En la Figura 4 se observan las plantas de Espadaña y Vetiver durante su periodo de propagación en condiciones de invernadero y vivero.



Figura 4. Plantas de Espadaña (A) y Vetiver (B) desarrolladas en el invernadero y vivero de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

En la propagación de las plantas de *Pistia stratiotes* (Figura 5) se probaron dos soluciones nutritivas descritas como Solución A y B (Sección 5.1). Se probó igualmente la propagación de esta especie en condiciones de invernadero y de vivero. A diferencia de las especies de *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides* las cuales incrementaron su número de individuos en un periodo de 4 meses en un 300% y 400%, respectivamente; en el caso de las plantas de *Pistia stratiotes* se logró preservar el 10% del número total de ejemplares con los que se contaba al inicio de las pruebas de propagación. Debido a lo anterior, esta tesis se realizó con las especies *Vetiveria zizanioides* y *Typha latifolia*.



Figura 5. Aspectos de las plantas de *Pistia stratiotes* en el sitio de colecta (humedal Ciénega de Tamasopo) y en el invernadero (Facultad de Ciencias Químicas, UALP) durante las pruebas de propagación.

6.2 Influencia del estatus nutricional de Ca, Fe y Zn en la cinética de remoción y en la acumulación de Cd y Pb

6.2.1 Remoción de Cd y Pb por plantas de *Vetiveria zizanioides*

Debido a la escasez de información que describiera las concentraciones de Cd y Pb a las cuales *V. zizanioides* comienza a presentar signos de toxicidad, plantas de Vetiver fueron expuestas a Cd y Pb a concentraciones entre 2.5 y 15 mgL⁻¹ (22 - 133 μM de Cd y 12 - 72 μM de Pb); éstas concentraciones se eligieron de forma que fueran superiores a los límites permitidos por la norma oficial Mexicana NOM-CCA-032-ECOL/1993, que establece 0.01 mgL⁻¹ para Cd y 5 mgL⁻¹ para Pb como límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola.

Dentro de los daños fisiológicos que provocan los metales pesados a las plantas se encuentran: inhibición de la fotosíntesis, inhibición de la respiración, actividades anormales de enzimas y un desbalance en el contenido de iones esenciales, lo cual se traduce en una disminución de su crecimiento y desarrollo, incluso llegando a ocasionar la

muerte de las plantas (Hossain et al. 2012). Por otra parte, se ha reportado que las plantas bajo un estrés, por ejemplo, por metales pesados, hidrolizan en mayor medida la clorofila **a** en comparación con la clorofila **b**, pudiendo no causar alteraciones en la clorofila total (Abdel-Basset et al. 1995; Drazkiewicz 1994; Schoch y Brown 1987). Por lo tanto, se describe que el cociente de clorofila a/b es un parámetro importante que debe tomarse en consideración cuando se estima el efecto de parámetros ambientales (Abdel-Basset et al. 1995; Drazkiewicz 1994; Ewais 1997; Sharma y Gaur 1995).

Debido a lo anterior se procedió a analizar el índice de crecimiento, la elongación de las hojas y el cociente de clorofila a/b, al inicio y al final del periodo experimental (Capítulo 2, Tabla 1). El análisis de los datos reveló que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el índice de crecimiento y elongación de las hojas entre las plantas expuestas a los metales pesados y los controles; el análisis de clorofila demostró que no hubo diferencias significativas en el cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental en todos los grupos experimentales. Estos resultados mostraron que las plantas de Vetiver no sufrieron efectos tóxicos ocasionados por la exposición a Pb y Cd a las concentraciones analizadas.

Se determinó la capacidad de Vetiver para remover y acumular Cd y Pb en condiciones hidropónicas. Los resultados mostraron que al primer día de experimentación, Vetiver fue capaz de remover 61-81% de cadmio y 93-99% de plomo, alcanzando remociones totales al día 10 de 71-85% de Cd y 97-99% de Pb (Capítulo 2, Figura 1). Un gran porcentaje de Cd removido de la solución fue encontrado en la fracción de metal adsorbido a la raíz; en contraste, un mayor porcentaje de Pb se encontró en la fracción de metal acumulado en la raíz seguida de la fracción de metal adsorbida. Vetiver adsorbió un total de 33-61% de Cd y 18-41% de Pb, respectivamente. En este sentido, se ha reportado una elevada afinidad de los cationes divalentes por las cargas negativas en la pared celular (Hart et al. 1998; Lasat et al. 1996). Muy probablemente Pb y Cd fueron adsorbidos inicialmente a la superficie de las raíces, y posteriormente, en una forma lenta, captados hacia el interior de las raíces (He et al. 2009; Lombi et al. 2002). Las plantas de Vetiver acumularon 1.5-2.4 veces más Pb que Cd, concentrando los metales principalmente en raíces (Capítulo 2, Figura 2). Andra et al. (2009) reportó una alta tolerancia y acumulación de Pb en Vetiver, especialmente en raíces, atribuyendo la alta tolerancia y acumulación de Pb a la formación de complejos con fitoquelatinas. Plomo fue translocado a partes aéreas en mayor medida que Cd, 10-15% de Pb y 2-4% de Cd, respectivamente (Capítulo 2, Figura

2). Aibibu et al. (2010) reportó que la acumulación de Cd en las raíces de Vetiver, alcanzó un 96% del metal captado a la concentración de 30 mgL^{-1} Cd. Algunos estudios también han reportado una alta acumulación de Pb en las raíces y partes aéreas de las plantas de Vetiver (Roongtanakiat et al. 2007; Andra et al. 2009; Danh et al. 2009).

La internalización de Cd y Pb en los tejidos de Vetiver fue confirmada por medio de microscopía electrónica de barrido (ESEM-EDX). Debido a la baja sensibilidad de la técnica no fue posible detectar la presencia de Cd o Pb a la máxima concentración de metales empleados en este estudio (15 mgL^{-1}). Por lo tanto, plantas de vetiver fueron expuestas por triplicado, durante 3 días a la concentración de 100 mgL^{-1} de Cd o Pb para detectar la internalización de estos elementos por las plantas. De cada muestra vegetal se analizaron 5 partículas (30 partículas totales); las microfotografías de la parte interna de las raíces primarias de plantas de vetiver expuestas a Cd y Pb son mostradas en la Figura 6. El espectro EDX fue obtenido de las partículas brillantes (Figura 6 C, D). Los análisis EDX revelaron los picos característicos de Cd y Pb a una intensidad de 3.2 keV y 2.2 keV, respectivamente. Las partículas conteniendo Pb mostraron además la presencia de K y Ca mientras que las plantas expuestas a Cd mostraron en su interior partículas conteniendo Cd, Al, Cl, Ca y Fe.

Mediante los resultados anteriores se confirmó la captación de Cd y Pb por plantas de Vetiver; además, se observó que las plantas no mostraron signos de toxicidad por la presencia de los metales hasta la concentración de 15 mgL^{-1} .

6.2.2 Determinación de la composición de las soluciones nutritivas

Se realizaron comparaciones de soluciones nutritivas previamente reportadas para varias especies, determinándose la composición inicial de la solución como sigue: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $125 \mu\text{M}$, KNO_3 1 mM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM , Fe-EDTA $11 \mu\text{M}$, ZnSO_4 $1.3 \mu\text{M}$ y KCl $50 \mu\text{M}$ (Cohen et al. 1998; Hart et al. 1998). Posteriormente se asignaron variaciones en la concentración de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y se determinó a FeSO_4 como fuente alternativa de Fe en la solución experimental. Para más detalle revisar el Anexo A, Tabla 1. La solubilidad de los elementos se analizó empleando el programa MINEQL+4.5 (Schecher y McAvoy 2003).

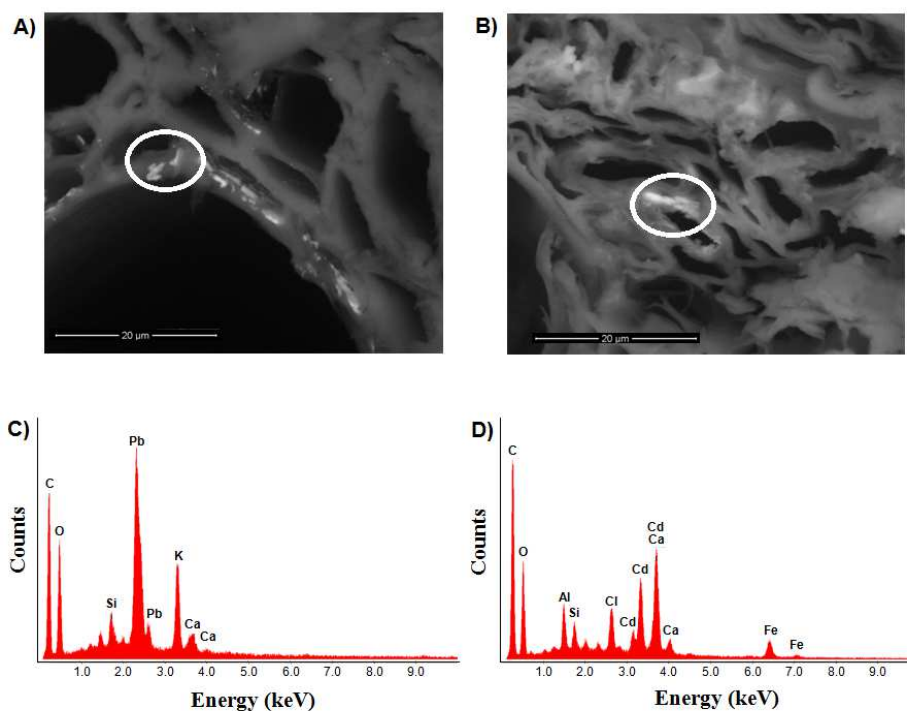


Figura 6. Microfotografías y espectros EDX de la parte interna de las raíces de Vetiver expuestas a Pb (A, C) y Cd (B, D) obtenidas con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM Quanta 200).

De todos los elementos presentes en las soluciones nutritivas hipotéticas, la solubilidad de Pb y Fe añadido como FeSO_4 fue un factor crítico en su biodisponibilidad, debido principalmente a la presencia de fosfatos en las soluciones nutritivas. La solubilidad de Pb y Fe se incrementó notablemente al eliminar la fuente de fosfatos de la solución nutritiva (Anexo A, Tabla 2). Estos datos fueron confirmados experimentalmente (ver Anexo A, Figura 1). Finalmente se verificó la biodisponibilidad de Fe y Pb mediante el análisis de tejidos vegetales provenientes de plantas desarrolladas en soluciones con la misma composición modelada. El análisis de los tejidos de Espadaña y Vetiver revelaron una mayor acumulación de Pb en los tratamientos donde las plantas fueron expuestas a la solución en ausencia de fosfatos (Anexo A, Figura 2 A, B). Respecto a hierro, no se observó alguna tendencia en su contenido en los tejidos en los distintos tratamientos (Anexo A, Figura 2 C, D). La composición de las soluciones experimentales finalmente fue determinada como KNO_3 1 mM, KCl 50 μM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM, FeSO_4 8.31 μM y $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ 1.3 μM , sin fosfatos.

Se realizó un ensayo para confirmar que la solución nutritiva establecida, así como las distintas condiciones de estatus nutricionales a los que las plantas serían sometidas, no afectarían el crecimiento de las plantas de Espadaña y de Vetiver. Se analizó el índice de crecimiento, elongación de hojas y el contenido de clorofila en ambas especies vegetales. Los resultados mostraron que las plantas no presentaron efectos adversos bajo su crecimiento en las condiciones experimentales establecidas: 10 días de aclimatación + 10 días de periodo experimental (Anexo 2, Tabla 1). Los procedimientos experimentales detallados se pueden consultar en el Capítulo 2 (para Vetiver) y en el Capítulo 4 (para Espadaña), Sección de Materiales y Métodos.

6.2.3 Influencia de Ca, Fe y Zn en la remoción y acumulación de Cd y Pb por las plantas

6.2.3.1 Vetiver

Para verificar el estado fisiológico de las plantas de Vetiver durante el desarrollo experimental se determinaron los contenidos de clorofila a y b en las plantas. En la Tabla 3 se presentan los datos de cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental, en las plantas empleadas para determinar la influencia del estatus de Ca, Fe y Zn en la remoción de Cd y Pb de la solución. Los resultados mostraron que el índice de clorofila a/b de las plantas de Vetiver no sufrió cambios estadísticamente significativos al inicio y al final del periodo experimental, por lo tanto es posible afirmar que las plantas no sufrieron efectos adversos durante este tiempo.

Para estimar las fracciones de metales adsorbidos e internalizados por las plantas, al final del período de exposición de éstas a Cd y Pb, se determinó la concentración de los metales en: (a) las soluciones experimentales; (b) las soluciones ácidas empleadas para determinar la fracción de metal adsorbido; y (c) en las soluciones ácidas donde las plantas (raíz y parte aérea) fueron digeridas. Los resultados se describen y se discuten en el Capítulo 2, Resultados y Discusión. Aunque el contenido de Pb en las soluciones experimentales después de 10 días de periodo experimental no mostró una diferencia significativa entre todos los tratamientos de Ca, Fe o Zn ($p > 0.05$), se observó una correlación positiva entre el contenido de Pb en la solución y la concentración de Ca añadida a las soluciones nutritivas (Capítulo 2, Figura 3A, C, E).

En los tratamientos con Fe o Zn no se observaron diferencias significativas en la remoción de Pb o Cd. No obstante, la remoción de Cd en ausencia de Ca fue significativamente

mayor que cuando Ca estuvo presente en la solución en todos los tratamientos de Ca, Fe y Zn (Capítulo 2, Figura 3A).

Tabla 3. Cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental de plantas de *V. zizanioides* expuestas durante 10 días a diferentes tratamientos de Pb y Cd ($n = 3 \pm DS$).

Tratamiento	Plantas expuestas a 10 μ M		Plantas expuestas a 10 μ M	
	Cd		Pb	
	Inicio (T0)	Final (T10)	Inicio (T0)	Final (T10)
Ca 0 mM	1.3 \pm 0.4	1.4 \pm 0.4 ^a	2.7 \pm 0.6	2.1 \pm 0.8 ^a
Ca 0.33 mM	1.7 \pm 0.4	1.3 \pm 0.1 ^a	2.7 \pm 0.6	2.5 \pm 0.9 ^a
Ca 0.67 mM	1.7 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3 ^a	2.7 \pm 0.9	3.1 \pm 0.7 ^a
Ca 1 mM	2.0 \pm 0.3	2.1 \pm 0.6 ^a	2.3 \pm 0.3	2.6 \pm 0.7 ^a
Fe 0 μM	1.7 \pm 0.2	2.1 \pm 0.5 ^a	1.3 \pm 0.4	2.0 \pm 0.5 ^a
Fe 2.77 μM	2.6 \pm 0.1	2.4 \pm 0.4 ^a	2.7 \pm 0.6	2.2 \pm 0.4 ^a
Fe 5.54 μM	2.3 \pm 0.3	2.3 \pm 0.5 ^a	3.5 \pm 0.5	3.1 \pm 0.2 ^a
Fe 8.31 μM	2.0 \pm 0.3	2.1 \pm 0.6 ^a	2.3 \pm 0.3	2.6 \pm 0.7 ^a
Zn 0 μM	2.0 \pm 0.6	1.6 \pm 0.3 ^a	2.4 \pm 0.9	2.7 \pm 0.2 ^a
Zn 0.43 μM	1.6 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5 ^a	1.9 \pm 0.8	1.8 \pm 0.8 ^a
Zn 0.87 μM	1.4 \pm 0.1	1.4 \pm 0.4 ^a	2.6 \pm 0.8	2.5 \pm 0.9 ^a
Zn 1.3 μM	2.0 \pm 0.3	2.1 \pm 0.6 ^a	2.3 \pm 0.3	2.6 \pm 0.7 ^a

Los valores con una misma letra no difieren estadísticamente del cociente de clorofila a/b al inicio (T0) del experimento en cada tratamiento ($P < 0.05$). La duración del experimento fue de 10 días (T10).

Al finalizar el periodo experimental (10 días), raíces y tejido aéreo de las plantas de *Vetiver* expuestas a Cd o Pb se digirieron. Los metales se cuantificaron por EAA. De igual forma que en los resultados anteriores, en los tratamientos donde se varió la concentración de Ca, el contenido de plomo en los tejidos mostró una tendencia inversamente proporcional a la concentración de calcio en las soluciones; sin embargo, la acumulación de Pb en todos los tratamientos no difirió estadísticamente (Capítulo 2, Figura 3; $p > 0.05$). De una manera similar, la acumulación de Cd en *Vetiver* fue dependiente de la concentración de Ca en la solución. El Cd cuantificado en los tejidos fue significativamente mayor en ausencia de Ca con respecto de los demás tratamientos con Ca, Fe y Zn (Capítulo 2, Figura 3; $p < 0.05$).

Se determinaron las correlaciones (r) entre la acumulación total de Cd o Pb en las plantas y la concentración de Ca en la solución experimental, las cuales fueron de 0.8859 y 0.7796 para los tratamientos de Cd y Pb, respectivamente. Estos datos sugieren que la acumulación de Cd y Pb depende de la concentración de Ca en el medio, especialmente en el caso del Cd. Algunos estudios han mencionado el papel del Ca en la disminución del efecto tóxico de Cd y Pb en diferentes procesos fisiológicos (Antosiewicz 2005; Choi et al. 2001; Kurtyka et al. 2008; Skórzynska-Polit et al. 1998; Wan et al. 2011). El Ca en el medio de crecimiento pudo inhibir la acumulación de Cd y Pb en plantas por una disminución del número de sitios de adsorción en la superficie celular y por lo tanto desplazando a los metales pesados (Choi et al. 2001; Malkowsky et al. 2005; Wan et al. 2011) O bien, disminuyendo la permeabilidad de otros cationes a través de la membrana celular (White 2000; Sanders et al. 2002). Kim et al. (2002), sugiere que Pb y Cd pueden competir con Ca por las proteínas de transporte en raíces de plantas de arroz (*Oryza sativa*).

Se determinó el contenido de Ca, Fe y Zn en las soluciones durante el periodo experimental. La concentración de Ca se incrementó en las soluciones experimentales en el primer día de exposición de las plantas a este nutriente; las soluciones además contenían Cd y Pb. Los resultados detallados se presentan en el Capítulo 2, Figura 4 y en la Figura 1 del Anexo C. Estos resultados indican que probablemente existe un mecanismo primario común en la interacción de los metales con la planta en el cual el Ca tiene un papel específico. Algunos autores han propuesto que existe un proceso de intercambio catiónico en el apoplasto, liberando el Ca en las paredes celulares hacia la solución nutritiva (Hart et al. 1998; Lasat et al. 1996; White y Broadley 2003). Lo anterior podría explicar la elevada remoción de los metales observada en el primer día de exposición de las plantas a los metales y un incremento en el contenido de Ca en las soluciones al mismo día. (Capítulo 2, Figura 1 y 4). Sin embargo, se observaron diferentes efectos en el contenido de Ca entre los tratamientos con Cd y Pb a partir del día 5 de experimentación. En el caso de los tratamientos con Pb, se observó un incremento del contenido de Ca en la solución, mientras que en el caso de los tratamientos con Cd, se observó una disminución del contenido de este metal en las soluciones (Capítulo 2, Figura 4). Probablemente las plantas expuestas a Pb pudieron liberar Ca contenido en las plantas como oxalato de calcio por complejación del metal pesado y desintoxicación. Una explicación al comportamiento observada en los tratamientos con Cd es dada por Faheed

et al. (2013) y Jáuregui-Zúñiga et al. (2005), la disminución del contenido de Ca en la solución en los tratamientos con Cd pudo ser consecuencia de la internalización de Cd en el apoplasto hacia las células, permitiendo al Ca en solución reabsorberse a los espacios libres en la pared celular. Las fitoquelatinas se han reportado como principal mecanismo de defensa a Cd en las plantas al disminuir la concentración del ion libre en las células por quelación y posterior compartimentalización (Hossain 2012). Los resultados indican una alta interacción entre Ca y Cd para su captación en las plantas de Vetiver.

Las soluciones en donde no se adicionó Fe presentaron un incremento significativo de este metal al día 5 respecto a las soluciones en donde se adicionó la mayor concentración de Fe (8.31 μM) ($p < 0.05$; Anexo C, Figura 2 C, D). Probablemente el hierro depositado en el apoplasto fue solubilizado debido a la carencia de Fe en la solución nutritiva, incrementando su concentración en la solución proceso que ha sido sugerido en la literatura (Bienfait et al. 1985; Becker et al. 1995). No se encontraron diferencias significativas en el contenido de Fe entre los grupos de tratamiento de Zn ($p > 0.05$; Anexo C, Figura 2 E, F). En el caso de los tratamientos donde se varió la concentración de Ca en presencia de Pb, se observó un incremento significativo de la concentración de Fe al día 5 en el tratamiento en ausencia de Ca respecto a los tratamientos a los cuales se añadió Ca ($p < 0.05$; Anexo C Figura 2 A). Mahamadi y Nharingo (2010) demostraron que Pb(II) presentó una mayor afinidad hacia biomasa no viva de *Eichhornia crassipes* que otros metales como Cd(II) o Zn(II) en solución acuosa. Además, experimentos en carbón activado de cáscara de naranja han demostrado que Pb posee una mayor capacidad de adsorción que Fe, Cu o Zn (Bernard y Jimoh 2013). De esta forma, Pb pudo ocupar los sitios de adsorción de Fe liberándolo hacia la solución. No se observaron diferencias significativas en el contenido de Zn en los tratamientos en donde se varió la concentración de Ca, Fe y Zn (Anexo C; Figura 3). Lo cual sugiere que debido a las bajas concentraciones de Zn utilizadas en los ensayos ($\leq 1.3 \mu\text{M}$), comparadas con la concentración de Cd y Pb añadida (10 μM), no se logró observar un efecto sobre la remoción y acumulación de los metales pesados por las plantas.

6.2.3.2 Espadaña

De igual forma que con Vetiver, se verificó el estado fisiológico de las plantas de Espadaña durante el desarrollo experimental. En la tabla 4 se observa el cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental de las plantas empleadas durante

la determinación de la influencia del estatus de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb. Los resultados mostraron que el índice de clorofila a/b de las plantas de Espadaña no varió significativamente al inicio y al final del periodo experimental.

Tabla 4. Cociente de clorofila a/b al inicio y al final del periodo experimental de plantas de *T. latifolia* expuestas durante 10 días a diferentes tratamientos de Pb y Cd ($n = 3 \pm DS$).

Tratamiento	Plantas expuestas a 10 μ M Cd		Plantas expuestas a 10 μ M Pb	
	Inicio (T0)	Final (T10)	Inicio (T0)	Final (T10)
	Ca 0 mM	2.0 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1 ^a	1.9 \pm 0.1
Ca 0.33 mM	2.4 \pm 0.6	2.4 \pm 0.7 ^a	2.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3 ^a
Ca 0.67 mM	2.1 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3 ^a	2.0 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1 ^a
Ca 1 mM	1.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 ^a	2.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.1 ^a
Fe 0 μM	2.2 \pm 0.2	2.3 \pm 0.3 ^a	2.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.1 ^a
Fe 2.77 μM	2.4 \pm 0.2	2.4 \pm 0.5 ^a	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.3 ^a
Fe 5.54 μM	2.1 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2 ^a	2.1 \pm 0.1	2.4 \pm 0.7 ^a
Fe 8.31 μM	1.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 ^a	2.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.1 ^a
Zn 0 μM	2.2 \pm 0.3	2.1 \pm 0.4 ^a	2.0 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2 ^a
Zn 0.43 μM	2.1 \pm 0.1	2.4 \pm 0.4 ^a	1.9 \pm 0.1	2.4 \pm 0.4 ^a
Zn 0.87 μM	2.3 \pm 0.1	2.6 \pm 0.5 ^a	2.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3 ^a
Zn 1.3 μM	1.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1 ^a	2.2 \pm 0.3	2.6 \pm 0.1 ^a

Los valores con una misma letra no difieren estadísticamente del cociente de clorofila a/b al inicio (T0) del experimento en cada tratamiento ($P < 0.05$). La duración del experimento fue de 10 días (T10).

Se determinó la concentración de Pb y Cd en las soluciones nutritivas de las plantas de Espadaña expuestas a los metales. Al término del primer día de experimentación, las plantas de Espadaña removieron entre 78-89% de Pb y 37-83% de Cd de la masa de metal que contenían las soluciones; en 10 días de experimentación se alcanzó una remoción total de 86-92% de Pb y 69-96% de Cd (ver Capítulo 4, Figura 1). Las cinéticas de remoción de Cd y Pb fueron diferentes. La remoción de Pb fue rápida y no se observaron diferencias entre los tratamientos con Ca, Fe o Zn mientras que la remoción de Cd mostró una tendencia inversamente proporcional a la concentración de Ca en la

solución. Esto es, la remoción de Cd de las soluciones en ausencia de Ca fue significativamente mayor a la determinada en soluciones conteniendo Ca a diferentes concentraciones ($p < 0.05$; ver resultados en Capítulo 4, Figura 1). La remoción de Cd de las soluciones suplementadas con Fe o Zn no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Una vez terminado el periodo de exposición de las plantas a las soluciones nutritivas conteniendo Cd o Pb, se determinó la concentración de Cd y Pb remanente en la solución (metal que no fue removido por las plantas). Por otra parte, la raíz de las plantas que estuvieron expuestas a las soluciones nutritivas se expusieron a una solución ácida de HNO_3 0.5% durante 5 minutos para recuperar la fracción adsorbida de los metales. Finalmente, la raíz y la parte aérea de las plantas se seccionó y estos tejidos fueron digeridos en medio ácido para determinar la fracción de Cd o Pb internalizada por la planta durante la experimentación. Los procedimientos analíticos se describen en el Capítulo 4, Sección de Materiales y Métodos. Las fracciones de los metales adsorbidos y acumulados en la raíz y en la parte aérea se muestran en el Capítulo 4, Figura 3. La adsorción de Cd y Pb en la superficie de las raíces fue proporcional a la concentración de Ca añadido a las soluciones nutritivas, sin embargo, no se observaron diferencia significativas entre los grupos ($p > 0.05$).

Los resultados indicaron que Cd y Pb fueron internalizados en las raíces y posteriormente fueron translocados hacia partes aéreas; la acumulación de ambos metales fue significativamente mayor en raíces que en partes aéreas ($p < 0.05$; Capítulo 4, Figura 3). Resultados similares se han reportado en plantas de Espadaña expuestas a Cd y Pb (Alonso-Castro et al., 2009). El contenido de los metales (Cd o Pb) en las raíces y en partes aéreas disminuyó significativamente con un incremento de la concentración de Ca en el medio nutritivo ($p < 0.05$; Capítulo 4, Figura 3 C y D). Estos resultados sugieren una competencia entre los iones Ca y Cd o Ca y Pb por los mecanismos de transporte en *T. latifolia*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de Zn (Capítulo 4, Figura 3 E y F). En el caso de los tratamientos en donde se varió la concentración de Fe, el contenido de Pb mostró un comportamiento similar al observado en los tratamientos con Ca; el Pb acumulado en raíces y parte aérea de las plantas expuestas a soluciones sin Fe fue significativamente mayor que las soluciones en donde se añadió Fe (Capítulo 4; Figura 3 A). No se observaron diferencias en los tratamientos Fe-Cd. Al analizar el contenido de Ca, Fe y Zn en las soluciones nutritivas,

durante el periodo experimental. La concentración de Ca y de Zn en los diferentes tratamientos no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$; Anexo C, Figuras 4 y 6). La concentración de Fe en los tratamientos mostró una tendencia (Capítulo 4, Figura 2) que no está claramente relacionada con la presencia de Cd ó Pb. Al inicio de la experimentación (un día), la concentración de Fe se incrementó en todos los tratamientos (Cd ó Pb, con variaciones de las concentraciones de Ca, Fe ó Zn); en el quinto día el contenido de Fe en las soluciones disminuyó y al día 10 se observó un ligero incremento en todos los tratamientos (Capítulo 4, Figura 2). Suponemos que debido a que los iones de Fe libres son tóxicos, las plantas han desarrollado sistemas de almacenamiento del metal (sideróforos) y ferritinas (Pavlíková et al. 2002). Las ferritinas tienen un papel fundamental en las plantas, no sólo controlando el hierro en las células, sino además protegiendo a las células de la toxicidad por metales pesados, en donde el Fe es desplazado de los complejos con ferritina para formar el quelato correspondiente con el metal pesado (Pavlíková et al. 2002). Por lo tanto, en este trabajo, al primer día, la presencia de metales pesados (Pb o Cd) probablemente estimuló el desplazamiento de hierro formando quelatos ferritina-metal pesado y a su vez, promoviendo el eflujo de hierro hacia la solución.

6.3 Efecto de Ca, Cd y Pb en la expresión del gen que codifica para el canal de calcio dependiente de voltaje TPC1 en plantas de Vetiver y de Espadaña

6.3.1 Clonación y secuenciación

Para lograr la clonación y secuenciación del gen *TPC1*, inicialmente se realizó un alineamiento de secuencias de diferentes especies vegetales para el diseño de primers degenerados, con el objetivo de amplificar el gen *TPC1* de cada planta. La amplificación del gen *TPC1* de Vetiver finalmente se efectuó mediante PCR anidada sobre cDNA de hojas, los detalles pueden consultarse en el Capítulo 3, sección de Materiales y Métodos. Los productos de PCR de Vetiver se clonaron en el vector pGEM-T Easy, posteriormente se realizaron minipreps para separar el DNA plasmídico del cultivo bacteriano y se realizó una digestión con la enzima EcoRI para separar el inserto de cDNA del plásmido, finalmente los productos de la digestión fueron secuenciados usando el equipo 3130 Genetic Analyzer. La secuencia obtenida (*VzTPC1*; No. de Acceso JX897057) resultó en un fragmento de cDNA de 817 pares de bases (pb). La secuencia obtenida fue analizada usando el programa BLAST-NCBI, mostrando gran similitud con secuencias *TPC1* de

otras plantas, especialmente de monocotiledóneas (Capítulo 3, Tabla 3). La secuencia del gen *TPC1* en Espadaña fue amplificada a partir de hojas por RT-PCR, en esta ocasión se utilizaron primers específicos diseñados a partir de la secuencia *VzTPC1* (Capítulo 4, Sección de Materiales y Métodos). La amplificación del gen que codifica para el canal de calcio dependiente de voltaje *TPC1* en Espadaña (*TITPC1*; No. de Acceso KF511802) resultó en un fragmento de 513 pb. El análisis de la secuencia *TITPC1* por BLAST-NCBI del mismo modo que en el caso de Vetiver, mostró gran similitud con secuencias de plantas monocotiledóneas (Capítulo 4, Tabla 1).

6.3.2 Análisis de la expresión de *TPC1*

El análisis de la expresión del gen *TPC1* en Espadaña y en Vetiver bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de Ca en la solución nutritiva (ausencia y presencia de Ca), reveló que el gen es expresado en raíces y en hojas de ambas plantas, sin embargo, el efecto de las diferentes condiciones de Ca en la solución sobre la expresión del gen *TPC1* se reflejó únicamente en raíces [Capítulo 3, Figura 2 (Vetiver); Capítulo 4, Figura 4 (Espadaña)]. La expresión de *TPC1* bajo presencia de Ca fue significativamente mayor a la expresión en condiciones de deficiencia de este metal en las raíces de ambas plantas ($p < 0.05$) [Capítulo 3, Figura 2 (Vetiver); Capítulo 4, Figura 4 (Espadaña)]. Resultados similares fueron obtenidos en plántulas de trigo, donde *TaTPC1* fue inducible en raíces pero no en parte aérea, implicando que *TaTPC1* responde a los estímulos del suelo (Wang et al. 2005). La expresión de *VzTPC1* y *TITPC1* fue dependiente del tiempo en raíces, lo que sugiere una sobreexpresión de los genes estimulada por la presencia de Ca en las soluciones. Por otra parte, probablemente el tiempo de exposición (8 h) fue insuficiente para reflejar un cambio en el proceso de transporte de Ca en hojas (Capítulo 3, Figura 2 A; Capítulo 4, Figura 4 A).

Con el objetivo de analizar el efecto de Ca, Cd y Pb en la expresión de *TPC1* en raíces de Vetiver y Espadaña, las plantas fueron expuestas a diferentes concentraciones de Ca, Cd y Pb. En el caso de Vetiver, la expresión *VzTPC1* se incrementó de manera proporcional a la concentración de Ca y Cd en las soluciones (Capítulo 3, Figura 4 A y B). En el caso de Ca, se observó una diferencia significativa en la expresión del gen de las plantas control (ausencia de Ca) y las plantas expuestas a la máxima concentración de Ca añadida (1mM) ($p < 0.05$; Capítulo 3 Figura 4A). De manera similar, los resultados mostraron diferencias significativas entre las plantas expuestas a la máxima

concentración de Cd analizada (50 μM) y las plantas control (Capítulo 3, Figura 4B). La expresión del gen *VzTPC1* en plantas expuestas a Pb no fue clara, aunque se observó un incremento significativo en la expresión a las concentraciones de 10 y 50 μM de Pb respecto a las plantas control (ausencia de Pb) ($p < 0.05$), la expresión de *VzTPC1* en las raíces de las plantas expuestas a 30 μM no mostró diferencias significativas respecto a las plantas control (Capítulo 3, Figura 4C). Los datos fueron ajustados por regresión lineal, el resultado del análisis revela una alta correlación (r) entre la expresión de *VzTPC1* y las concentraciones de Ca y Cd en las soluciones (1.0 y 0.9984 para Ca y Cd, respectivamente). Los datos en los tratamientos con Pb no mostraron convergencia. A diferencia de Vetiver, la expresión de *TITPC1* en las raíces de Espadaña mostró una elevada correlación entre los tratamientos con Ca, Cd y Pb, en donde sus correlaciones (r) fueron 0.8793, 0.8628 y 0.8446, respectivamente (Capítulo 4, Figura 5). Las elevadas correlaciones observadas entre Ca o Cd con la expresión de *VzTPC1* en Vetiver, y Ca, Cd o Pb con la expresión de *TITPC1* en Espadaña, mostraron que la expresión de *TPC1* está relacionada a la presencia y concentración de cada elemento en las soluciones nutritivas. Nuestros resultados sugieren que, debido a la similitud en su forma química, Cd o Pb pueden mimetizar a Ca y ser transportados a través de éste sistema. Las proteínas TPCs son estructuralmente similares a los canales de Ca dependientes de voltaje en células animales (VDCCs). Estas proteínas se han relacionado con el transporte de Cd y Pb en mamíferos (Hashimoto et al. 2004; Marchetti 2013; Zhu et al. 2010). El influjo de Cd a través de los canales de calcio también se ha sugerido en plantas (He et al. 2009; Perfus-Barbeoch et al. 2002). En el caso de la expresión de *VzTPC1* en las raíces de Vetiver expuestas a Pb (Capítulo 3, Figura 4C), pudo deberse a que las plantas de manera indirecta sobreexpresaron el gen con el objetivo de incrementar la concentración de Ca citosólico en respuesta a un estrés abiótico tal como lo sugieren Bonaventure et al. (2007), Islam et al. (2010), Kurusu et al. (2012) y Wang et al. (2005).

Basados en lo anterior, nuestro trabajo propone que la captación de Cd y Pb disminuye con un incremento en las concentraciones de Ca en el medio, como resultado de una competencia en la captación de Ca y Cd (Vetiver, Espadaña) o Ca y Pb (Espadaña), y no por una disminución en la expresión de los canales TPC1 en las plantas que se estudiaron.

6.4 Aislamiento de protoplastos de raíces de Espadaña y Vetiver como base para estudios electrofisiológicos

Mediante la metodología señalada, se logró la obtención de protoplastos de *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides* (Capítulo 5; Figuras 1 y 2). Sin embargo, el proceso de purificación empleando sacarosa no fue lo suficientemente efectivo para lograr una completa separación de protoplastos, ya que se observó la presencia de detritus aún después del proceso de purificación. Bracho et al. (2008) reportó que mediante el empleo de la solución de Histopaque® 1077 se logró recuperar un mayor número de protoplastos de raíces de *Allium cepa*, en comparación con la solución de sacarosa. Así mismo, el empleo de Histopaque® 1077 resultó ser más efectivo para la remoción de detritus, obteniéndose poblaciones de protoplastos más limpios. De manera que una alternativa para este procedimiento en las plantas de Espadaña y Vetiver es el empleo de la solución de Histopaque®.

En este trabajo, el diámetro de los protoplastos que se obtuvieron fue de 30-36 μm para *T. latifolia* y de 11-25 μm para *V. zizanioides* (Capítulo 5, Figuras 1 y 2). Prasertsongskun (2004) reportó que el tamaño de protoplastos de células en suspensión derivadas de inflorescencias de Vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) variaba entre 10 y 25 μm . En la técnica que se utilizó para la obtención de los protoplastos, se observó que los parámetros que mayormente afectan la eficiencia del método de obtención de protoplastos son el tiempo de incubación y el proceso de purificación. A mayor tiempo de incubación se obtuvo mayor número de protoplastos aislados de Espadaña, obteniendo a las 6, 8 y 16h un total de 16 000, 21 000 y 84 000 cel / g de raíz), al realizar la semipurificación con sacarosa el rendimiento disminuyó en un 17%. En Vetiver, el número de protoplastos aislados fue de 52 700 y 38 100 cel / g de raíz a las 16 y 38 h. La disminución en el número de protoplastos aislados a las 38 h pudo ser debido al rompimiento de los protoplastos como resultado de un tiempo de incubación largo. Debido a que a las 16 h aún no se observó la liberación completa de los protoplastos se podría suponer que en un periodo comprendido entre 16 y 38 h sería el tiempo de incubación óptimo para obtener la mayor cantidad de protoplastos de células radicales de Vetiver. Se han reportado rendimientos en la obtención de protoplastos de inflorescencias de Vetiver de 8.4×10^4 protoplastos / mL (Prasertsongskun 2004). Rendimientos similares en la obtención de protoplastos han sido reportados para tejidos de plantas como tejido radical de *Allium cepa*, L. el cual fue de 31 465 protoplastos / g de raíz (Bracho et al. 2008). La

eficiencia del aislamiento enzimático para la obtención de protoplastos depende de varios factores como el origen del material vegetal, el tipo y concentración de enzimas utilizadas, la temperatura, el tiempo de acción y el método de recuperación de los protoplastos (Assani et al. 2001; Geerts et al. 2008; Guangyu et al. 1997; Pindel 2007). Debido a lo anterior, se deben realizar aún adecuaciones a la técnica para mejorar el proceso de purificación en el caso de las plantas de Espadaña y de estratificación en el caso de Vetiver.

7. CONCLUSIONES

- De las tres especies vegetales propuestas (*Vetiveria zizanioides*, *Pistia stratiotes* y *Typha latifolia*), se eligieron las especies *V. zizanioides* (Vetiver) y *Typha latifolia* (Espadaña) con base a la factibilidad de su adaptación y propagación.
- Vetiver creció en las soluciones conteniendo Cd (22-133 μM) y Pb (12-72 μM) durante 10 días sin mostrar signos de toxicidad.
- Las plantas de Vetiver removieron 71-85% de Cd y 97-99% de Pb después de 10 días de exposición a soluciones simples; la remoción de Cd fue inversamente proporcional a la concentración de éste metal en las soluciones.
- Vetiver acumuló de 1.5-2.4 veces más Pb que Cd, concentrando ambos metales principalmente en raíces. Una mayor cantidad de Pb fue translocado hacia tejido aéreo, 10-15% del total acumulado, en comparación al 2-4% de Cd translocado.
- Una gran cantidad de Cd y Pb fueron adsorbidos en la superficie de las raíces de Vetiver expuestas a la concentración de 2.5-15 mgL^{-1} de ambos metales; 33-61 % de Cd y 18-41% de Pb, respectivamente.
- Después de 10 días de exposición de las Espadaña y Vetiver a Pb o Cd (10 μM) en soluciones nutritivas con concentraciones crecientes de Ca (0-1mM), Fe (0-8.31 μM) o Zn (0-1.3 μM) se obtuvo lo siguiente:
 - ✓ *T. latifolia* y *V. zizanioides* removieron eficientemente Pb (86-95%) y Cd (68-96%) de las soluciones adicionadas con nutrientes.
 - ✓ Calcio fue el nutriente que tuvo una mayor influencia en la remoción y acumulación de Cd y Pb por Vetiver y Espadaña. La acumulación de Cd y Pb por las plantas fue inversamente proporcional a la concentración de Ca en las soluciones nutritivas. Este efecto fue más evidente en el caso de Cd.
 - ✓ La variación de las concentraciones de Fe en las soluciones no influyó la captación de Cd y Pb en Vetiver; sin embargo, en Espadaña la acumulación de Pb se incrementó significativamente al disminuir la concentración de Fe en el medio.
 - ✓ No se observó un efecto de Zn sobre la remoción y/o acumulación de Cd y Pb en ambas especies vegetales.
 - ✓ La presencia de Pb y Cd en los medios nutritivos de Vetiver tuvo diferentes efectos sobre la concentración de Ca en las soluciones durante el periodo experimental. Mientras que la concentración de Ca en el medio nutritivo se incrementó en presencia de Pb, disminuyó en las soluciones conteniendo Cd.

- Se aisló y secuenció el cDNA *TPC1* de *V. zizanioides* (*VzTPC1*, No. de Acceso JX897057) y de *T. latifolia* (*TITPC1*, No. de Acceso KF511802).
- Los genes *VzTPC1* y *TITPC1* fueron expresados en las raíces y parte aérea de ambas plantas, sin embargo, sólo fueron observadas variaciones en los niveles de expresión de *TPC1* en las raíces de Espadaña y Vetiver bajo presencia o ausencia de Ca en las soluciones nutritivas.
- La expresión de *VzTPC1* fue dependiente de la exposición de Vetiver a concentraciones crecientes de Ca ($r=1.0$) o Cd ($r=0.9984$). La expresión de *VzTPC1* fue independiente de la exposición de la planta al Pb.
- La expresión de *TITPC1* fue dependiente de la exposición de Espadaña a concentraciones crecientes de Ca ($r=0.8793$), Cd ($r=0.8628$) ó Pb ($r=0.8446$).
- Se logró la obtención de protoplastos de *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides*, sin embargo, se sugieren adecuaciones a la técnica para mejorar el proceso de purificación de los protoplastos.

8. TRABAJO FUTURO

Mediante el presente trabajo se demostró que Ca posee un papel importante en la captación y acumulación de Cd y Pb. Debido a lo anterior, se secuenció para Espadaña y Vetiver el gen que codifica para un canal de calcio recientemente caracterizado en especies mono y dicotiledóneas, el canal dependiente de voltaje, TPC1. El análisis de expresión de este gen de plantas expuestas a Ca, Cd y Pb, nos sugiere que este canal participa en la captación de Cd y Pb; sin embargo, existen varias vías para la caracterización definitiva de este canal como transportador de ambos metales pesados.

Por una vía, mediante pruebas de electrofisiología, específicamente de Patch-Clamp se determinaría el transporte de los iones en las membranas vegetales. Para ello es necesario el desarrollo de una metodología óptima para la obtención de protoplastos de buena calidad. En el presente trabajo se logró el aislamiento de protoplastos de raíces de ambas plantas, sin embargo, adecuaciones a la técnica se sugieren para optimizar el proceso de purificación, una alternativa es el uso de la solución de Histopaque®; además, para descartar una incompleta digestión de la pared celular en las plantas de Vetiver y Espadaña, es posible emplear un fluorocromo específico que se enlaza a celulosa, por ejemplo, Calcofluor White.

Otra vía es la de sobreexpresar el gen *VzTPC1* y *TITPC1* en plantas modelo o en levadura, y determinar las variaciones de la captación de Cd y Pb en los organismos; así mismo, es posible la medición directa de los canales de Ca^{2+} de protoplastos aislados de los organismos transformados empleando la técnica de Patch-Clamp.

Por otra parte, se ha descrito que el canal TPC1 puede encontrarse en el tonoplasto o en la membrana plasmática; de tal manera que un trabajo futuro necesario es la determinación de la ubicación de este canal en las células de Vetiver y Espadaña. Lo anterior puede realizarse mediante la construcción de una proteína de fusión verde fluorescente unida a el canal TPC1 (TPC1-GFP) y analizar su expresión en los tejidos vegetales.

REFERENCIAS

- Abdel-Basset R, Issa AA, Adam MS. 1995. Chlorophyllase activity: effect of heavy metals and calcium. *Photosynthetica*. 31: 421-425.
- Aibibu N, Liu Y, Zeng G, Wang X, Chen B, Song H, Xu L. 2010. Cadmium accumulation in *Vetiveria zizanioides* and its effects on growth, physiological and biochemical characters. *Bioresour Technol*. 101: 6297-6303.
- Alonso-Castro AJ, Carranza-Álvarez C, Alfaro-De la Torre MC, Chávez-Guerrero L, García-De la Cruz RF. 2009. Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Arch Environ Contam Toxicol*. 57: 688-696.
- Amaya-Chávez A, Martínez-Tabche L, López-López E, Galar-Martínez M. 2006. Methyl parathion toxicity to and removal efficiency by *Typha latifolia* in water and artificial sediments. *Chemosphere*. 63:1124-1129.
- Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP. 2001. The wheat cDNA *LCT1* generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiol*. 126: 1061-1071.
- Andra SS, Datta R, Sarkar D, Makris KC, Mullens CP, Sahi SV, Bach SBH. 2009. Induction of lead-binding phytochelatins in vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)]. *J Environ Qual*. 38: 868-877.
- Antosiewicz DM. 1995. The relationships between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in *Biscutella laevigata* and *Silene inflata*. *Environ Exp Bot*. 35: 55-69.
- Antosiewicz DM. 2005. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerancia. *Environ Pollut*. 134: 23-24
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H. 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J*. 20: 171-182.
- Assani A, Haicour R, Wenzel G, Cote F, Bakry F, Foughi-Wehr B, Ducreux G, Aguillar M-E, Grapin A. 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*. 20: 482-488.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environ Chem Lett*. 6: 189-213.
- Bah AM, Dai H, Zhao J, Sun H, Cao F, Zhang G, Wu F. 2011. Effects of cadmium, chromium and lead on growth, metal uptake and antioxidative capacity in *Typha angustifolia*. *Biol Trace Elem Res*. 142: 77-92.
- Becker R, Fritz E, Manteuffel R. 1995. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiol*. 1995:269-275.
- Bernard E, Jimoh A. 2013. Adsorption of Pb, Fe, Cu, and Zn from industrial electroplating wastewater by orange peel activated carbon. *International Journal of Engineering and Applied Sciences*. 4 (2).
- Bienfait HF, Van den Briel W, Mesland-Mul NT. 1985. Free space iron pools in roots. Generation and mobilization. *Plant Physiol*. 78:596-600.

- Bonaventure G, Gfeller A, Proebsting WM, Hörtensteiner S, Chételat A, Martinoia E, Farmer EE, 2007. A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 49: 889-898.
- Bracho M, García-P M, Marcano L, Rodríguez S, Guíñez J, del Campo A. 2008. Obtención y aislamiento de protoplastos de tejido radicular de *Allium cepa*, L. *Ciencia.* 16: 141-147.
- Briat JF, Lobréaux S. 1997. Iron transport and storage in plant. *Trends Plant Sci.* 2: 187-192.
- Broadley MR, Willey NJ, Wilkins JC, Baker AJM, Mead A, White PJ. 2001. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytol.* 152:9-27.
- Boyd C. 1970. Chemical analyses of some vascular aquatic plants. *Arch Hydrobiol.* 67:78-85
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2002. "Biochemistry & Molecular Biology of Plants". Ed. Ac. Soc. Plant Physiology.
- Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa N K, Nakanishi H, Mori S. 2002. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J Exp Bot.* 53: 1677-1682.
- Calheiros CS, Rangel AO, Castro PM. 2007. Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. *Water Res.* 41: 1790-1798.
- Chen Y, Shen Z, Li X. 2004. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Appl Geochem.* 19: 1553-1565.
- Cherian S, Oliveira MM. 2005. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ Sci Technol.* 39: 9377-9390.
- Chiu KK, Ye ZH, Wong MH. 2005. Enhanced uptake of As, Zn y Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. *Chemosphere.* 60: 1365-1375.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H. 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta.* 213: 45-50.
- Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta.* 212: 475-486.
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 12043-12048.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7: 309-315.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116: 1063-1072.
- Cosio C, Martinoia E, Keller C. 2004. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiol* 134: 716-725.
- Crowe AU, Han B, Kermodé AR, Bendell-Young LI, Plant AL. 2001. Effects of oil sands effluent on cattail and clover: photosynthesis and the level of stress proteins. *Environ. Pollut.* 113: 311-322.

- Cunningham S, Berti W. 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol.* 29P: 207-212.
- DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A. 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J Integr Plant Biol.* 50: 1268-1280.
- Danh LT, Truong P, Mammucari R, Tran T, Foster N. 2009. Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: a choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Int J Phytoremediation.* 11: 664-691.
- Drazkiewicz M. 1994. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanisms of action, effects of external and internal factors. *Phytosynthetica.* 30: 321-331.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 5624-5628.
- Ewais EA. 1997. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biol Plant.* 39: 403-410.
- Faheed F, Mazen A, Elmohsen SA. 2013. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. *Turkish Journal of Botany.* 37: 139-152.
- Farzadfar S, Zarinkamar F, Modarres-Sanavy SAM, Hojati M. 2012. Exogenously applied calcium alleviates cadmium toxicity in *Matricaria chamomilla* L. plants. *Environ Sci Pollut Res.* 20:1413-1422.
- Fox TC, Guerinot ML. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 669-696.
- Fu J, Zhou Q, Liu J, Wang T, Zhang Q, Jiang G. 2008. High levels of heavy metals in rice (*Oryza sativa* L.) from a typical E-waste recycling area in southeast China and its potential risk to human health. *Chemosphere.* 71: 1269-1275.
- Furuichi T, Cunningham KW, Muto S. 2001. A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42: 900-905.
- Garcinuño RM, Fernández-Hernando P, Cámara C. 2006. Removal of carbaryl, linuron, and permethrin by *Lupinus angustifolius* under hydroponic conditions. *J Agric Food Chem.* 54: 5034-5039.
- Geerts P, Druart P, Ochatt S, Baudoin J. 2008. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 12: 41-46.
- Guangyu CH, Conner A, Christey M, Fautrier A, Field R. 1997. Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. *International Journal of Plant Sciences.* 158: 537-542.
- Guerinot, ML. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1465: 190-198.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 53: 1-11.
- Hall JL, Williams LE. 2003. Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot.* 54: 2601-2613.
- Hell R, Stephan UW. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta.* 216: 541-551.

- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV. 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116: 1413–1420.
- Hashimoto K, Saito M, Matsuoka H, Iida K, Iida H. 2004. Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene CCH1. *Plant Plant Cell Physiol.* 45: 496-500.
- He JY, Zhu C, Ren YF, Jiang DA, Sun ZX. 2007. Root morphology and cadmium uptake kinetics of the cadmium-sensitive rice mutant. *Biol Plantarum.* 51: 791-794.
- He JY, Ren YF, Wang FJ, Pan XB, Zhu C, Jiang DA. 2009. Characterization of cadmium uptake and translocation in a cadmium-sensitive mutant of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 57: 299-306.
- Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR. 1996. CAX1 and $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 8782-8786.
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J bot* 2012: ID 872875.
- Huang JW, Cunningham SD. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134: 75-84.
- Huang JW, Grunes DL, Kochian LV. 1994. Voltage dependent Ca^{2+} influx into right-side-out plasmamembrane vesicles isolated from wheat roots: characteristic of a putative Ca^{2+} channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:3473-3477.
- Isla MM, Munemasa S, Hossain MA, Nakamura YIC, Murata Y. 2010. Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in *Arabidopsis* stomatal closure. *Plant Cell Physiol.* 51: 302–311.
- Jáuregui-Zúñiga D, Reyes-Grajeda JP, Moreno A. 2005. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Sci.* 168: 1163–1169.
- Kadota Y, Furuichi T, Ogasawara Y, Goh T, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K. 2004. Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogeiin-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 317: 823–830.
- Kim YY, Yang YY, Lee Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol Plant.* 116: 368–372.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot M L, Pakrasi HB. 1999., The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol.* 40: 37-44.
- Kurniawan TA, Chan GYS, Lo WH, Babel S. 2006. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem Eng J.* 118: 83-98.
- Kurtyka R, Małkowski E, Kita A, Karcz W. 2008. Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish J Environ Stud.* 17: 51-56.
- Kurusu T, Hamada H, Koyano T, Kuchitsu K. 2012. Intracellular localization and physiological function of a rice Ca^{2+} - permeable channel OsTPC1. *Plant Signal Behav.* 7: 1–3.

- Kurusu T, Sakurai Y, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K. 2004. Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (OsTPC1) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 693-702.
- Lasat M, Baker A, Kochian L. 1996. Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.* 112: 1715–1722.
- Leura-Vicencio A, Alonso-Castro AJ, Carranza-Álvarez C, Loredó-Portales R, Alfaro De la Torre MC, Gracia-De la Cruz RF. 2013. Removal and accumulation of As, Cd and Cr by *Typha latifolia*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 90: 650-653.
- Liao YC, Chang Chien SW, Wang MC, Shen Y, Seshaiiah K. 2007. Relation between lead uptake by lettuce and water-soluble low-molecular-weight organic acids in rhizosphere as influenced by transpiration. *J Agric Food Chem.* 55: 8640-8649.
- Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, Zhao F, Hawkesford MJ, McGrath SP. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 128: 1359-1367.
- Lyubenova L, Pongrac P, Vogel-Mikus K, Mezek GK, Vavpetic P, Grlj N, Kump P, Necemer M, Regvar M, Pelicon P, Schröder P. 2012. Localization and quantification of Pb and nutrients in *Typha latifolia* by micro-PIXE. *Metallomics.* 4: 333-341.
- Mahamadi C, Nharingo T. 2010. Competitive adsorption of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} ions onto *Eichhornia crassipes* in binary and ternary systems. *Bioresour Technol.* 101:859-864.
- Maine MA, Duarte MV, Suñé NL. 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Wat Res.* 35: 2629-2634.
- Małkowski E, Kurtyka R, Kita A, Karcz W. 2005. Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea Mays* L.). *Pol J Environ Stud.* 14: 203-207.
- Manahan SE. 1994. Environmental chemistry. Lewis Publishers, 6th ed; USA.
- Marchetti C. 2013. Role of calcium channels in heavy metal toxicity. *ISRN Toxicol.* 2013: 1–9.
- Manus HA, Seago Jr JL, Marsh LC. 2002. Epifluorescent and histochemical aspects of shoot anatomy of *Typha latifolia* L., *Typha angustifolia* L., and *Typha glauca* Godr. *Ann Bot.* 90: 489-493.
- Meagher RB. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol.* 3:153-162.
- Meyers DER, Kopittke PM, Auchterlonie GJ, Webb RI. 2009. Characterization of lead precipitate following uptake by roots of *Brassica juncea*. *Environ Toxicol Chem.* 28: 2250-2254.
- Mok MC, Samuelsen AI, Martrin RC, Mok DWS. 2000. Fe(III) reductase, the FRE genes, and FRE-transformed tobacco. *J Plant Nutr.* 23:1941-1951.
- Mori S. 1999. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2:250-253
- Newman LA, Reynolds CM. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr Opin Biotechnol.* 15: 225-230.

- Nuñez-Lopez RA, Vong YM, Ortega-Borges R, Olguín EJ. 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. Ciencia. Julio-Septiembre.
- Odjegba VL, Fasidi IO. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: Implications for phytoremediation. Ecotoxicology. 13: 637-646.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, Sanità di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L. 2008. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. Plant Cell Physiol. 49: 362–374.
- Pavlíková D, Pavlík M, Szákova J, Vasícková S, Tlustos P, Balík J. 2002. The effect of Cd and Zn contents in plants on Fe binding into organic substances of spinach biomass. Rostlinná Vyroba, 48: 531-535.
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 4956-4960.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. Plant J. 32: 539-548.
- Pindel A. 2007. Optimization of isolation conditions of Cymbidium protoplasts. Folia Horticulturae 19: 79-88.
- Pinto AP, Mota AM, de Varennes A, Pinto FC. 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. Sci Tot Environ. 326: 239-247.
- Prasad MNV. 2004. Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. 2a ed. Springer Verlag. Alemania.
- Prasad MNV, Strzalka K. 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers.
- Prasertsongskun S. 2004. Isolation and culture of suspension protoplast of vetiver. Songklanakarin J Sci Technol. 26: 411-416.
- Rascio N, Flavia Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? and what makes them so interesting?. Plant Science. 180: 169-181.
- Repetto, M., (1995), Toxicología avanzada. Ed. Díaz Santos, S.A. Capítulo 14: 562-590.
- Ridge I. 2002. Plants . Oxford University Press.
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M. 1997. Involvement of Ca²⁺ calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. Plant Cell Environ. 20: 600-608.
- Rodecap KD, Tingey DT, Lee EH. 1994. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thailiana* (L.) Heynh. J Environ Qual. 23: 239-246.
- Rodríguez-Serrano M, Martínez-de la Casa N, Romero-Puertas MC, del Río LA, Sandalio LM. 2008. Toxicidad del Cadmio en Plantas. Ecosistemas. 17: 139-146.
- Römheld V, Marschner H. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiol. 80: 175-180.

- Roongtanakiat N, Nirunrach T, Chanyotha S, Hengchaovanich D. 2003. Uptake of heavy metals in landfill leachate by vetiver grass. *Kasetsart J.* 37: 168-175.
- Roongtanakiat N, Tangruangkit S, Meesat R. 2007. Utilization of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) for removal of heavy metals from industrial wastewater. *ScienceAsia.* 33: 397-403.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002. Calcium at the crossroad of signaling. *Plant Cell.* 14: S401-S417.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41: 105-130.
- Sanità di Toppi L, Vurro E, Rossi L, Marabottini R, Musetti R, Careri M, Maffini M, Mucchino C, Corradini C, Badiani M. 2007. Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. *Chemosphere.* 68: 769-780.
- Schecher WD, McAvoy DC. 1994. MINEQL+: a chemical equilibrium program for personal computers. User's manual - Version 3.0. *Environ. Res. Software.* Hallowell.
- Schoch S, Brown J. 1987. The action of chlorophyllase on chlorophyll -protein complexes. *J Plant Physiol.* 129: 242- 249.
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* 17: 35-52.
- Sharma SS, Gaur JP. 1995. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. *Ecol Eng.* 4: 37-43.
- Singh SN, Tripathi RD. 2007. *Environmental Bioremediation Technologies.* Capítulo 11; Springer Berlin Heidelberg.
- Skórzynska-Polit E, Tukendorf A, Selstam E, Baszynsky, T. 1998. Calcium modifies Cd effect on runner bean plants. *Environ Exp Bot.* 40: 275-286.
- Souza LA, Piotto FA, Nogueirol RC, Azebedo RA. 2013. Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. *Sci agric.* 70: 290-295.
- Srivastava J, Kayastha S, Jamil S, Srivastava V. 2008., Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Acta Physiol Plant.* 30: 413-417.
- Taiz L, Zeiger E (2010). *Plant Physiology.* 5a ed. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU.
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM., Schroeder JI. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97 : 4991-4996.
- Trapp S, Karlson, U. 2001. Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *J Soils Sediments.* 1: 1-7.
- Truong P. 2000. Vetiver grass technology for environmental protection. In: *The 2nd Int. Vetiver Conf.: Vetiver and the Environment.*

- Varga A, Garcinuño-Martínez RM, Záray G, Fodor F. 1999. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 54: 1455–1462.
- Volesky B. 2003. Sorption and biosorption. Published by BV Sorbex, Inc; Canada.
- Volke- Sepúlveda T, Velasco JA. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INEGI-SEMARNAT, México.
- Wan G, Najeeb U, Jilani G, Naeem M, Zhou W. 2011. Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napus* L. plants by strengthening their photosynthetic system. *Environ Sci Pollut Res Int.* 18: 1478–1486.
- Wang YJ, Yu JN, Chen, Zhang ZG, Hao YJ, Zhang JS, Chen, SY. 2005. Functional analysis of a putative Ca^{2+} channel gene *TaTPC1* from wheat. *J Exp Bot.* 56: 3051–3060.
- Wei W, Chai T, Zhang Y, Han L, Xu J, Guan Z. 2009. The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Mol Biotechnol.* 41: 15-21.
- White PJ. 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta.* 1465: 171-189.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in Plants. *Ann Bot.* 92: 487-511.
- Xiong ZT. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bull Environ Contam Toxicol.* 60: 285-291.
- Zazo JA, Paull JS, Jaffe PR. 2008. Influence of plants on the reduction of hexavalent chromium in wetland sediments. *Environ Pollut.* 156: 29-35.
- Zhao FJ, Hamon RE, Lombi E, McLaughlin MJ, McGrath. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot.* 53: 535–543.
- Zhu MX, Ma J, Parrington J, Galione A, Evans AM. 2010. TPCs: Endolysosomal channels for Ca^{2+} mobilization from acidic organelles triggered by NAADP. *FEBS Letters.* 584: 1966–1974.

CAPÍTULO 2

Influence of Ca, Fe and Zn on the Cd and Pb uptake by *Vetiveria zizanioides*

Autores: Mayra Cecilia Rodríguez Hernández¹, Imelda Bonifas Arredondo², José Luis Rodríguez Flores Flores³, Ma Catalina Alfaro de la Torre¹

1: Laboratorio de Elementos Traza, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP; **2:** Laboratorio de Biodinámica Celular y Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.; **3:** Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, UASLP.

Influence of Ca, Fe and Zn on the Cd and Pb uptake by *Vetiveria zizanioides*

Resumen

Se estudió la capacidad de Vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.)] en la captación de cadmio (Cd) y plomo (Pb) bajo las condiciones de suficiencia y deficiencia de nutrientes metálicos (Ca, Fe y Zn). Pequeñas plantas de Vetiver colectadas de un sitio no contaminado fueron expuestas durante diez días a soluciones a las que se varió la concentración de Cd (22-133 μM) o Pb (12-72 μM). Nuestros resultados mostraron que Vetiver removió más Pb (97-99%) que Cd (61-88%) y fue capaz de translocar Pb (10-15%) y Cd (2-4%) hacia parte aérea. Además, Vetiver adsorbió más Cd (33-61%) que Pb (18-41%) en las raíces. Además, se estudió la influencia de los metales divalentes Ca, Fe y Zn añadidos como nutrientes en las soluciones de experimentación, en la remoción y acumulación de Cd y Pb por las plantas de Vetiver. Creciendo bajo condiciones de deficiencia de Ca, Vetiver removió y acumuló más Cd que Pb en sus tejidos; nuestros resultados sugieren un mecanismo de transporte similar para Cd y Cd. Las variaciones de concentración de Fe y Zn en las soluciones nutritivas no tuvieron efectos significativos en la acumulación de Pb y Cd por las plantas.

Palabras clave: *Vetiveria zizanioides*, Cadmio, Plomo, Captación

Abstract

We studied the capacity of vetiver grass [*Vetiveria zizanoides* (L.)] to uptake cadmium (Cd) and lead (Pb) under conditions of sufficiency and deficiency of nutrient metals (Ca, Fe and Zn). Small plants of vetiver grass collected from a non-contaminated site were exposed during ten days to solutions with varying concentrations of Cd (22-133 μM) or Pb (12-72 μM). Our results showed that vetiver removed more Pb (97-99%) than Cd (61-88%) and was able to translocate Pb (10-15%) and Cd (2-4%) to shoots. Also, vetiver adsorbed more Cd (33-61%) than Pb (18-41%) in the roots. The influence of divalent metals such as Ca, Fe and Zn, added as nutrients in the exposure solutions, on the removal and accumulation of Cd and Pb by vetiver plants was also studied. Vetiver growing under conditions of Ca deficiency removed and accumulated more Cd and Pb in their tissues; our findings suggested a similar mechanism of transport for Ca and Cd. Iron and Zn had not a significant effect on the accumulation of Pb and Cd by the plants.

Keywords: *Vetiveria zizanoides*, Cadmium, Lead, Uptake

1. INTRODUCTION

Pollutants such as Cadmium (Cd) and Lead (Pb) are released to the environment by mining, wastewater and industry, representing a serious threat to human health (Paradiso et al. 2008; Sharma and Dubey 2005). In addition, these elements can affect plants and animals. Plants exposed to single treatments of toxic concentrations of Cd and Pb showed oxidative stress, growth inhibition, chlorosis, browning of root tips, disorders in photosynthesis, dehydration and nutrient uptake, and inhibition of enzymatic activities (Paradiso et al. 2008; Sharma and Dubey 2005).

Some plants develop tolerance mechanisms to the metals and can be used to clean up contaminated sites. Phytoremediation is simple, environmentally friendly and consumes less energy than other technologies based on physicochemical principles. Plants suitable for phytoremediation should possess multiple traits. They must be fast-growing, have high biomass, deep roots, be easy to harvest and should tolerate and accumulate a range of heavy metals in their aerial and harvestable parts (Clemens et al. 2002).

Vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, syn. *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] is a monocotyledonous plant belonging to the Poaceae family and was first used for soil and water conservation practices (Srivastava et al. 2008; Danh et al. 2009). Interest in this grass has increased in recent years owing to its unique morphological, physiological and ecological characteristics such as its massive and deep root system, and its tolerance to a wide range of adverse climatic and edaphic conditions, and to the presence of toxic substances (Truong 2000). Vetiver has found application in the phytoremediation of organic and inorganic pollutants and it has shown varying tolerance to metals including Pb, Zn, Fe, Cd, Cu, Mn, Cr, Hg, Ni and metalloids such as Se and As (Roongtanakiat et al. 2007; Danh et al. 2009; Datta et al. 2011).

There has been demonstrated that the removal and accumulation of heavy metals are close-related with the acquisition and movement of nutrients (Kim et al. 2002; Lombi et al. 2002; Antosiewicz (2004). Based on the understanding of the relationships between nutrients and HMs uptake by a plant we can further predict and promote their removal and accumulation. Also, these data allow modeling the responses of a plant communities exposed to different physicochemical characteristics in the environment. From the biotechnological point of view, this is important because we can improve phytoremediation methods to clean polluted water and soils.

Among the processes involved in phytoremediation, membrane transport systems likely play a central role due to their participation in the process of translocation to shoots and in the regulation and storage of metals in cell walls or in organelles such as vacuoles, as well as in epidermal cells or trichomes (Hall et al. 2003; Cherian and Oliveira 2005). However, the studies based on the understanding of molecular and physiological mechanism of uptake and accumulation of heavy metals (HM) have been done employing plants with agronomic interest (Cohen, et al., 1998; He et al., 2009) and in plant classified as hyperaccumulators (Lombi et al., 2002; Cosio et al., 2004). Fu et al (2008) demonstrated that there is a potential risk to human health of edible plants (like rice) growing in a contaminated site. Also, the majority of hyperaccumulators plants produce little biomass and are slow-growing plants, which makes it unfeasible to use these species in phytoremediation (Souza et al. 2013). Vetiver is a potential alternative plant to investigate the process involved in phytoremediation because this plant possesses the majority of the required characteristics for this purpose.

High levels of Pb and Cd are toxic to the growth of plants and probably these do not have transporters specialized for the uptake of heavy metals, as they do not require them for growth. Therefore, those metals are likely to enter into plant cells via transporters for essential cations like Ca, Fe and Zn because the chemical properties of those divalent cations are analogous (Cohen et al. 1998; Clemens et al. 1998; Hart et al. 1998; Papoyan et al. 2007).

Kim et al. (2002) and He et al. (2009) suggest that the uptake of Cd and Pb by rice (*Oryza sativa* L.) plants is regulated by Ca transporters or channels in the root cell plasma membrane. The application of putative calcium channels inhibitors (like La) suppressed the inhibitory effect of Cd in epidermal strip experiments, suggesting that Cd could enter the guard cell through calcium channels (Perfus-Barbeoch et al. 2002). Cd decreases influx into roots and transport from roots to shoots of Zn, Fe, Mn and Ca in ryegrass (*Lolium perenne* L.) (Yang et al. 1996). In addition, the mineral status of plants has been demonstrated to influence the influx of minerals in the roots. Studies have shown that plant accumulation of Fe and other metals such as Cd, Mg and Zn can be enhanced under Fe deficiency (Rodecap et al. 1994; Clemens et al. 1998; Cohen et al. 1998; Lombi et al. 2002). Antosiewicz (2004) found that in tomato, maize and rye, the system of Pb uptake is differentially regulated by the content of Ca in the medium. Kim et al. (2002) reported that Ca or Mg both blocked Cd transport into rice roots. In cucumber plants, exposition to Cd

hampers Ca, Fe and Zn accumulation in the roots. In addition, Pb contamination leads to a drastic reduction of the Ca accumulated in the roots (Varga et al. 1999). There are several studies about the relationship of Pb and Cd uptake with different nutrient ions in different plant species. However, in general, the trans-plasma membrane metal transport mechanisms in higher plants, specifically in plants suitable for phytoremediation, are not completely understood.

Based on the findings above, the goal of this study was to investigate the role of the essential divalent cations, specifically Ca, Fe and Zn, on the removal and accumulation of Cd and Pb by Vetiver plants exposed to hydroponic solutions of these toxics.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Plants of vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.)] were collected in the field. The plants were grown in non-polluted soils, washed using tap water, maintained in a greenhouse at $25\pm 2^\circ\text{C}$ and 60% of relative humidity, and grown under natural daylight. For propagation, the sprouts were separated and planted in containers filled with a general purpose peat-based growing medium (Pro-Mix BX). In the experiments described below, vetiver plants ($n=3$) with similar fresh weight (21.1 ± 3.9 g/plant) and length (roots: 31.1 ± 7.7 cm; shoots: 32 ± 2.4 cm) were used.

2.2 Experimental design

The capacity of vetiver to remove Cd and Pb was studied following two experimental designs. Plants ($n=3$) of similar weight and length were exposed during 10 days to single solutions of Cd and Pb at concentrations varying from 22 to 133 μM of Cd and 12 to 72 μM of Pb, respectively (0 to 15 mgL^{-1} of Cd and Pb), in a buffered solution at pH 5.7-6.0 (2 mM MES buffer). The final volume for each experimental unit was 300mL. The ionic strength (I) was adjusted to 0.01 M with KNO_3 . Metal solutions were prepared using $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ or $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ salts (Fluka Chemical Co., Milwaukee, WI). Previously, plants were acclimated to hydroponic conditions during 5 day; the pH and the ionic strength were adjusted as indicated above. Samples of the experimental solutions were collected at 0, 1, 3, 5, 7 and 10 days. Metals in the samples collected from the experimental solutions were determined by Atomic Absorption Spectrophotometry using an air-acetylene flame (AAS-F; Varian

SpectrAA 220FS). In addition, the Cd and Pb concentrations tested in this work exceed the maximum concentrations permitted by Mexican laws for agricultural use (NOM-CCA-032-ECOL/1993; 0.01 mgL^{-1} for Cd and 5 mgL^{-1} for Pb). The effect of metals (Cd, Pb) on the growth of vetiver was followed by measuring the chlorophyll a/b ratio (Bruinsma 1963), leaf elongation, and the growth index (GI; biomass ratio at 0 and 10 days, dry weight).

The second phase was intended to analyze the effect of Ca, Fe and Zn on the removal and accumulation of Cd and Pb by vetiver. The plants were acclimated during ten days, as indicated above. At 0 d, the vetiver plants ($n=3$) were placed in black polyethylene glass beakers with 300mL of a nutrient solution containing 1 mM KNO_3 , 50 μM KCl, 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 8.31 μM FeSO_4 , and 1.3 μM $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$. Six days later, the nutrients solution was replaced 300mL with another one containing 1 mM KNO_3 and 50 μM KCl supplemented with different concentrations of Ca (0, 0.33, 0.67, 1 mM), Fe (0, 2.77, 5.54, 8.31 μM) or Zn (0, 0.43, 0.87, 1.3 μM). These concentrations were designed according to the composition of nutrient solutions reported for plants (Cohen et al. 1998; Hart et al. 1998). The experimental design was completely random factorial, where the concentration of one metal (Ca, Fe or Zn) varied while the other two were kept constant. The calcium concentrations used were 0, 0.33, 0.67 and 1 mM with 8.31 μM Fe and 1.3 μM Zn. When Fe concentrations varied, Ca remained at 1 mM and Zn at 1.3 μM ; in the case of Zn, Ca was 1mM and Fe was 8.31 μM . The solutions were replaced on day 10 with 300mL fresh solutions containing Ca, Fe and Zn at the same concentrations as those used at day 6, but now the solutions were supplemented with 10 μM Cd or 10 μM Pb. The plants were exposed to the solutions containing Cd or Pb during 10 d. The pH of the solutions was buffered to 5.7-6 with 2 mM MES. Samples of the experimental solutions were taken at 0, 1, 5 and 10 days. Through chlorophyll *a*, *b*, *a/b* ratio parameters we determined that the experimental solutions did not affect the growth of the plants during the acclimation and experimental periods (data not shown).

Samples of the experimental solutions (5 mL each) were taken in triplicate, acidified with 0.02 N HNO_3 (20 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Concentrations of Cd and Pb were determined by Atomic Absorption Spectrophotometry using an air-acetylene flame AAS-F.

Experimental solutions were modelled to predict Cd and Pb speciation, and to verify that these metals were in their dissolved form and available for the plants. For this purpose, the chemical model used was MINEQLver.4.5 (Schecher and McAvoy 2003). In addition, the nutrient solutions were centrifuged (3 000 rpm, 10 min) to remove any precipitate; Pb and

Cd were analyzed by AAS-F; the results indicated that there was no precipitation of metals in the nutrient solutions. Controls tests were simultaneously performed by adding metal solutions to polyethylene bottles without plants to verify the adsorption of metals to the wall of the bottles.

2.3 Removal and distribution of metals in the plants

As described by Zhu et al. (1999), elements such as Cd and Pb can partially bind to negatively charged sites in roots. The metals adsorbed by the plants can be determined by using HNO₃. After 10 days of exposure, plants were removed from the solutions, rinsed using 10% HNO₃ and washed with deionized water to remove any metal adsorbed to the roots (Gardea-Torresdey et al. 2005). After this procedure, plants were cut to obtain the roots and leaves as separate samples; these were oven-dried (18h at 70°C) and acid-digested to determine the fraction of Cd and Pb accumulated by vetiver. Blanks, plant samples and the reference plant material *Lagarosiphon major* (CBR, Reference material No. 60) were digested by triplicate using HNO₃ (4 d, 100 µL / 2 mg of sample) and 30 % H₂O₂ (1 d, 0.5 mL). The detailed procedure was reported by Carranza-Álvarez et al. (2008) and blanks were analyzed by triplicate to determine the accuracy of the determinations.

Metals were determined in the HNO₃ solutions (adsorbed fraction) and in the solutions from digested plant samples (accumulated fraction) by AAS-F or by using a graphite furnace (AAS-GF; Varian-SpectrAA 220Z). The recovery of Cd and Pb in the reference digested plant sample ranged between 90% and 110%. The detection limits for the analytical method were 0.01 and 0.02 mg/kg for Cd and Pb, respectively.

Quality control for the analytical procedures was assured by the analysis of a reference water sample for trace elements (TM-DWS, National Water Research, Canada); in the reference water the recovery was 100 ± 15%.

2.4 Statistical analysis

Comparison between treatments was done using ANOVA, followed by Tukey's multiple range tests. Results were considered significantly different when the calculated p-values were < 0.05. All calculations were done employing the GraphPad InStat™ Software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Capacity of removal and accumulation of Cd and Pb by Vetiver

The concentration of Pd and Cd in the solution during the experimental period was monitored and the results are shown in Figure 1. At day 1 of exposition to the heavy metals, vetiver was able to remove 61-81 % of cadmium and 93-99% of lead from the solutions, attaining a total removal at day 10 of 71-85% of cadmium and 97-99% of lead without showing symptoms of toxicity (Table 1). Importantly, The growth (fresh weight) and leaf elongation at the end of the experiment were significantly greater than the values at the beginning of the experiment ($p < 0.05$, data not shown), while chlorophyll did not show significant differences at the end and the beginning of the experiments (Table 1).

According to Figure 1B, there was no significant difference in the Pb removal between the different treatments tested during the experimental period, while in the case of Cd, the removal was concentration-dependent (Fig.1A). This behavior of Cd is in agreement with Hart et al. (1998) and Zhao et al. (2002); they also reported that Cd uptake could be described by Michaelis-Menten kinetics, a process exhibiting saturable kinetics; they suggest that Cd is taken up via a carrier-mediated system. Several reports have mentioned that the kinetics of Cd uptake have shown there are two processes involved, the first one fast and the second slower. The initial rapid component represents Cd accumulation in the apoplasm, and the slower linear phase of accumulation is due to Cd transport into the symplasm (Cohen et al. 1998; Hart et al. 1998; Lombi et al. 2002; He et al. 2009).

Vetiver plants accumulated 1.5-2.4 times more Pb than Cd and the results show a significant difference between the heavy metals accumulated ($p < 0.05$) (Figure 2). Additionally, vetiver plants concentrated both these metals significantly more in roots than in shoots, and a greater mass content of Pb was found in shoots: ($p < 0.05$) 10 – 15 % of Pb compared with 2 - 4 % of Cd of the total heavy metals accumulated.

Aibibu et al. (2010) reported that the accumulation of Cd in vetiver roots reaches 96% of the total metal taken up with the 30 mgL⁻¹ Cd treatment. Some studies also reported a higher accumulation of Pb in the roots than in the shoots of vetiver plants (Chen et al. 2004; Roongtanakiat et al. 2007, Rotkittikhun et al. 2007; Andra et al. 2009; Danh et al. 2009).

The level of plant tolerance to heavy metals is related to the balance between the rates at which metal ions are taken up and the efficiency with they are detoxified within the plant

(Hall 2003). Plant cells have developed different strategies to cope with HM stress and to limit its toxic effects. Retention or immobilization of a high amount of Cd in the root tissue, typical of several plants, can be regarded as an important protection mechanism against the diffusion of this heavy metal through the plants, including vetiver plants (Andra et al. 2009; Aibibu et al. 2010). Andra et al. (2009) reported an accumulation of Pb in roots and shoots of Pb in vetiver, mainly in roots. The high tolerance observed was attributed to the formation of phytochelatins (PCn) and Pb-PCn complexes within the plant tissues, as determined by electrospray mass spectrometry (ES-MS) and Pb mass isotopic patterns. In internal HM detoxification, several compounds also phytochelatins may chelate with HM in the cytosol, where the ions can be transformed into a nontoxic or less toxic form. Carboxylic and amino acids, such as citrate, malate, and oxalate, histidine (His) and nicotianamine (NA), as well as phosphate derivatives (phytate), are potential ligands for HMs and are found to play a role in tolerance and detoxification (Hossain et al. 2012). Jócsák et al. (2005) found that oxalate and fumarate increased by 5-6 fold under Ni exposition also take part in nickel complexation mechanisms in the grass barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). Harrington et al. (1996) demonstrated that the levels of malic acid increased on exposure to zinc in *Festuca rubra*.

The results indicated that vetiver adsorbed Pb and Cd in a concentration-dependent way (Figure 2). The greatest amount of Cd taken up was found in the adsorbed and root fractions and no significant differences were observed between both fractions by treatment ($p > 0.05$); while in the case of Pb, a significantly greater amount was determined in the root fraction, followed by the adsorbed fraction ($p < 0.05$). In addition, we found that to lesser concentration of Pb in the solution a greater percentage of this metal was found in shoots (19% under 12 μM treatment compared to 11% under 72 μM treatment). Vetiver probably avoids the translocation of Pb as a defense mechanism against Pb toxicity in shoots. In general, the selectivity of the barrier of root-to-shoot transport is attributed to the existence of transporters present in the endodermis and in xylem parenchyma involved in xylem loading (White et al. 2002). It was recently reported that root-to-shoot translocation of Cd could be enhanced by the overexpression of AtHMA4, a plasma membrane heavy metal ATPase that mediates Cd efflux from plant cells and might be involved in xylem metal loading in roots of *Arabidopsis thaliana* (Verret et al. 2004).

The results showed a great amount of Pb and Cd adsorbed to the root surface, however, the fraction of Cd adsorbed was greater than the fraction of Pb adsorbed, 33 – 61% of Cd

and 18 – 41% of Pb, respectively (Figure 2). The high affinity of divalent cations for the fixed negative charges in the cell wall has been reported before (Lasat et al. 1996; Hart et al. 1998), with the majority of the divalent metal cations residing in the apoplast of roots exposed to the metals via nutrient or soil solution. The fraction adsorbed and then removed from the surface of the roots in this work most likely consists of ionic interaction of heavy metals with carboxyl and/or sulfhydryl groups contained in cell wall constituents such as hemicelluloses and cell wall proteins (Cohen et al. 1998). Małkowski et al. (2005) conclude that Pb competes for the binding sites on the cell wall, in contrast with Cd which competes for the transport systems across the plasma membrane in maize seedlings. Nevertheless, the present work suggests a high affinity of Cd by the negative charges in the cell wall of vetiver roots.

Although vetiver is not a hyperaccumulator plant, very few plants in the literature have a wide range of tolerance to extremely adverse climate and growing medium (soil, sand, and tailings) conditions, all in one plant, as vetiver has (Srivastava et al. 2008; Danh et al. 2009). Chen et al. (2000) found that the total above ground uptake of Cd by vetiver was even greater than that of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, owing to the high biomass of the former.

3.2 Influence of Ca, Fe and Zn on Pb and Cd removal and accumulation by Vetiver plants

We analyzed the influence of dissolved Ca, Fe and Zn on the removal and uptake of Cd and Pb by vetiver. The results shown in Figure 3 indicate that the accumulation of metals (Cd or Pb) decreases with an increasing Ca concentration in the nutrient medium. Cd accumulation by vetiver tissues was Ca concentration-dependent ($p < 0.05$; see Fig. 3B). In a similar way, the accumulation of Pb by vetiver showed a tendency Ca concentration-dependent; nevertheless, the results showed no statistically significant differences ($p > 0.05$; see Fig. 3A). Vetiver accumulated higher Cd concentrations when exposed to solutions without Ca; in the same way the absorbed fraction of Cd to the roots decreased when Ca increased in the solutions ($p < 0.05$; see Fig. 3B). Linear regression was done and the correlation coefficient (r) between total accumulation of Cd and Pb in extra- and intercellular spaces (HM adsorbed and content in roots) and the initial concentration of Ca in the experimental solution were 0.9618 and 0.8586 for Cd and Pb treatments respectively. The high correlations observed showed that the heavy metal accumulation

depends of the concentration of Ca in the growth medium, specific more Cd than Pb accumulation. Corresponding slopes (m) of the Cd and Pb treatments were -1.3083 ± 0.332 and -0.1333 ± 0.05 , respectively, therefore the rate of Cd uptake is more dependent of the Ca content in the growth medium than Pb. Calcium in the growth medium could inhibit the Cd and Pb accumulation by a decrease the number of negative charges at the cell surface and thus displace Cd (Choi et al. 2001; Małkowski et al. 2005; Wan et al. 2011). Cation binding sites within a pore have a higher affinity for Ca than for other divalent metals. Thus, in the presence of Ca concentrations, this metal preferentially occupies these sites and restricts the permeability to other cations (White 2000; Sanders et al. 2002). On the other hand, Kim et al. (2002) suggested that Pb and Cd competed with Ca for transport proteins, some studies support this hypothesis (Huang and Cunningham 1996; Clemens et al. 1998; Sunkar et al. 2000; Wojas et al. 2007).

The calcium content in treatments during the experimental period was monitored and the respective movement of Ca was calculated (Figure 4). An increase on Ca concentration at day 1 in Cd and Pb treatments was observed at day 1 of exposition (Figure 4 A,B). The effect observed indicate an initial common mechanism for HM-plant interactions, probably a cation exchange process at the apoplast and leading Ca releasing from cell walls (Lasat et al. 1996; Hart et al. 1998, White and Broadley, 2003). [Ca] has been correlated with the cation exchange capacity (CEC) of plant roots. The CEC has been attributed to the free carboxyl groups of galacturonic acids of the cell wall pectins in the middle lamella (White and Broadley, 2003). Mata et al. (2009) reported the affinity of Pb, Cu and Cd for the alga *Fucus vesiculosus* and confirmed that carboxyl groups were the main groups involved in the metal uptake.

These is in accord with the results shown in Figure 1 where a great percentage of Cd and Pb were removed from solutions at the first day. However different effects were observed from day 5 to 10 in Cd and Pb treatments and different mass movement of calcium occurred under Pb or Cd exposure (Figure 4 C, D) . In the case of Pb treatments an increase of the Ca movement occur during the experimental period (Figure 4 C); while the opposite occurred for Cd treatments, where a decrease on Ca concentration was observed (Figure 4D).The above indicate a different mechanism of HM-plant interaction. The plant kingdom exhibits a varied assortment of patterned mineralised structures formed by cells, including deposits of calcium oxalate (CaOx), CaOx crystals are by far the most prevalent and widely distributed mineral deposits throughout the families of higher plants (Faheed et

al., 2013). It has been reported a decrease on calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris* under Pb and Zn exposition (Jáuregui-Zúñiga et al., 2005). Therefore, the increase in the Ca concentrations under Pb treatment could be a consequence of the calcium oxalate dissociation and liberation of oxalate for HM complexation and detoxification. These results could explain the great Pb content in roots and shoots (Figure 2 and 3).

We observed two different effects under Cd treatments; first the decrease on Ca movement in solutions under the overall Cd treatments (the opposite effect to Pb) (Figure 4 D); these effect could be due to Cd internalization to cells leading to Ca re-adsorb to free spaces on cell wall. In the case of Cd, phytochelatin have been reported like a principal mechanism of Cd detoxification in plants (Hossain 2012). Second, a negative correlation was observed between the final concentration of Ca in the solution and the Ca concentration added to solutions ($m = -0.553 \pm 0.039$, $r^2 = 0.99$); the final Ca concentration in solutions with a high initial Ca concentration content was 5.3 times lesser than the control (no Ca added). The high uptake of Ca under Ca exposition in Cd treatments explain the decrease in Cd uptake observed in Figure 3. The above indicate a high interaction between Ca and Cd for their uptake in vetiver plants.

There is relation between Fe concentrations in the solutions and the Cd or Pb accumulated at the root of vetiver because the concentration of Cd and Pb increased when Fe increased in the solution, however, statistical analysis did not show a significant effect (Figure 3 C and 3D). No significant differences were observed in the metals accumulated by the plant in treatments with Zn (Figure 3 D, F). However, further studies are needed regarding the role of Fe and Zn on Cd and Pb removal by vetiver. Some studies have reported a competition between Zn and Cd uptake by wheat and barley plants, indicating that high concentrations of Zn inhibit Cd uptake and accumulation, and viceversa (Hart et al. 2002; Wu et al. 2003). These interactions could be explained by simple ionic competition between Zn and Cd for the heavy metal binding site in the transport proteins (Hart et al. 2002). In this work, the low concentrations of Zn employed had probably no effect on Cd and Pb uptake. It would be interesting to analyze the competition of these heavy metals with Zn under equivalent concentration conditions.

4. CONCLUSIONS

Vetiver grass was able to grow in Cd and Pb solutions at the maximum concentrations employed without showing any sign of toxicity. Vetiver removes Pb and Cd effectively from solutions and to absorb these metals into its tissues; also, Pb was largely translocated to shoots. Calcium was the nutrient element that had the greater influence on the accumulation of Pb and Cd by vetiver. This effect was more evident in the case of Cd. These data provide essential information into phytotechnologies implementation in order to optimize the phytoremediation process in a specific site.

Acknowledgements

We thank INIFAP, Huichihuayan, SLP, Mexico for providing vetiver plants. This work was carried out with financial support from FOMIX-CONACYT project 90228 and project PROMEP-RED for the UASLP-CA-37. MCRH was awarded a graduate fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) no. 201755, with the support of the Multidisciplinary Program of Graduate Studies in Environmental Sciences (PMPCA), UASLP.

References

- Aibibu N, Liu Y, Zeng G, Wang X, Chen B, Song H, Xu L. 2010. Cadmium accumulation in *vetiveria zizanioides* and its effects on growth, physiological and biochemical characters. *Bioresour Technol* 101: 6297–6303.
- Andra SS, Datta R, Sarkar D, Makris KC, Mullens CP, Sahi SV, Bach SBH. 2009. Induction of lead-binding phytochelatins in vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)]. *J Environ Qual* 38: 868–877.
- Antosiewicz D.M., Henning J. 2004. Overexpression of *LCT1* in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ Pollut* 129: 237–245.
- Bruinsma J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem Photobiol* 2: 241–249.
- Carranza-Álvarez C, Alonso-Castro AJ, Alfaro de la Torre MC, García de la Cruz RF. 2008. Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, Mexico. *Water Air Soil Pollut* 188: 297–309.
- Chen HM, Zheng CR, Tu C, Shen ZG. 2000. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 41: 229–234.
- Chen Y, Shen Z, Li X. 2004. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Appl Geochem* 19: 1553–1565.
- Cherian S, Oliveira MM. 2005. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ Sci Technol* 39: 9377–9390.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H. 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213: 45–50.
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI. 1998. The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12043–12048.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 7: 309–315.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian LV. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* 116: 1063–1072.
- Cosio C, Martinoia E, Keller C. 2004. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiol* 134: 716–725.
- Danh LT, Truong P, Mammucari R, Tran T, Foster N. 2009. Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: A choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Int J Phytoremediation* 11: 664–691.
- Datta R, Quispe MA, Sarkar D. 2011. Greenhouse study on the phytoremediation potential of vetiver grass, *Chrysopogon zizanioides* L., in arsenic-contaminated soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 86: 124–128.
- Faheed F, Mazen A, Elmohsen SA. 2013. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate formation in some plants. *Turk J Bot* 37: 139-152.

- Fu J, Zhou Q, Liu J, Wang T, Zhang Q, Jiang G. 2008. High levels of heavy metals in rice (*Oryza sativa* L.) from a typical E-waste recycling area in southeast China and its potential risk to human health. *Chemosphere* 71: 1269-1275.
- Gardea-Torresdey JL, de la Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Cruz-Jimenez 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.
- Hall JL, Williams LE. 2003. Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* 54: 2601–2613.
- Harrington CF, Roberts DJ, Nickless G. 1996. The effect of cadmium, zinc, and copper on the growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Can J Bot* 74: 1742-1752.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV. 2002. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiol Plant* 116: 73–78.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV. 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol* 116: 1413–1420.
- He JY, Ren YF, Wang FJ, Pan XB, Zhu C, Jiang DA. 2009. Characterization of cadmium uptake and translocation in a cadmium-sensitive mutant of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Arch Environ Contam Toxicol* 57: 299–306.
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J bot* 2012: ID 872875.
- Huang JW, Cunningham SD. 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol* 134: 75–84.
- Jáuregui-Zúñiga D, Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R, Moreno A. 2005. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Physiol* 162: 1183-1187.
- Jócsák I, Végvári G, Droppa M. 2005. Heavy metal detoxification by organic acids in barley seedlings. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 99-101.
- Kim YY, Yang YY, Lee Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol Plant* 116: 368–372.
- Lasat M, Baker A, Kochian L. 1996. Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol* 112: 1715–1722.
- Lombi E, Tearall K, Howarth J, Zhao FJ, Hawkesford M, McGrath S. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 128: 1359–1367.
- Małkowski E, Kurtyka R, Kita A, Karcz W. 2005. Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea Mays* L.). *Pol J Environ Stud* 14: 203–207.
- Mata YN, Blázquez ML, Ballester A, González F, Muñoz JA. Biosorption of cadmium, lead and copper with calcium alginate xerogels and immobilized *Fucus vesiculosus*. *J Hazard Mater* 163: 555-562.

- Papoyan A, Piñeros M, Kochian LV. 2007. Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175: 51–58.
- Paradiso A, Berardino R, de Pinto MC, Sanita di Toppi L, Storelli MM, Tommasi F, De Gara L. 2008. Increase in ascorbateglutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant Cell Physiol* 49: 362–374.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32: 539–548.
- Rodecap KD, Tingey DT, Lee EH. 1994. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J Environ Qual* 23: 239–246.
- Roongtanakiat N, Tangruangkiat S, Meesat R. 2007. Utilization of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) for removal of heavy metals from industrial wastewater. *ScienceAsia* 33: 397–403.
- Rotkittikhun P, Chaiyarat R, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Baker AJM. 2007. Growth and lead accumulation by the grasses *Vetiveria zizanioides* and *Thysanolaena maxima* in lead contaminated soil amended with pig manure and fertilizer: a glasshouse study. *Chemosphere* 66: 45–53.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002. Calcium at the crossroad of signaling. *Plant Cell* 14: S401–S417.
- Schecher WD, McAvoy DC. 2003. MINEQL+: a chemical equilibrium program for personal computers. User's manual. Version 3.0. Environ Res Software, Hallowell
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 35–52.
- Skórzyńska-Polit E, Tukendorf A, Selstam E, Baszyński T. 1998. Calcium modifies Cd effect on runner bean plants. *Environ Exp Bot* 40: 275–286.
- Souza LA, Piotto FA, Nogueirol RC, Azebedo RA. 2013. Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. *Sci agric* 70: 290-295.
- Srivastava J, Kayastha S, Jamil S, Srivastava V. 2008. Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Acta Physiol Plant* 30: 413–417.
- Sunkar R, Kaplan B, Bouche N, Arazi T, Dolev D, Talke IN, Maathius M, Sanders D, Bouchez D, Fromm H. 2000. Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J* 24: 533–542.
- Truong P. 2000. Vetiver grass technology for environmental protection. In: *The 2nd Int. Vetiver Conf.: Vetiver and the Environment*.
- Varga A, Garcinuño-Martinez RM, Záray G, Fodor F. 1999. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 54: 1455–1462.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richard P. 2004. Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* 576: 306–312.

- Wan G, Najeeb U, Jilani G, Naeem M, Zhou W. 2011. Calcium invigorates the cadmium-stressed *Brassica napus* L. plants by strengthening their photosynthetic system. *Environ Sci Pollut Res Int* 18: 1478–1486.
- White PJ. 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 171–189.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92: 487-511.
- White PJ, Whiting SN, Baker AJM, Broadley MR. 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol* 153: 199–211.
- Wojas S, Rusczyńska A, Bulska E, Wojciechowski M, Antosiewicz DM. 2007. Ca^{2+} -dependent plant response to Pb^{2+} is regulated by *LCT1*. *Environ Pollut* 147: 584–592.
- Wu F, Zhang G, Yu J. 2003. Interaction of cadmium and four microelements for uptake and translocation in different barley genotypes. *Commun Soil Sci Plant Anal* 34: 2003–2020.
- Yang X, Baligar VC, Martens DC, Clark RB. 1996. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. *J Plant Nutr* 19: 643-656.
- Zhao FJ, Hamon RE, Lombi E, McLaughlin MJ, McGrath. 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 53: 535–543.
- Zhu YL, Zayed AM, Qian JH, de Souza M, Terry N. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J Environ Qual* 28: 339–344.

TABLES

Table 1.

Growth index (GI), leaf elongation (LE) and chlorophyll a/b ratio (Chl a/b ratio) of *V. zizanioides* plants exposed for 10 days to different treatments of Pb and Cd. ($n = 3 \pm SD$)

Treatment		Chl a/b ratio		
Pb (μM)	GI	LE (cm)	Start	Final
Control	1.22 \pm 0.15	13.5 \pm 4.88	2.54 \pm 0.22	2.40 \pm 0.33
12	1.18 \pm 0.12	19.2 \pm 8.03	2.08 \pm 0.17	2.45 \pm 0.67
24	1.16 \pm 0.12	15.5 \pm 7.76	1.91 \pm 0.27	1.75 \pm 0.15
48	1.13 \pm 0.06	22.2 \pm 1.44	2.32 \pm 0.43	2.24 \pm 0.39
72	1.27 \pm 0.07	11.1 \pm 5.54	2.17 \pm 0.21	1.96 \pm 0.23
Cd (μM)				
Control	1.17 \pm 0.14	13.5 \pm 3.07	2.15 \pm 0.08	2.39 \pm 0.75
22	1.06 \pm 0.08	12.3 \pm 5.77	2.59 \pm 0.40	3.15 \pm 0.93
44	1.15 \pm 0.07	13.6 \pm 2.11	2.34 \pm 0.88	1.57 \pm 0.23
89	1.07 \pm 0.04	12.0 \pm 7.00	2.28 \pm 0.95	1.40 \pm 1.10
133	1.14 \pm 0.05	10.7 \pm 5.77	2.45 \pm 0.63	2.11 \pm 1.00

The values of GI and LE did not differ statistically with control; the final values of Chl a/b ratio did not differ statistically with Chl a/b ratio at start of each treatment ($P < 0.05$).

Figure legends

Figure 1. Removal of Cd (A) and Pb (B) by *V. zizanioides* exposed during ten days to single solutions of those metals. The data correspond to the mean \pm SD of experiments done in triplicate.

Figure 2. Distribution of Cd (A) and Pb (B) between the solution and the plant tissues of *V. zizanioides*. Plants were exposed during ten days to the indicated concentrations in single treatments with Cd and Pb. The results are presented as the mean \pm SD of experiments done in triplicate.

Figure 3. Influence of Ca, Fe and Zn concentrations on the distribution of Pb (A, C, E) and Cd (B, D, F) by *V. zizanioides*. Plants were exposed during 10 days to a nutrient solution containing 10 μ M Pb or 10 μ M Cd. After ten days of exposure time, plant tissues were dried and digested for further analysis of metals (AAS-F). The results are presented as the mean \pm SD of experiments done in triplicate. Asterisks indicate a significant difference respect to controls (0 M of Ca, Fe or Zn) according to the Tukey test ($p < 0.05$).

Figure 4. Variation of Ca content in growth solutions during the experimental period. Calcium concentration in Pb (A) and Cd (B) solutions. Movement of Ca under Pb (C) and Cd (D) exposure.

FIGURE 1

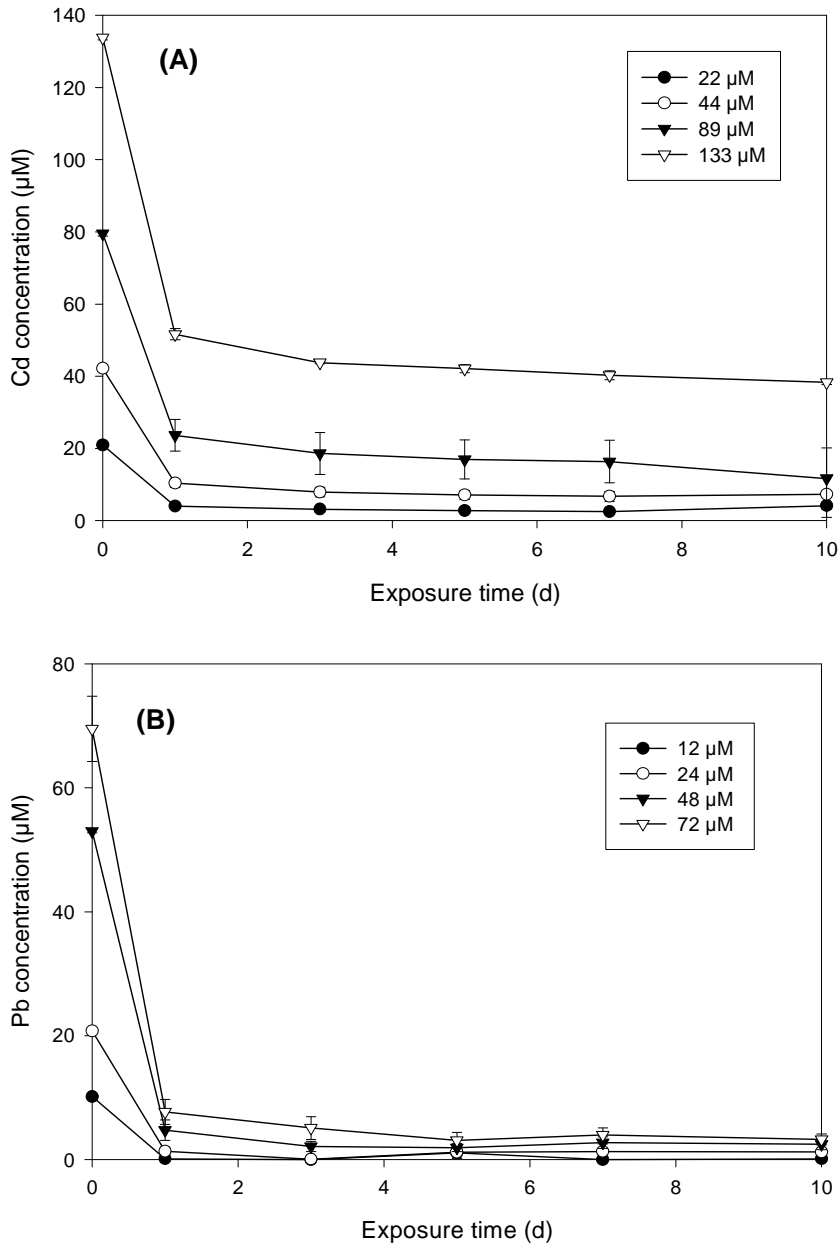


FIGURE 2

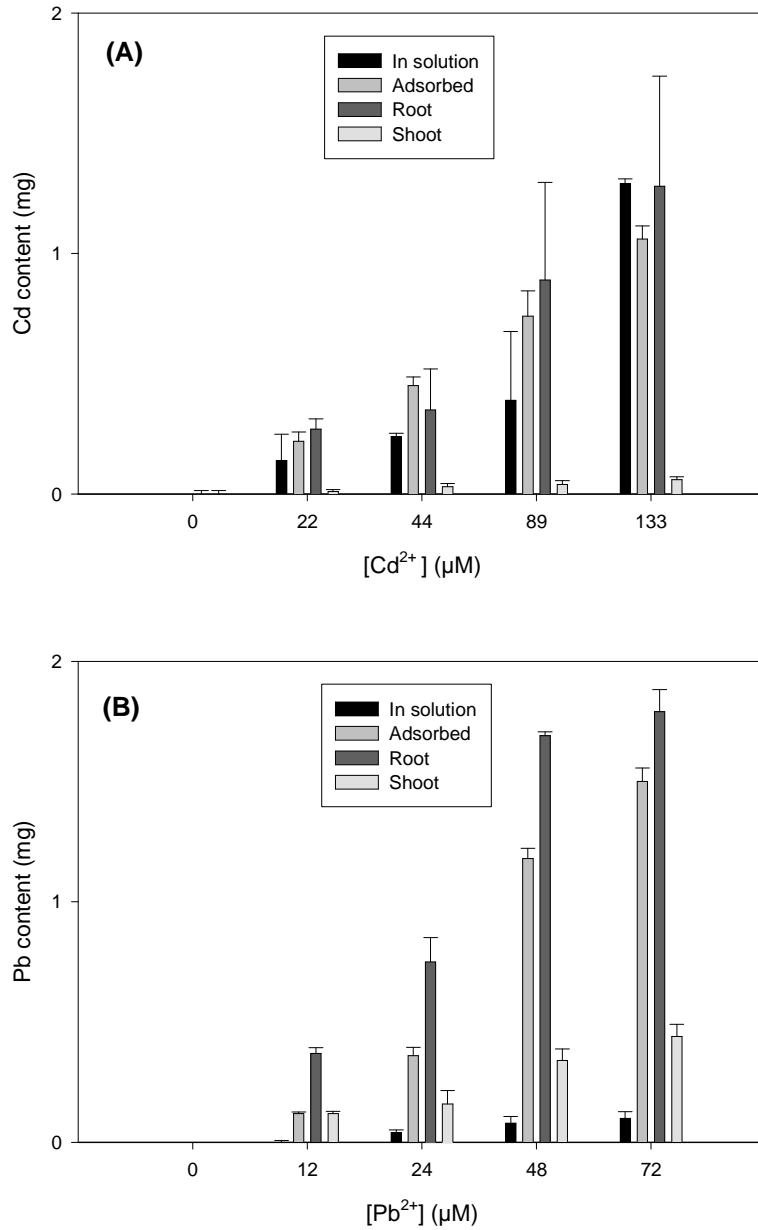


FIGURE 3

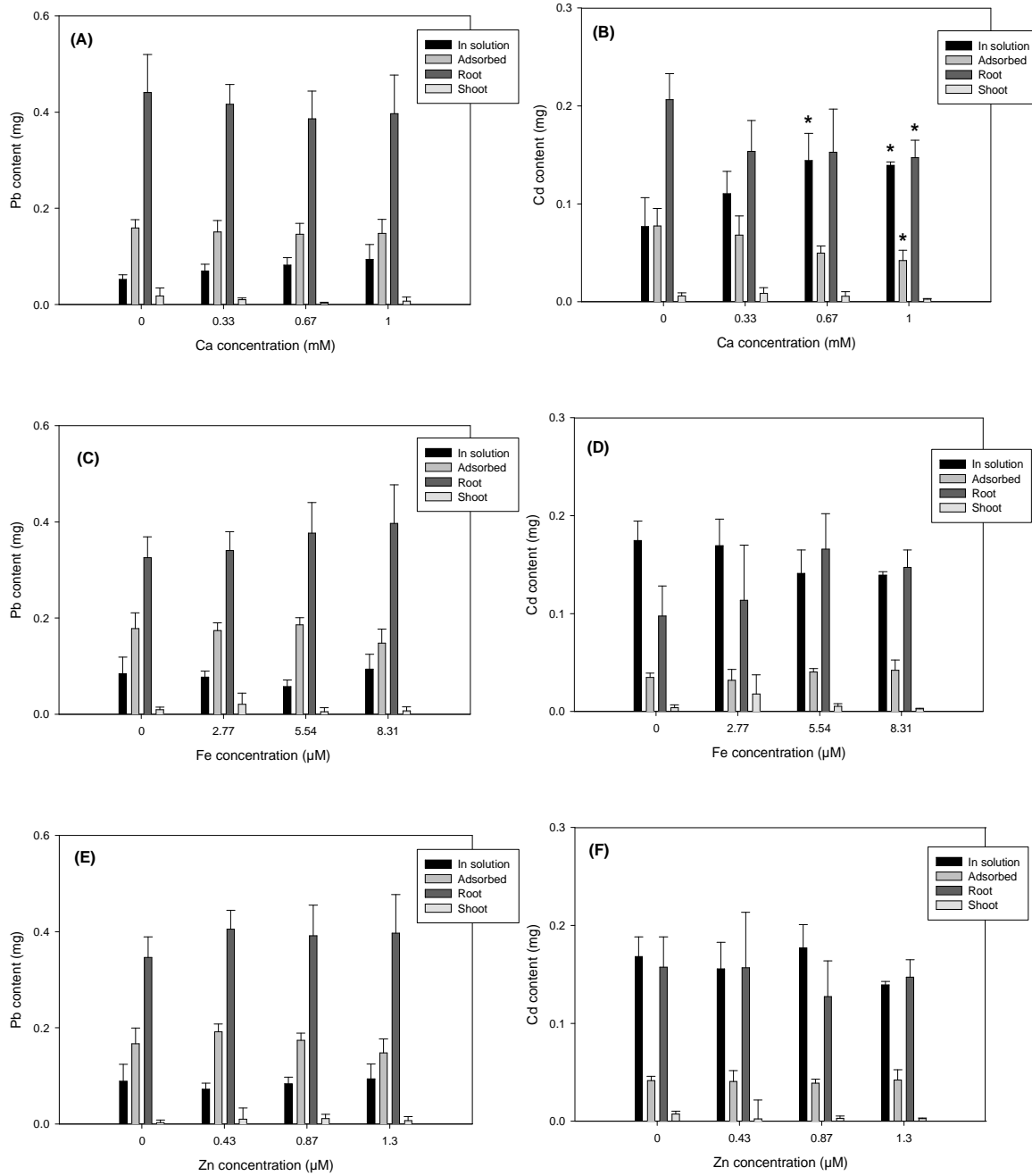
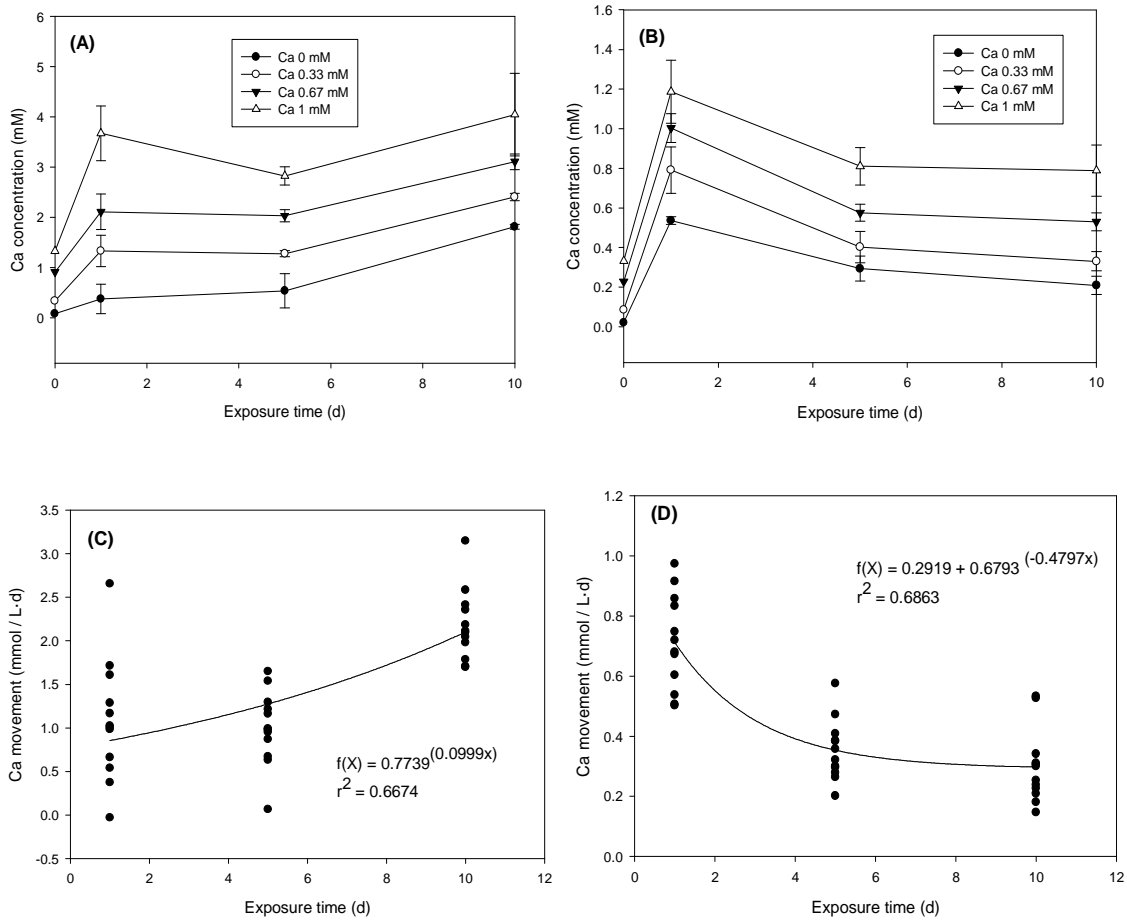


FIGURE 4



CAPÍTULO 3

***VzTPC1* is Overexpressed in Vetiver Roots under Cadmium and Lead Stress**

Autores: Mayra Cecilia Rodríguez Hernández¹, Bernardo Bañuelos-Hernández², Ma Catalina Alfaro de la Torre¹, Imelda Bonifas Arredondo²

1: Laboratorio de Elementos Traza, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP; **2:** Laboratorio de Biodinámica Celular y Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

VzTPC1 is Overexpressed in Vetiver Roots under Cadmium and Lead Stress

Resumen

Para mejorar la capacidad de fitorremediación de las plantas, se requiere del conocimiento de los mecanismos de transporte que determinan la internalización de los metales tóxicos como Cd y Pb. Este trabajo analizó el mecanismo de captación de Cd y Pb asociado al mecanismo de transporte de Ca. Se clonó un gen que codifica para un canal permeable a Ca (*VzTPC1*) de Vetiver. *VzTPC1* se expresó en las raíces y en hojas de las plantas; sin embargo, la inducción de la expresión por variaciones de la concentración de Ca se observó sólo en raíces. Nuestros resultados revelaron que Cd y Pb indujeron la expresión de *VzTPC1* en raíces. La expresión del gen *VzTPC1* bajo los tratamientos con Pb no tuvo dependencia en la concentración de este metal pesado.

Palabras clave: Canal de calcio; Pb/Cd; Fitorremediación; TPC1; Vetiver

Abreviaciones:

HM - metal pesado; PM - membrana plasmática; TPC1 - canal de dos poros 1 (Two Pore Channel); VDCC - canal de calcio dependiente de voltaje; VM - membrana vacuolar.

Abstract

A detailed knowledge of the transport mechanisms that determine the internalization of toxic metals like Pb and Cd in plants is required to improve their phytoremediation capacity. This work analyzed the uptake mechanism of Cd and Pb associated to the transport mechanism of Ca. A Ca^{2+} -permeable channel gene *VzTPC1* from vetiver was cloned. *VzTPC1* was expressed in leaves and roots; however, the expression induced by the concentration of Ca in the nutrient solution was observed only in roots. Our findings revealed that cadmium and lead induced *VzTPC1* expression in roots. The expression of the *VzTPC1* gene in vetiver plants showed a similar correlation with the concentration of Ca and Cd. The expression of the *VzTPC1* gene under lead treatments did not depend on the concentration of the heavy metal.

Additional key words:

Calcium channel; Pb/Cd; Phytoremediation; TPC1; Vetiver

Abbreviations:

HM - heavy metals; PM - plasma membrane; TPC1 - two pore channel1; VDCC - voltage-dependent Ca^{2+} channel; VM - vacuolar membrane.

1. INTRODUCTION

Cadmium (Cd) and lead (Pb) are released into the environment by mining, wastewater, and industry, representing a serious threat to human health (Paradiso et al., 2008, Sharma and Dubey, 2005). In plants, the exposure to toxic concentrations of either Cd or Pb causes oxidative stress, inhibition of growth, chlorosis, browning of root tips, disturbance of photosynthesis, dehydration and nutrient uptake and inhibition of enzymatic activities (Paradiso et al., 2008; Sharma and Dubey, 2005) and, finally, the death of the plants.

There are some available techniques based on phytoremediation to clean up HM-contaminated sites. These techniques have been intensively studied and applied to the field. Phytoremediation is simple, environmentally friendly and consumes less energy than other technologies based on physicochemical principles. The ideal plants for phytoremediation should be fast growing, have high biomass, deep roots, be easy to harvest and should tolerate and accumulate a wide range of heavy metals in their aerial and harvestable parts (Clemens et al., 2002). Vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, syn. *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] belongs to the Poaceae family and was originally used for soil and water conservation purposes. Due to its unique morphological and physiological characteristics, and its tolerance to high levels of heavy metals, vetiver has also been successfully used in field for environmental protection purposes (Danh et al., 2009; Srivastava et al., 2008).

Knowledge about the uptake mechanisms, storage and tolerance of HM by the plants is required to improve the phytoremediation process. Plants do not need these elements for growing; thus, they probably do not have transporters specialized for HM uptake. It is likely that HM enter into the plant cells via transporters for essential cations because the chemical properties of such cations are analogous to those of the HM (Clemens et al., 1998; Connolly et al., 2002).

Previously, we analyzed the influence of calcium, iron and zinc on the removal and accumulation of cadmium and lead by vetiver plants by Atomic Absorption Spectrophotometry (data submitted for publication). Of the three, calcium had a greater influence on the accumulation of Cd^{2+} and Pb^{2+} ; a lower concentration of calcium in the growth solution led to a higher accumulation of cadmium in vetiver tissues (roots and shoots). In addition, different researches suggest that Ca^{2+} is involved in the uptake of Cd^{2+} and Pb^{2+} . He et al. (2009) mentioned that the uptake of Cd^{2+} into the symplasm is linked to the transport of Ca^{2+} , as revealed by the inhibition of Cd^{2+} accumulation by La^{3+}

(Ca²⁺- channel inhibitor) and high concentrations of Ca²⁺. Various studies showed that Pb²⁺ and Cd²⁺ affect the accumulation and distribution of Ca²⁺ in maize (*Zea mays* L.) seedlings and cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants (Małkowski et al., 2005; Varga et al., 1999). Patch-clamp studies with guard cell protoplasts of *V. faba* showed that Ca²⁺ channels are permeable to Cd²⁺; the authors suggest that Cd²⁺ mimics Ca²⁺ and enters guard cells through voltage-dependent Ca²⁺ channels (Perfus-Barbeoch et al., 2002).

Candidates for the Ca²⁺ channel encoding gene family, TPCs (Two-Pore Channels), have been identified in recent years (Furuichi et al., 2001; Hashimoto et al., 2004; Kadota et al., 2004; Kurusu et al., 2004; Wang et al., 2005). The deduced TPCs proteins are structurally similar to the voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCCs) of animal cells (Hashimoto et al., 2004). Marchetti (2013) found that Cd²⁺ and Pb²⁺ interact with the Ca-binding sites of VDCCs, but, while the influx of Cd²⁺ appears to occur mainly through the same pathways as Ca²⁺, Pb²⁺ is also rapidly taken up by different passive transport systems. These results suggest the possible participation of the TPC1 channel in the influx of Cd²⁺ and Pb²⁺ in plants.

The goal of this study was to amplify and sequence the *TPC1* cDNA of *Vetiveria zizanioides* plants in order to determine whether the expression of *TPC1* cDNA is correlated to the concentration of Ca²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.)] plants were obtained from crops grown in non-polluted soils. The plants were transported to the laboratory in plastic bags, washed with running water, maintained in a greenhouse at 25±2 °C, 60% of humidity and grown under natural daylight. For propagation, the sprouts were separated and planted in containers filled with a general purpose peat-based growing medium (Pro-Mix BX). We carefully selected vetiver plants with similar weight (21.1 ± 3.9 g/plant) and length (roots: 31.1 ± 7.7 cm; shoots: 32 ± 2.4 cm) for experiments under the conditions described below.

2.2 Design of degenerate primers

Sequences of TPCs genes from monocotyledonous and dicotyledonous plant species were downloaded from the NCBI database and aligned with the ClustalW algorithm of the

MegAlign application of Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). On the alignment, the conserved boxes were used to locate and design degenerate primers. The GenBank number for each sequence used in the alignment is shown in Table 1. Based on the alignment, we designed three *TPC1*-specific degenerate primers named *TPC1Fwd* (5' CACMACMTCMAAYAATCCWGAY GTMTGG 3'), *TPC1Rev1* (5' CTTSCVAKRAGAAGRTAYCGRATCC 3'), and *TPC1Rev2* (5'- ACCATDCCA YTKGGRTAGTCATTGAAG -3').

2.3 PCR amplification of *VzTPC1* by Nested-PCR

The degenerate primers were used for amplifying a fragment of *TPC1* of vetiver. RNA was extracted from the plants using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The RNA obtained was treated with 1 µL of DNAase I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and then quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher, Scientific, USA). A mass of 100 ng of treated RNA was used for cDNA synthesis (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1 µL of the cDNA obtained was used for a PCR reaction. Primers *TPC1Fwd* and *TPC1Rev2* were used in the first PCR reaction. The PCR cycling program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, an alignment step of 30 s at 55°C, an elongation step at 72°C for 1 min and a final extension of the cDNA at 72°C for 3 min. The PCR produced only nonspecific amplicons, so we performed a nested PCR. For this, 1 µL of the product of the first PCR was used for a second PCR amplification using the primers *TPC1Fwd* and *TPC1Rev1* with the same conditions of time and temperature. This procedure allowed us to obtain a defined PCR product of 817 bp.

2.4 Sequencing of PCR product from vetiver

The amplified PCR product from vetiver was cloned into the plasmid pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's protocol, and sequenced with universal primer M13. Automated sequencing was carried out using a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each sequence obtained was analyzed using the Blast program of NCBI-BLAST (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.5 Design of specific primers

Specific primers were designed based on the cDNA sequence obtained from vetiver *TPC1*. The primers *TPC1-Vet-F* (5' TCAAGGTTACCGCCGAGGAAT 3') and *TPC1-Vet-R* (5' GATGGGGAGGCAAATGTCAGG 3') were used to amplify a cDNA fragment of 420 bp. The PCR reaction was carried out with the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, then 31 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, alignment at 55°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s, followed by a final single extension at 72°C for 3 min.

2.6 Effect of Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on vetiver *TPC1* gene expression

We analyzed the effect of Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on the expression level of the *TPC1* gene in vetiver tissues; the expression level was analyzed with respect to time and to concentration. The vetiver plants (n=3) were acclimated during ten days in a nutrient solution (Solution A, Table 2). Through chlorophyll and growth index parameters, we determined that the solution of nutrients did not affect the growth of the plants during the acclimation and experimental periods (data not shown). After the acclimation period the plants were washed with deionized water and the nutrient solution was replaced by different experimental solutions listed on Table 2. All reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

First, we analyzed the effect of the sufficiency or deficiency (presence or absence) of Ca^{2+} in the nutrient solution on *TPC1* expression of vetiver leaves and roots (Table 2, solutions A and B). The sampling of plant leaves and roots was done at 0, 2, 4 and 8 h. Vetiver plants were then exposed to equimolar concentrations of Cd^{2+} and Pb^{2+} (10 μM ; Table 2, solutions C and D) to determine whether the presence of Cd^{2+} and Pb^{2+} in the nutrient solution influences *TPC1* gene expression in plant roots. Previously, we determined that four hours were sufficient to induce a stimulation of *VzTPC1* cDNA in root; therefore, under Cd^{2+} and Pb^{2+} exposure, the sampling was done at 0 and 4 h. The *TPC1* cDNA expression index was calculated (expression level ratio at 0 and 4 hours). After that, we determined the effect of varying the concentration of Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} ions on the expression of *TPC1* in roots. For this, different increasing concentrations of Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} were added individually to nutrient solutions B (see Table 2). The concentrations of Ca^{2+} in the nutrient solutions were 0, 0.33, 0.67 or 1 mM; Cd^{2+} and Pb^{2+} were added to reach a final concentration of 0, 10, 30 or 50 μM , and the roots of the plants (n=3) exposed to each solution were collected after 4h of exposure to the metals solution. The concentrations of

Cd^{2+} and Pb^{2+} were tested and we confirmed that they do not affect the growth and development of the plants (data submitted for publication).

Chemical modelling using the MINEQL+ program (Schecher and McAvoy, 1994) was performed to predict whether the metals were available to the plants, calculating their limit of solubility and estimating their dissolved chemical species under the physicochemical characteristics of the solutions (pH and I) used in the experiments.

TPC1 expression was measured using semi-quantitative RT-PCR analysis. Expression levels were normalized to those of ACTIN1 (Accession No. NM_001155179.1). PCR products were analyzed on 1% agarose gels and band intensities were quantified using the LabWorks® software.

2.7 Statistical Analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed on the data, followed by Tukey's multiple range tests for comparisons between treatments. The results were considered significantly different when the calculated p-values were < 0.05 . All calculations were done employing the GraphPad InStat™ Software.

3. RESULTS

3.1 Cloning and sequencing *TPC1*

RT-PCR amplification of a putative Ca^{2+} channel of *Vetiveria zizanioides* resulted in a cDNA fragment of 817 bp (Accession No. JX897057) encoding 272 amino acids, with calculated molecular mass of 32.1 kDa (Figure 1). The sequence identity with the putative Voltage-Dependent Ca^{2+} Channel, *TPC1*, from *Sorghum bicolor* (Accession No. XM_002458269), *Zea mays* (Accession No. EU954499), and *Oryza sativa* (Accession No. AB071014), was 96%, 95 % and 86%, respectively (Table 3). These results indicated that vetiver *TPC1* (*VzTPC1*) is more closely related to the two-pore voltage-gated Ca^{2+} channel from monocots.

3.2 Effect of Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on vetiver *TPC1* gene expression

Vetiver plants were exposed to different treatments, including the presence and absence of calcium in the nutrient solution. *VzTPC1* was expressed in the leaves and roots of vetiver (Figure 2); however, in leaves there were no significant differences between the treatments with and without Ca^{2+} (Figure 2 A). In roots, a similar expression level of

VzTPC1 was observed at the beginning of the experiment with and without Ca^{2+} . An increase of *VzTPC1* expression was detected in vetiver roots after 2 h of incubation with Ca^{2+} ; this increase was statistically significant ($p < 0.05$) (Figure 2B). Similarly, to examine the effect of Cd^{2+} and Pb^{2+} on the time-dependent *VzTPC1* root expression, vetiver plants were exposed to 10 μM of Cd^{2+} or Pb^{2+} , according to the conditions described in the material and methods section. As shown in Figure 3, an increase of *VzTPC1* cDNA in vetiver roots was detected after 4 h of exposure to Cd^{2+} or Pb^{2+} in absence of Ca^{2+} ; the expression index for Cd and Pb was 1.13 and 1.45, respectively. These results indicated that, cadmium and lead induce the expression of the *VzTPC1* gene in vetiver roots.

In order to elucidate the effect of Ca^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} ions on the expression of *VzTPC1* in roots, vetiver plants were exposed to three different concentrations of the heavy metals. As shown in Figure 4, there was a tendency for *VzTPC1* expression to increase in plants exposed to Ca^{2+} and Cd^{2+} (Figure 4 A, B). In the case of Ca^{2+} , there was a significant difference in gene expression between the maximum concentration of Ca^{2+} (1 mM) and the control ($p < 0.05$). Similar results were found for Cd^{2+} ; they showed a significant difference in the expression of the *VzTPC1* gene ($p < 0.05$) between the maximum concentration of Cd^{2+} tested (50 μM) and the control. The expression of the *VzTPC1* gene in plants exposed to Pb^{2+} was not clear, although it increased in plant roots exposed to 10 and 50 μM of Pb^{2+} compared to the control ($p < 0.05$). The expression of *VzTPC1* in plant roots growing in nutrient solution containing 30 μM Pb^{2+} did not show a significant difference with respect to the control (Figure 4 C).

4. DISCUSSION

In the present study, *VzTPC1* cDNA from *Vetiveria zizanioides* was amplified, cloned and sequenced. In recent years, candidates for the Ca^{2+} channel encoding gene family, TPCs (two-pore channels), have been identified: *AtTPC1* from *Arabidopsis thaliana* (Furuichi et al., 2001), *OsTPC1* from rice (Hashimoto et al., 2004; Kurusu et al., 2004), *NtTPC1 A/B* from tobacco BY-2 cells (Kadota et al., 2004) and *TaTPC1* from wheat (Wang et al., 2005). *VzTPC1* was expressed in leaves and roots of vetiver plants (Figure 2A and B). Previous studies have demonstrated that TPC1 is ubiquitously expressed in all tissues of *Arabidopsis*: roots, flowers and leaves; *OsTPC1* mRNA was detected almost ubiquitously in tissues of rice: calli, mature leaves and shoots, except for roots, where its expression was weaker (Furuichi et al., 2001; Kurusu et al., 2004). The cellular localization of TPC1 in

plants has been studied and debated. Molecular and electrophysiological studies have shown that *Arabidopsis* TPC1 is mainly localized at the VM and that it functions as a slow vacuolar cation channel (Peiter et al., 2005). In contrast, it has been suggested that TPCs in monocots are localized at the PM (Hamada et al., 2012; Hashimoto et al., 2005; Kurusu et al., 2004; Kurusu et al., 2012; Wang et al., 2005). The results in this work indicated that vetiver TPC1 (*VzTPC1*) is more closely related to the two-pore voltage-gated Ca^{2+} channel from monocots; therefore, *VzTPC1* could be located in PM in vetiver.

The presence or absence of Ca^{2+} in the nutrient solution stimulated *VzTPC1* only in roots, while the expression of the *VzTPC1* gene in leaves was constant and independent of the presence of Ca^{2+} in the nutrient solution (Figure 2). Similar results were obtained in wheat seedlings, where *TaTPC1* was inducible in the root but not in the shoot, implying that *TaTPC1* may play a major role in the root by responding to stimuli from the soil (Wang et al., 2005). The time-dependent differential expression observed in roots indicates the up-regulation of *VzTPC1* induced by calcium. Different studies mention TPC1 as a PM protein participating in the influx of Ca^{2+} to the cell. For example, in rice cells, *OsTPC1* expression was inversely correlated with tolerance to high $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$, suggesting that *OsTPC1* translocates a substantial amount of Ca^{2+} across the PM, and that it is one of the major factors affecting Ca^{2+} sensitivity, at least in suspension-cultured cells (Kurusu et al., 2004). The deduced TPCs proteins are structurally similar to the voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) of animal cells. These proteins have been related to Cd^{2+} and Pb^{2+} transport in mammalian cells (Hashimoto et al., 2004; Marchetti, 2013; Zhu et al., 2010). Previous findings showed that the concentration of Cd^{2+} and Pb^{2+} absorbed by vetiver plants was inversely proportional to the concentration of Ca^{2+} in the growth medium, suggesting a competition between the ions in the solution and/or to cellular level (data submitted for publication). In this research, we analyzed the differential expression of *VzTPC1* as a response to Ca^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} stimulus, determining the possible role of the voltage-dependent Ca^{2+} channel (TPC1) on Cd^{2+} and Pb^{2+} uptake by vetiver plants. Our results suggest that, due to their similar chemical properties, Cd^{2+} may mimic Ca^{2+} ; therefore, a similar effect on *VzTPC1* expression was observed (Figure 4). These results could indicate a possible role for *VzTPC1* on the influx of Cd^{2+} . Similar results in mammalian cells showed that VDCCs mediated Cd^{2+} influx (Hinkle et al., 1987; Hinkle et al., 1992; Marchetti, 2013; Usai et al., 1997; Usai et al., 1999). The influx of Cd^{2+} through calcium channels in plants has also been suggested. He et al. (2009) suggested that the

uptake of Cd^{2+} by rice plants (*Oryza sativa* L.) is regulated by Ca^{2+} transporters or channels in the root cell plasma membrane. The application of putative calcium channel inhibitors suppressed the inhibitory effect of Cd^{2+} in epidermal strip experiments with *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Furthermore, patch-clamp studies with *V. faba* guard cell protoplasts showed that the Ca^{2+} channels were permeable to Cd^{2+} (Perfus-Barbeoch et al., 2002).

In this work, we found that *VzTPC1* expression in plants exposed to different Pb^{2+} concentrations did not show a correlation (Figure 4). Marchetti (2013) described that Cd^{2+} and Pb^{2+} interact with Ca-binding sites of VDCC, but, while the influx of Cd^{2+} appears to occur mainly through the same pathways as Ca^{2+} , Pb^{2+} is also rapidly taken up by different passive transport systems. The differences on *VzTPC1* expression observed in this work under different concentrations of Pb^{2+} could occur as an indirect response to this metal. The physiological responses of the plants are expressed through common mechanisms to reduce the damage by abiotic stress. One of these responses by the plant cells is to increase the cytosolic free-calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ by infusion from the apoplastic space and release from internal stores (Sanders et al., 1999; Xiong et al., 2002). Under normal growth conditions, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in plant cells is maintained at about 100 nM through the activity of the Ca^{2+} -ATPase, the Ca^{2+} -permeable channel, and the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters in the cell membranes (White and Broadley, 2003). An explanation for an enhanced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ could be through the membrane depolarization under abiotic stress treatments, which leads to the opening of Ca^{2+} -permeable channels (White and Broadley, 2003). A second reason could be the expression of genes encoding Ca^{2+} -permeable channels induced under abiotic stress. It has been suggested that TPC1 channels are involved in the Ca^{2+} signalling that leads to the development of plant defense mechanisms under abiotic and biotic stress (Bonaventure et al., 2007; Islam et al., 2010; Kadota et al., 2004; Kurusu et al., 2012; Lin et al., 2005; Wang et al., 2005). Different results were obtained by others authors; in macroscopic aequorin luminometry experiments, global $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ of the *tpc 1-2* mutant did not respond differently to various abiotic stimuli such as cold, osmotic and salt stress, and pathogen elicitors, as did the wild type. These findings led the authors to the conclusion that TPC1 is not involved in Ca^{2+} signaling, but it is in K^{+} and/or Na^{2+} homeostasis (Ivashikina and Hedrich 2005; Ranf et al., 2008).

Further research should reveal more about the function of TPC1 in plants. Direct measurements of Ca^{2+} channel of heterologously expressed gene by electrophysiological

techniques are needed for a conclusive identification of VzTPC1 as a voltage-activated inward-rectifying Ca^{2+} channel which participates in HM transport. These findings are important in the context of phytoremediation, where a better insight into the mechanistic details of Cd^{2+} and Pb^{2+} uptake by vetiver may help to engineer these plants to enhance their phytoremediation capacity.

Acknowledgments

CONACYT Grant No. J-2007-84962 has supported this research; PROMEP-RED for the UASLP-CA37 and CONACYT-90228. Rodriguez-Hernandez M.C. acknowledges a PhD fellowship from CONACyT No. 201755. We thank INIFAP, Huichihuayan, SLP, Mexico for providing vetiver plants. We are also greatly indebted to Dr. Gerardo Argüello-Astorga for helpful discussions and for the supply of laboratory equipment. The writers acknowledge the technical assistance of Omar Patiño Rodríguez for submitting the *VzTPC1* sequence to GenBank. We thank Dr. Brent E. Handy for his help in reviewing the manuscript.

References

- Bonaventure, G., Gfeller, A., Proebsting, W.M., Hörtensteiner, S., Chételat, A., Martinoia, E., Farmer, E.E., 2007. A gain-of-function allele of *TPC1* activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 889–898.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., 1998. The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12043–12048.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7, 309–315.
- Connolly, E.L., Fett, J.P., Guerinot, M.L., 2002. Expression of the *IRT1* metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *The Plant Cell* 14, 1347–1357.
- Danh, L.T., Truong, P., Mammucari, R., Tran, T., Foster, N., 2009. Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: A choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *International Journal of Phytoremediation* 11, 664–691.
- Furuichi, T., Cunningham, K.W., Muto, S., 2001. A putative two pore channel *AtTPC1* mediates Ca^{2+} flux in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant & Cell Physiology* 42, 900–905.
- Hamada, H., Kusuru, T., Okuma, E., Nokajima, H., Kiyoduka, M., Koyano, T., Sugiyama, Y., Okada, K., Koga, J., Saji, H., Miyao, A., Hirochika, H., Yamane, H., Murata, Y., Kuchitsu, K., 2012. Regulation of a proteinaceous elicitor-induced Ca^{2+} influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, *OsTPC1*, in cultured rice cells. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 9931–9939.
- Hashimoto, K., Saito, M., Matsuoka, H., Iida, K., Iida, H., 2004. Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, *OsTPC1*, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCH1*. *Plant & Cell Physiology* 45, 496–500.
- Hashimoto, K., Saito, M., Iida, H., Matsuoka, H., 2005. Evidence for the plasma membrane localization of a putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, *OsTPC1*, in rice. *Plant Biotechnology* 22, 235–239.
- He, J.Y., Ren, Y.F., Wang, F.J., Pan, X.B., Zhu, C., Jiang, D.A., 2009. Characterization of cadmium uptake and translocation in a cadmium-sensitive mutant of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 299–306.
- Hinkle, P.M., Kinsella, P.A., Osterhoudt, K.C., 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 16333–16337.
- Hinkle, P.M., Shanshala, E. D., Nelson, E.J., 1992. Measurements of intracellular cadmium with fluorescent dyes—further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 25553–25559.
- Islam, M.M., Munemasa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., I.C., and Murata, Y., 2010. Roles of *AtTPC1*, vacuolar two pore channel 1, in *Arabidopsis* stomatal closure. *Plant & Cell Physiology* 51, 302–311.
- Ivashikina, N., Hedrich, R., 2005. K^+ currents through SV-type vacuolar channels are sensitive to elevated luminal sodium levels. *The Plant Journal* 41, 606–614.

- Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., Kuchitsu, K., 2004. Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 823–830.
- Kurusu, T., Hamada, H., Koyano, T., Kuchitsu, K., 2012. Intracellular localization and physiological function of a rice Ca^{2+} -permeable channel OsTPC1. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1–3.
- Kurusu, T., Sakurai, Y., Miyao, A., Hirochika, H., Kuchitsu, K., 2004. Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (OsTPC1) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice. *Plant & Cell Physiology* 45, 693–702.
- Kurusu, T., Yagala, T., Miyao, A., Hirochika, H., Kuchitsu, K., 2005. Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *The Plant Journal* 42, 798–809.
- Lin, C., Yu, Y., Kadono, T., Iwata, M., Umemura, K., Furuichi, T., Kuse, M., Isobe, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Yoshizuka, K., Kawano, T., 2005. Action of aluminum, novel TPC1-type channel inhibitor, against salicylate-induced and cold-shock-induced calcium influx in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 823–830.
- Małkowski, E., Kurtyka, R., Kita, A., Karcz, W., 2005. Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Polish Journal of Environmental Studies* 14, 203–207.
- Marchetti, C., 2013. Role of calcium channels in heavy metal toxicity. *ISRN Toxicology* 2013, 1–9.
- Paradiso, A., Berardino, R., de Pinto, M.C., Sanità di Toppi, L., Storelli, M.M., Tommasi, F., De Gara, L., 2008. Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant & Cell Physiology* 49, 362–374.
- Peiter, E., Maathuis, F.J.M., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., Sanders, D., 2005. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404–408.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539–548.
- Ranf, S., Wünnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., Dietrich, P., 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca^{2+} signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant Journal* 53, 287–299.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F., 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell* 11, 691–706.
- Schecher, W.D., McAvoy, D.C., 1994. MINEQL+: a chemical equilibrium program for personal computers. User's manual - Version 3.0. Environ. Res. Software. Hallowell.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35–52.
- Srivastava, J., Kayastha, S., Jamil, S., Srivastava, V., 2008. Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 413–417.

- Usai, C., Barberis, A., Moccagatta, L., Marchetti, C., 1997. Pathways of cadmium uptake in excitable mammalian cells: a microspectrofluorimetric study. *European Journal of Histochemistry* 41, 189–190.
- Usai, C., Barberis, A., Moccagatta, L., Marchetti, C., 1999. Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *Journal of Neurochemistry* 72, 2154–2161.
- Varga, A., Garcinuño-Martinez, R.M., Záray, G., Fodor, F., 1999. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *Spectrochimica acta. Part B: Atomic Spectroscopy* 54, 1455–1462.
- Wang, Y.J., Yu, J.N., Chen, T., Zhang, Z.G., Hao, Y.J., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2005. Functional analysis of a putative Ca^{2+} channel gene *TaTPC1* from wheat. *Journal of Experimental Botany* 56, 3051–3060.
- White, P.J., Broadley, M.R., 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92, 487–511.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K., 2002. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The Plant Cell* 14(Suppl), S165–183.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., Galione, A., Evans, A.M., 2010. TPCs: Endolysosomal channels for Ca^{2+} mobilization from acidic organelles triggered by NAADP. *FEBS Letters* 584, 1966–1974.

TABLES

Table 1

GenBank accession numbers of the sequences used to design degenerate primers

Specie	GenBank number	Type of sequence
<i>Oryza sativa</i>	NM_001050393	mRNA for TPC1
<i>Sorghum bicolor</i>	XM_002458269	hipotetical protein mRNA.
<i>Zea mays</i>	EU954499	mRNA for TPC1
<i>Triticum aestivum</i>	AY114121	putative mRNA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AB053952	mRNA for TPC1
<i>Vitis vinifera</i>	XM_002273179	mRNA for TPC1
<i>Nicotiana tabacum</i>	AB124647	mRNA for TPC1B

Table 2

Composition of the treatments used

	A	B	C	D
KNO₃	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
KCl	50 μM	50 μM	50 μM	50 μM
Ca(NO₃)₂	1 mM	-	-	-
FeSO₄	8.31 μM	8.31 μM	8.31 μM	8.31 μM
Zn(SO₄)₂	1.3 μM	1.3 μM	1.3 μM	1.3 μM
Pb(NO₃)₂	-	-	10 μM	-
Cd(NO₃)₂	-	-	-	10 μM

Table 3

Sequence identity of *VzTPC1* cDNA with mono and dicots.

Species	GenBank number	Sequence identity	Type of sequence
<i>Sorghum bicolor</i>	XM_002458269	96%	hypothetical protein, mRNA
<i>Zea mays</i>	EU954499	95%	mRNA for TPC1
<i>Oryza sativa</i>	AB071014	86%	mRNA for TPC1
<i>Hordeum vulgare</i>	AY465119	84%	mRNA for TPC1
<i>Vitis vinifera</i>	EU925561	70%	mRNA for TPC1
<i>Nicotiana tabacum</i>	AB124646	69%	mRNA for TPC1A
<i>Nicotiana tabacum</i>	AB124647	67%	mRNA for TPC1B
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XM_002874814	66%	mRNA for TPC1
subsp. <i>lyrata</i>	AB053952	65%	mRNA for TPC1
<i>Arabidopsis thaliana</i>			

Alignment of the sequence of vetiver *VzTPC1* cDNA was performed using the Blast program of NCBI-BLAST (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Multiple amino acid alignments of the predicted *TPC1* sequence from vetiver with its orthologous proteins. The alignment was obtained with ClustalX. * Protein sequence of hypothetical *TPC1* of *Sorgum bicolor* (XM_002458269.1), ** protein sequence of *TPC1* of *Zea mays* (EU954499.1), *** hypothetical fragment of *TPC1* protein of *V zizanioides*.

Figure 2. Semi-quantitative RT-PCR analysis of *VzTPC1* expression. Differential expression of *TPC1* in vetiver roots and leaves. Single plants were exposed to nutrient solutions without (-) and with (+) Ca^{+2} . First-Strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from roots followed by PCR. Data were normalized to *ACTIN1*. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. **(A)** *VzTPC1* expression in leaves, **(B)** *VzTPC1* expression in roots.

Figure 3. Expression of *TPC1* in vetiver roots exposed to Cd^{2+} or Pb^{2+} . Single plants were exposed separately to 10 μM of Cd^{2+} and Pb^{2+} . First-Strand cDNA was synthesized from total RNA extracted from roots and amplified by RT-PCR. Data were normalized to *ACTIN1*. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Figure 4. Effects of Ca (A), Cd (B) and Pb (C) concentration on *VzTPC1* expression in vetiver roots after 4 h exposure to each treatment. Data were normalized to *ACTIN1*. Error bars represent the mean value \pm SD ($n=3$). Asterisks indicate a significant difference with respect to control according to the ANOVA test ($p < 0.05$).

Figure 1



Figure 2

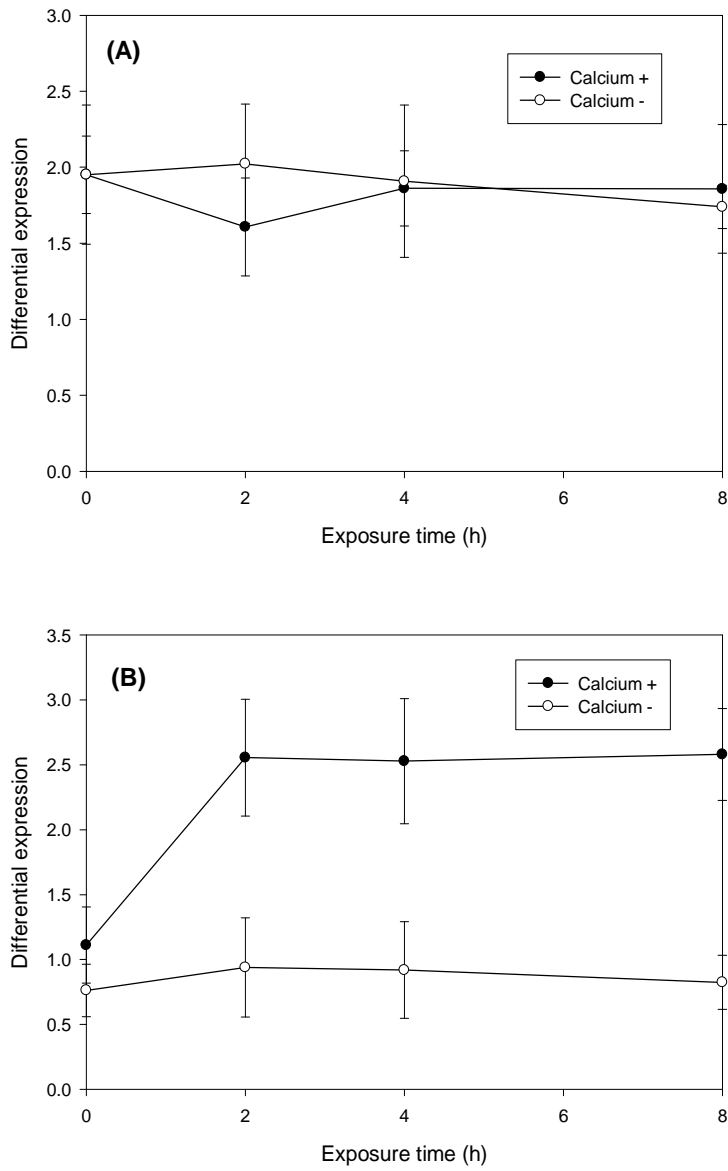


Figure 3

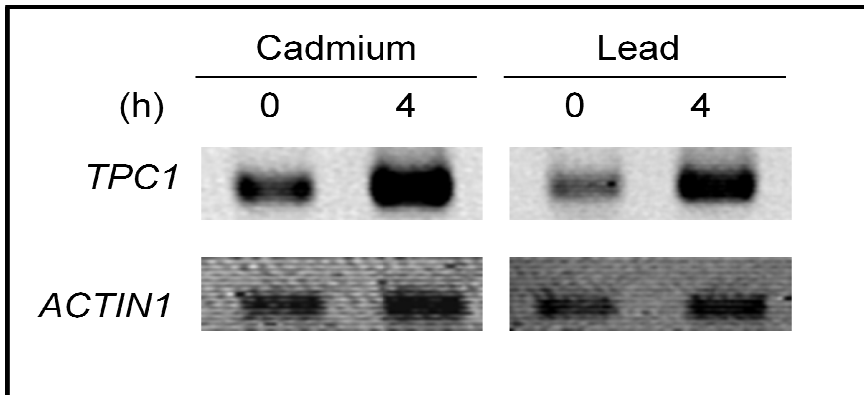
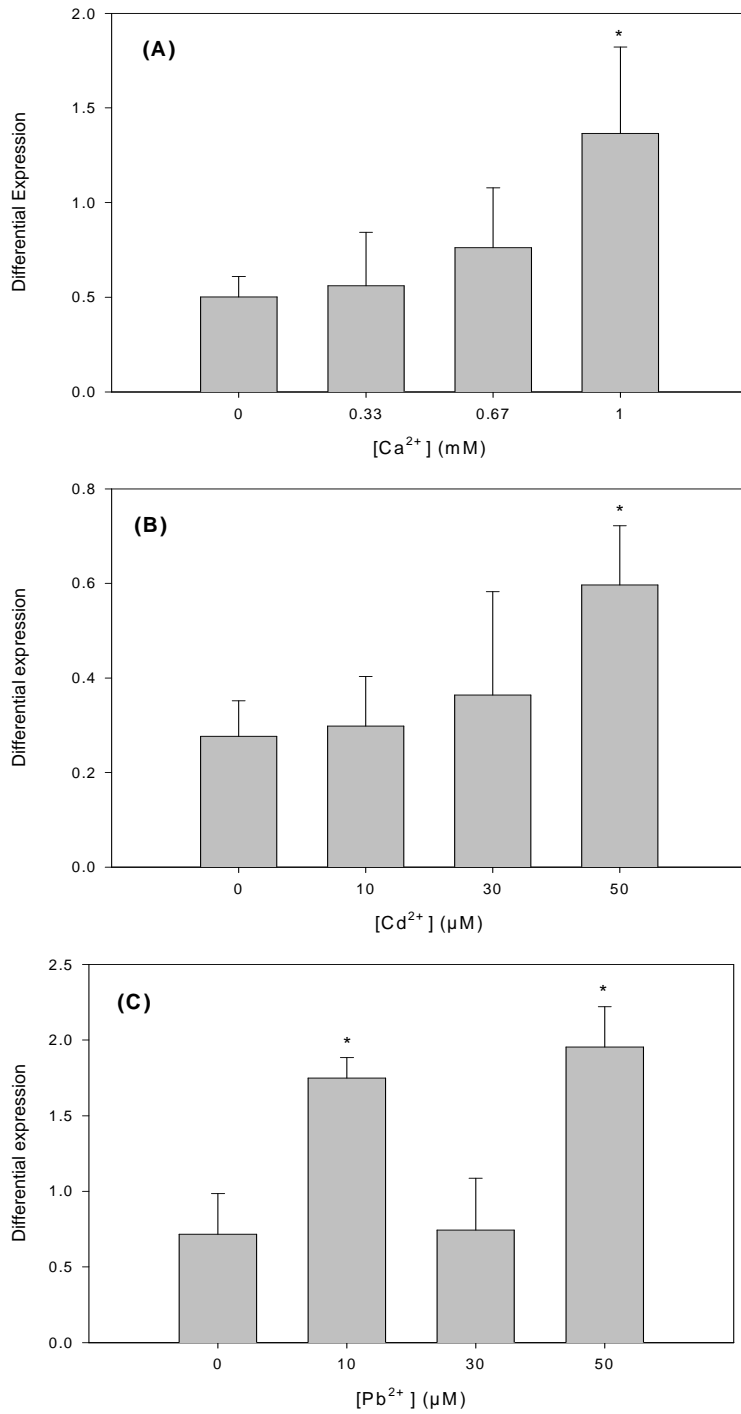


Figure 4



CAPÍTULO 4

Increased Accumulation of Cadmium and Lead under Ca and Fe Deficiency in *Typha latifolia*: A Study of Two Pore Channel (*TPC1*) Gene Responses

Autores: M. C. Rodríguez-Hernández¹, I. Bonifas², M. C. Alfaro-de la Torre^{1*}, J. L. Flores-Flores³, B. Bañuelos-Hernández², O. Patiño-Rodríguez¹

1: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Av. Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria 78290, San Luis Potosí, México. **2:** Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, 78216 San Luis Potosí, México. **3:** Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), Altair 200, Col. Del Llano, 78377, San Luis Potosí, México.

Artículo aceptado en la revista *Environmental and Experimental Botany*. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.02.009

Increased Accumulation of Cadmium and Lead under Ca and Fe Deficiency in *Typha latifolia*: A Study of Two Pore Channel (*TPC1*) Gene Responses

Resumen

Para mejorar el proceso de fitorremediación, es necesario el conocimiento de los mecanismos de captación, almacenamiento y tolerancia a los metales pesados por las plantas. No obstante, los mecanismos de transporte que determinan la internalización de los metales tóxicos como Pb y Cd en las plantas, todavía no son bien entendidos. En el presente trabajo se investigó la influencia de las condiciones nutricionales de Ca, Fe y Zn de las en plantas de Espadaña (*Typha latifolia*), en la captación de cationes divalentes como Cd y Pb. Las plantas (n=3) fueron expuestas a soluciones de nutrientes conteniendo Ca, Fe y Zn, adicionada con Cd o Pb. Las plantas de Espadaña creciendo bajo las condiciones de deficiencia de Ca, removieron y acumularon más Cd y Pb en sus tejidos; sin embargo, este efecto fue más evidente en el caso del Cd. Hierro tuvo un efecto solamente en la captación de Pb, mientras que Zn no tuvo efectos evidentes en la captación de los metales pesados. Estos resultados indican una competencia entre los cationes divalentes por los mecanismos de captación en la solución nutritiva. Se estudiaron las bases mecanísticas. Para ello, se clonó el gen que codifica para un canal permeable a Ca (*TITPC1*) de Espadaña. Los estudios de expresión de *TITPC1* indicaron que las plantas creciendo en una solución nutritiva con Ca, tuvieron un incremento en la expresión de *TITPC1*, similar al determinado en plantas creciendo con Cd o Pb. Además, estos resultados mostraron altas correlaciones entre la expresión de *TITPC1* y la concentración de Ca, Cd y Pb en la soluciones.

Abstract

Knowledge of the uptake mechanisms, storage and tolerance to heavy metals by plants is required for improving the phytoremediation process. Nevertheless, the transport mechanisms that determine the internalization of toxic metals, such as Pb and Cd, in plants remain not well understood. We investigated the influence of the Ca, Fe and Zn status on the uptake of divalent cations (Cd^{2+} and Pb^{2+}) in cattail (*Typha latifolia*). The plants (n=3) were exposed to nutrient solutions of Ca, Fe and Zn with Cd or Pb. The cattail plants growing under Ca-deficiency conditions removed and accumulated more Cd and Pb in their tissues; however, this effect was more evident in the case of Cd. The iron status only affected the uptake of Pb, whereas Zn had no evident effect on heavy metal uptake. These results indicate a competition between the divalent cations in the nutrient solution for the uptake mechanisms. To study the mechanistic basis for this response, a Ca^{2+} -channel gene *TITPC1* encoding a putative membrane protein was cloned from cattail. The expression of *TITPC1* in the roots of plants growing in solutions containing Cd or Pb increased similarly to that observed in plants growing in solutions with Ca. Additionally, the results showed high correlation coefficients between the differential expression of *TITPC1* and the concentration of Ca, Cd and Pb in the solutions.

Keywords: *TPC1*, *Typha latifolia*, Phytoremediation, Heavy metals, Calcium

1. Introduction

Cadmium (Cd) and lead (Pb) are divalent metals of environmental concern and should be removed from the environment to reduce the risk for humans (di Toppi and Gabrielli, 1999; Sharma and Dubey, 2005; ATSDR, 2011). Toxic concentrations of Cd and Pb are often found in wastewater from agriculture, mines and metallurgical activities and sometimes in natural sources destined for public supply (Carranza-Álvarez et al., 2008; ATSDR, 2011; Lyubenova et al., 2013). These elements have no known biological function; however, Lane and coworkers (2005) reported a carbonic anhydrase containing Cd in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. In plants, Cd and Pb induce morphological, physiological and biochemical dysfunctions that affect photosynthesis and thereby cause oxidative, DNA and other damages (Dixit et al., 2001; Shahid et al., 2011; Gallego et al., 2012).

Remediation using plants has been applied for the removal of Cd and Pb from wastewaters. Aquatic macrophytes are frequently chosen for this purpose due to the ability of these plants to accumulate these pollutants in their tissues (Flathman and Lanza, 1998). Phytoremediation is a promising approach because it is a low-cost and environmentally friendly technology that consumes less energy than other technologies based on physicochemical principles (Pilon-Smits, 2005). It is therefore of great importance to identify plant species that have the appropriate features required for good phytoremediation (Lyubenova et al., 2013). Of the aquatic plants, the species belonging to the *Typha* genus have the advantages of growing under varied climatic conditions and have the required characteristics to be used in phytoremediation because of their rapid growth and easy spreading and harvesting; also in addition, *Typha* species have been studied extensively due to their ability to reduce the levels of heavy metals in contaminated waters in natural and constructed wetlands and in greenhouse studies (Ye et al., 1997; Bareen and Khilji, 2008; Alonso-Castro et al., 2009; Hadad et al., 2010; Bonanno, 2013; Chen et al., 2014; Favas et al., 2014). Despite the above-mentioned information, there is a need to understand metal transport into the root and then through the plant, to evaluate the plant's efficiency to remove heavy metals from the solutions and to develop strategies to improve the role of aquatic plants in the application of phytoremediation technologies (Weis and Weis, 2004; Lyubenova et al., 2013).

In this context, it has been demonstrated that the removal and accumulation of heavy metals are closely related to the acquisition and movement of nutrients. For example, previous studies have shown that the plant accumulation of Fe and other metals, such as Cd, Mg and Zn, can be enhanced under Fe deficiency (Rodecap et al., 1994; Clemens et al., 1998; Cohen et al., 1998; Lombi et al., 2002). Antosiewicz (2004) found that the system of Pb uptake in tomato, maize and rye is differentially regulated by the content of Ca in the medium. Kim et al. (2002) reported that both Ca and Mg block Cd transport into rice roots. In cucumber plants, exposure to Cd hampers Ca, Fe and Zn accumulation in the roots. In addition, Pb contamination leads to a marked reduction in Ca accumulation in the roots (Varga et al., 1999). The molecular basis of heavy metal uptake by plants has been analyzed, and previous studies have shown that no essential metals, such as Cd and Pb, enter plant cells via transporters for essential cations (Ca, Fe and Zn), likely due to their analogous chemical properties (Clemens et al., 1998; Cohen et al., 1998). Several genes of these proteins have been identified. As an example, members of the Zinc-Iron-Permease (ZIP) family are involved in the uptake mechanism of Cd, Fe, Mn and Zn in *A. halleri*, *T. caerulescens*, *A. thaliana*, *Z. mays* and *S. lycopersicum* (Korshunova et al., 1999; Pence et al., 2000; Lombi et al., 2002; Luo et al., 2012; Li et al., 2013). By accumulating large amounts of Pb in its tissues, *N. tabacum* shows a greater tolerance to Ni and an increased sensitivity to Pb; this plant's response was attributed to the *NtCBP4* gene (Arazi et al., 1999). The genes *Nramp1* and *Nramp3* are involved in Fe and Cd transport in *Arabidopsis thaliana*, *Malus baccata* and *Oryza sativa* plants (Curie et al., 2000, Thomine et al., 2000; Xiao et al., 2008; Takahashi et al., 2011). Antosiewicz and Henning (2004) demonstrated that the *LCT1* gene in wheat encodes a low-affinity cation transporter for Ca, Cd, Na and K. The insertion of the *A. thaliana* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter *CAX2* in tobacco plants resulted in an increased accumulation of Ca, Cd and Mn (Hirschi et al., 2000). Heavy Metal ATPase (HMA) pumps are involved in the translocation or detoxification of Zn and Cd in *T. caerulescens*, *A. halleri* and *H. vulgare* (Papoyan and Kochian, 2004; Courbut et al., 2007; Mills et al., 2012). In addition, Induri et al. (2012) identified the genes for a NHL repeat membrane-spanning protein, a metal transporter and a putative transcription factor as promising candidates for favoring Cd tolerance in *Populus*, a potential phytoremediator plant.

Several studies have suggested the participation of Ca^{2+} channels on heavy metal transport (Perfus-Barbeoch et al., 2002; White and Broadley, 2003; He et al., 2009).

Although electrophysiological studies have revealed several types of Ca^{2+} -permeable channels localized at the plasma membrane (PM) and vacuolar membrane (VM) in many plant species, their molecular identities remain largely unknown (Verret et al., 2010; Kurusu et al., 2012). Candidates for the voltage-dependent Ca^{2+} channel-encoding gene family, namely two-pore channels (TPCs), have been identified (Furuichi et al., 2001; Hashimoto et al., 2004; Kadota et al., 2004; Kurusu et al., 2004; Wang et al., 2005). Although the physiological function of TPCs in plants is debated, *TPC1* may participate in Ca permeation/accumulation in plants (Pottosin and Schönknecht, 2007; Gilliam et al., 2011; Hedrich and Marten, 2011; Kurusu et al., 2012). Additionally, different studies in plants and in mammalian cells (due to the similarity with VDCC channels) have suggested that Cd^{2+} and Pb^{2+} can mimic Ca^{2+} and induce the *TPC1* channels (Perfus-Barbeoch et al., 2002; Hashimoto et al., 2004; Peiter et al., 2005; Islam et al., 2010; Marchetti, 2013).

Despite the above-mentioned findings, there is very little information regarding the influence of nutrient conditions in heavy metal accumulation or the biochemical and molecular mechanisms responsible for the observed high tolerance to heavy metals in aquatic and other plants used in phytoremediation, such as *T. latifolia*.

This study investigated the influence of Ca, Fe and Zn on Cd and Pb uptake by *T. latifolia* plants exposed to the toxins in hydroponic conditions. Additionally, the *TPC1* cDNA of *T. latifolia* plants was amplified and sequenced to determine whether the expression of *TPC1* cDNA is correlated to the concentrations of Ca, Cd and Pb. Our hypothesis is that Cd and Pb in their divalent form enter plant cells via transporters for essential divalent cations (Ca, Fe and Zn) due to their analogous chemical properties.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Plants of *T. latifolia* (L.) collected from ponds not contaminated with metals were washed with tap water and maintained under greenhouse conditions (25-28°C). The plants were grown under a hydroponic system using a gravel-like support, and a nutritive solution (N-P-K; Triple 17 ®) was added weekly. We carefully selected *T. latifolia* plants with similar weight (28.7 ± 5.4 g/ plant) and length (52.8 ± 4.9 cm) for the experiments described below.

2.2. Influence of Ca, Fe and Zn on Cd and Pb uptake by *T. latifolia* plants

We analyzed the effects of Ca, Fe and Zn on the removal and accumulation of Cd and Pb by *T. latifolia*. On day 0 (the beginning of the experiment), the *T. latifolia* plants ($n=3$) were placed individually in beakers with a nutrient solution containing 1 mM KNO_3 , 50 μM KCl, 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 8.31 μM FeSO_4 and 1.3 μM ZnSO_4 . On day 6, the nutrient solution was replaced with a solution containing 1 mM KNO_3 and 50 μM KCl supplemented with different concentrations of Ca (0, 0.33, 0.67 and 1 mM) added as nitrate, Fe(II) (0, 2.77, 5.54 and 8.31 μM) added as FeSO_4 or Zn (0, 0.43, 0.87 and 1.3 μM) added as ZnSO_4 . These concentrations were determined according to the composition of nutrient solutions reported for plants (Cohen et al., 1998; Hart et al., 1998). The effect of removing a nutrient (Ca, or Fe or Zn) from the nutrient solution did not significantly affect the plant growth and was verified previously to the exposure experiments with varying concentrations of Ca, Fe or Zn (results not shown). The experimental design was a complete random factorial design, in which the concentration of one metal (Ca, Fe or Zn) varied as the other two were maintained constant. The calcium concentrations used were 0, 0.33, 0.67 and 1 mM with 8.31 μM Fe and 1.3 μM Zn. When the Fe concentrations were varied, the Ca and Zn concentrations were maintained at 1 mM and 1.3 μM , respectively, whereas in the case of Zn, the Ca and Fe concentrations were maintained at 1 mM and 8.31 μM , respectively. The solutions were replaced on day 10 with fresh solutions containing Ca, Fe and Zn at the same concentrations as those used on day 6 and supplemented with 10 μM Cd or 10 μM Pb. The plants were exposed to the solutions containing Cd or Pb for 10 days. The solutions' pH (including the controls) was buffered to 5.7-6 with 2 mM MES (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid) buffer. Samples of the experimental solutions were collected on days 0, 1, 5 and 10. The metal solutions were prepared using $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ or $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ salts (Fluka Chemical Co., Milwaukee, WI, USA). Previously, Alonso-Castro et al. (2009) found that the relative plants' growth exposed to 7.5 mg L^{-1} Cd or Pb was not significantly affected compared with control plants not exposed to the metals. Additionally, the levels of chlorophyll *a* and *b* and the *a/b* ratio, which were determined using the method proposed by Bruinsma (1963), demonstrated that the experimental solutions did not affect plant growth during the acclimation and experimental periods (data not shown). Samples of the experimental solutions (5 mL each) were collected in triplicate and acidified with 0.02 N HNO_3 (20 $\mu\text{L mL}^{-1}$). The concentrations of Cd and Pb were determined by

Atomic Absorption Spectrophotometry using an air–acetylene flame AAS-F (Varian SpectrAA 220FS).

The experimental solutions were modeled at the beginning of the experiments to predict the Cd and Pb speciation and to verify that these metals were in their dissolved form and available for the plants. For this purpose, the chemical model used was MINEQLver.4.5 (Schecher and McAvoy, 2003). In addition, the nutrient solutions were centrifuged (3,000 rpm, 10 min) to remove any precipitate. Lead (Pb) and Cd were analyzed by AAS-F (Varian SpectrAA 220Z), and the results indicated that there was no precipitation of these metals in the nutrient solutions. Controls were simultaneously performed by adding metal solutions to polyethylene bottles without plants to verify the adsorption of the metals to the bottle walls.

2.3. Distribution of metals in the plants

As determined by Zhu et al. (1999), metals can bind to negatively charged sites on the roots due to their Cationic Exchange Capacity (CEC) and contribute to the overall removal of these elements from the solutions. We estimated the fraction of metals adsorbed by the roots. After 10 days from being exposed, the plants were removed from the solutions, rinsed with deionized water and washed in 0.5% HNO₃ during 5 min to remove any metals adsorbed to the roots. The root integrity after the acid washing was not verified, therefore the fraction of Cd or Pb adsorbed using this procedure depends on the operational conditions applied to leach the metals from the root surface. Later, the plants were cut to obtain the roots and leaves as separate samples, and these were oven-dried (18 h at 70°C) and acid-digested to determine the fractions of Cd and Pb accumulated by *T. latifolia*. Blanks, plant samples and a reference plant material *Lagarosiphon major* (CBR, Reference material No. 60) were digested in triplicate using HNO₃ (4 d, 100 µL / 2 mg of sample) and 30% H₂O₂ (1 d, 0.5 mL). The detailed procedure was reported by Carranza-Álvarez et al. (2008). The samples and blanks were analyzed in triplicate to determine the accuracy of the determinations. The metals in the HNO₃ solutions (adsorbed fraction) and in the acid solutions from digested plant samples (accumulated fraction) were determined by AAS-F or AAS-GF. The recovery of Cd and Pb in the reference digested plant sample ranged from 90% to 110%.

2.4. PCR amplification and sequencing of *TITPC1*

We previously cloned and sequenced a Ca^{2+} -channel cDNA of *Vetiveria zizanioides* (*VzTPC1*) with Accession No. JX897057. From the obtained sequence, we designed the primers TPC F2 (5' TCATCGACACTAACGGTCTG 3') and TPC R2 (5' AGAAAAGGAAGCGTTGATGGG 3').

These primers were used for amplifying a fragment of *TPC1* of *T. latifolia*. To this end, the RNA from the plants was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The RNA obtained was treated with 1 μL of amplification-grade DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and then quantified using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher, Scientific, USA). A mass of 100 ng of treated RNA was used for cDNA synthesis (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1 μL of the cDNA obtained was used for each PCR. The PCR cycling program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, alignment at 55°C for 30 s and elongation at 72°C for 1 min and a final cDNA extension at 72°C for 3 min. This procedure allowed us to obtain a defined PCR product of 513 bp.

The amplified PCR product from *T. latifolia* was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's protocol and sequenced with the universal primer M13. Automated sequencing was conducted using a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each sequence obtained was analyzed using the Blast program of NCBI-BLAST (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.5. Design of specific primers

Specific primers were designed based on the cDNA sequence obtained for *T. latifolia TPC1*. The primers TPC1-Ty-F (5' GGA ACTATGGCAAGAGGTTG 3') and TPC1-Ty-R (5' GGGAGCAATAGACACAGAGAAC 3') were used to amplify a cDNA fragment of 362 bp. The PCR reaction was carried out under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, 31 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, alignment at 55°C for 30 s, elongation at 72°C for 30 s and a final single extension at 72°C for 3 min

2.6. Expression analysis

We analyzed the effect of Ca, Cd and Pb on the expression of *TPC1* cDNA in cattail tissues with respect to both time and concentration. The *T. latifolia* plants (n=3, per treatment) were acclimated for ten days in a nutrient solution named solution A [1 mM KNO₃, 50 μM KCl, 8.31 μM FeSO₄ and 1.3 μM ZnSO₄]. After the acclimation period, the plants were washed with deionized water, and the nutrient solution was replaced with the different experimental solutions described below. All reagents were from purchased Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

First, we analyzed the effect of the presence or absence of Ca in the nutrient solution on *TPC1* expression in the *T. latifolia* leaves and roots [solution A and solution A supplemented with 1 mM Ca(NO₃)₂]. Samples of the leaves and roots were collected at 0, 2, 4 and 8 h (n=3, 24 total plants). We determined that 4 h was sufficient for stimulation of *TITPC1* cDNA in the root. We then investigated the effects of varying the concentration of Ca, Cd and Pb ions on the expression of *TPC1* in the roots. To this end, different concentrations of Ca, Cd and Pb were added individually to solution A (n=10). The concentrations of Ca were varied from 0 to 1 mM, and Cd and Pb were added at concentrations ranging from 0 to 50 μM. The roots of the plants exposed to each solution were collected after 4 h of exposure to the metal solutions. Through chlorophyll a/b measurements, we confirmed that the metals did not affect the growth of the plants (data not shown). Chemical modeling was performed to predict the speciation and availability of the metals, as described in section 2.2.

The *TITPC1* expression was measured by semi-quantitative RT-PCR analysis. The expression levels were normalized to those of ACTIN1 (Accession No. NM_001155179.1). The PCR products were analyzed on 1% agarose gels, and the band intensities were quantified using the LabWorks® software.

2.7. Statistical analysis

The comparisons between the treatments were performed using ANOVA followed by Tukey's multiple range tests. The results were considered significantly different when the calculated p-values were less than 0.05. All of the calculations were performed employing the GraphPad InStat™ Software.

3. Results and discussion

3.1. Influence of Ca, Fe and Zn on Cd and Pb uptake by *T. latifolia* plants

An equimolar concentration of Cd or Pb (10 μ M) was added to solutions with varying concentrations of Fe, Ca or Zn, and the concentrations were monitored throughout the experiments (Fig. 1). After 10 days exposure, the removal of Cd or Pb was not significantly different between the treatments with Fe or Zn and reached 69-80% for Cd and 89-92% for Pb (Figs. 1A, 1B, 1E and 1F). A similar behavior was observed for Pb when the plants were exposed to solutions containing different concentrations of Ca; *T. latifolia* was able to remove 86-92% of Pb ($p > 0.05$; Fig. 1C). In contrast, the removal of Cd was dependent on the Ca concentration: *T. latifolia* removed 96, 80, 69 and 72% of the total Cd in the presence of Ca concentrations of 0, 0.33, 0.67 and 1 mM, respectively (Fig. 1D). The Cd removal from the solutions without Ca was significantly greater than that obtained with the other treatments with Ca throughout the experiment ($p < 0.05$).

The results showed differences on the removal kinetics between Cd and Pb; the removal of Pb from the solutions was higher and proceeded slightly faster than Cd in the treatments with Ca, Fe and Zn (except in the Cd solutions without Ca).

In addition to Cd and Pb, the concentrations of Ca, Fe and Zn in the solutions to which the plants were exposed were determined. The concentrations of Ca and Zn did not vary significantly with respect to the initial concentration ($p > 0.05$; data not shown). Lyubenova et al. (2012) reported a displacement of Ca from the epidermal to the cortical tissues in *T. latifolia* plants treated with Pb. These results could explain the constant Ca concentrations obtained in the experimental solution throughout our experiment.

After one day of treatment, an increase in the Fe concentration was observed in all the solutions where the plants were exposed to Pb or Cd with Ca, Fe or Zn; this effect was more evident when the plants were exposed to Pb (Fig. 2A, 2C and 2E). Thereafter, the Fe concentration decreased to a level similar to that obtained on day 0; this effect was more evident in the treatments with Cd (Figs. 2B, 2D and 2F). Bienfait et al. (1985) proposed that, under aerated conditions, iron is oxidized and precipitates as hydroxide or phosphate salts, forming an apoplastic iron pool in the roots of bean, maize and chlorophytum. This pool comprises up to 95% of the total content of Fe in the plants' root in hydroponic culture (Becker et al., 1995). Furthermore, Lyubenova et al. (2012) attributed the co-localization of S and P compounds at sites where Pb is accumulated to their interaction and thus the formation of stable complex with phosphates, sulfates or thiols in the cell walls of *T.*

latifolia plants. It is likely that the accumulation of Pb and Cd in cell walls promotes the release of Fe from phosphate salts, increasing its concentration in the nutrient medium.

The influence of Ca, Fe and Zn on the distribution of Cd and Pb in the adsorbed, root and shoot fractions of the plant was analyzed. Figure 3 shows the contents of Pb and Cd adsorbed to the roots and accumulated by the roots and shoots of plants exposed to the toxins at a concentration of 10 μM in combination with varying concentrations of Fe, Ca or Zn in batch experiments. The contents of Pb and Cd ranged from 28 to 38% and from 21 to 33% of the total Pb and Cd initially added to the experimental solutions, respectively, in the adsorbed fraction, from 50 to 77% and from 42 to 71% of the total Pb and Cd initially added to the experimental solutions, respectively, in the root fraction and from 4 to 14% and from 6 to 16% of the total Pb and Cd initially added to the experimental solutions, respectively, in the shoot fraction. The total Pb and Cd mass concentrated in the roots (adsorbed + accumulated fractions) indicated that the plants concentrated these metals significantly more in the roots than in the shoots in the overall treatments ($p < 0.05$; Fig. 3). The cell wall immobilization of Pb and Cd and the sequestration of metals in root cells have been reported previously as a tolerance mechanism in plants (Taylor and Crowder, 1983; Ye et al., 1998; Ramos et al., 2002; Lyubenova et al., 2012).

Plant cells have developed different strategies to cope with heavy metal stress and to limit the toxic effects of heavy metals. One of these strategies could involve the sequestration of metals into root cells and thus the avoidance of the free transport of the toxin to the shoots (Hossain et al., 2012). Lyubenova et al. (2012) reported that Pb is mainly accumulated in the epidermal tissues of the root and rhizomes of *T. latifolia* treated with 250 μM Pb in batch experiments. Previous studies have shown Pb depots on the cell walls, vacuoles, endoplasmatic reticulum and cytoplasm (Samardakiewicz and Woźny, 2000; Sharma and Dubey, 2005). In contrast, Cd has been detected in the chloroplasts and vacuoles (Ramos et al., 2002; DalCorso et al., 2008).

The accumulation of Cd and Pb by the plants did not show significant differences between the treatments with varying concentrations of Zn (Figs. 3E and 3F). It is likely that the Zn concentrations were quite low (0.43-1.3 μM) with respect to that of Cd and Pb (10 μM) and that a significant interaction between the metals was thus not detected.

Increased Fe concentrations induce formation of iron plaque on the root surface of wetland plants as *Typha latifolia* grown in solution culture or from the field (Taylor et al., 1984; Tripathi et al., 2014) which may affect the uptake of heavy metals. Taylor and coworkers

(1984) reported that at pH above 4.6, oxidation of Fe(II) in the culture solution could contribute to the iron plaque formation on the external cell of the root surface of *Typha latifolia*. Ye and coworkers (1998) studied the role of the iron plaque in the uptake and translocation of Zn, Cd and Pb in seedlings of *Typha latifolia* with and without iron plaque and observed that roots with plaque absorbed more Pb, but less Cd, than those without plaque. The presence of plaque did not alter metal translocation in seedlings. Ye et al. (1998) concluded that the root tissue rather than the root surface or plaque explained the Pb and Cd taken up by the seedling proposing that the root tissue is the main barrier for Pb and Cd transport.

Oxidation of Fe(II) to Fe(III) could favor the formation of an iron plaque on the root surface of *Typha latifolia* due to the experimental conditions used in this work (pH 5.7-6.0, Fe(II) 8.3 μ M) and play a role in the Pb adsorption on the root; this has not affected the uptake of Cd, according to our results. The concentration of Pb adsorbed to the roots increased with an increase in Fe in the solution, even if the differences between the treatments are not significant ($p > 0.05$; Fig. 3A). In contrast, the fraction of Pb accumulated by the roots and shoots of plants exposed to the experimental solutions without Fe was significantly greater than that obtained in the plants exposed to nutrient solutions with Fe at the concentrations of 5.54 and 8.3 μ M ($p < 0.05$; Fig. 3A). Also, studies on the expression of the plasma membrane Fe²⁺ transporter (*IRT1*) cloned from *Arabidopsis thaliana*, *Thlaspi caerulescens* and *Solanum lycopersicum* have demonstrated that the transport and accumulation of divalent metals, may be facilitated under Fe-limitation conditions and that the expression of *IRT1* is induced under these conditions (Cohen et al., 1998; Lombi et al., 2002; Luo et al., 2012). No differences were observed in the content of Cd in the experiments with varying concentrations of Fe (Fig. 3B).

In the treatments with Ca, the contents of Pb and Cd adsorbed to the root increased with an increase in the Ca concentrations in the nutrient solutions; however, no significant differences were found between the treatments (Figs. 3C and 3D; $p > 0.05$). In contrast, the accumulated fractions of Pb and Cd in the roots and shoots were significantly higher in the plants exposed to nutrient solutions without Ca ($p < 0.05$; Figs. 3C and 3D). Thus, Ca can affect the internalization of Pb and Cd by *T. latifolia* and promote the adsorption of these metals to the roots. Similar results were reported for Cd accumulation in chamomile and lettuce and for Pb accumulation in maize, rye, tomato and mustard (Antosiewicz, 2005; Zorring et al., 2012; Farzadfar et al., 2013); these researchers reported a decrease

in the Cd and Pb uptake with an increase in the Ca concentration in the medium and demonstrated that the application of Ca can alleviate cadmium toxicity in plants and decrease Cd accumulation in edible plants. Our results suggest a competition between Ca and both Cd and Pb by the transport proteins in *T. latifolia* responsible for the internalization of these metals.

Reports on the mechanistic basis of Cd and Pb uptake have proposed that Pb^{2+} and Cd^{2+} may compete with Ca^{2+} for the proteins responsible for their transport into the roots of *O. sativa*, *T. caerulea* and *L. sativa* plants (Kim et al., 2002; Zhao et al., 2002; Zorring et al., 2012). As demonstrated by Huang and Cunningham (1996) and Sunkar et al. (2000), the internalization of Ca^{2+} and Pb^{2+} may be mediated by cyclic nucleotide-gated CBP4 in tobacco and by Ca^{2+} channels in wheat. Antosiewicz and Henning (2004) proposed that a low-affinity cation transporter (*LCT1*) mediates the transport and accumulation of Ca and Cd in wheat. Moreover, Wojas et al. (2007) proposed the participation of *LCT1* and Ca in the detoxification mechanism of Pb.

Various Ca^{2+} -permeable channels exist, and electrophysiological studies have demonstrated that these channels are also permeable to divalent cations, such as Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} (White and Broadley, 2003). However, the identity of the genes encoding Ca^{2+} -channels in the membranes of plant cells remains under investigation. In recent years, candidates for the voltage-dependent Ca^{2+} channel encoding gene family, namely two-pore channels (TPCs), have been identified (Furuichi et al., 2001; Hashimoto et al., 2004; Kadota et al., 2004; Kurusu et al., 2004; Wang et al., 2005). Although the physiological function of TPCs in plants has been debated (Pottosin and Schönknecht, 2007; Hedrich and Marten, 2011; Kurusu et al., 2012), TPC1 has been implicated in Ca^{2+} permeation through the plasma membrane (PM) or in the accumulation of Ca in the vacuoles of plants (Beyhl et al., 2009; Gilliam et al., 2011; Hamada et al., 2012; Kurusu et al., 2012). Different studies have suggested that Cd^{2+} can mimic Ca^{2+} , and a similar effect is observed in plant cells, where the TPC1 channel may be involved (Allen et al., 2001; Perfus-Barbeoch et al., 2002; Peiter et al., 2005; Islam et al., 2010). Moreover, Hashimoto et al. (2004) reported that rice TPC1 is structurally similar to the voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) of animal cells. These proteins have been related to the permeation of Cd^{2+} and Pb^{2+} in mammalian cells (Marchetti, 2013).

Based on the above-described results, we cloned and sequenced the TPC1 cDNA of *Typha latifolia* and analyzed the expression of the *TPC1* gene in response to changes in

the Ca, Cd and Pb concentrations in the experimental solutions to which the plants were exposed.

3.2. Cloning and sequencing of *TITPC1*

A *TITPC1* cDNA was cloned and sequenced. The RT-PCR amplification of a putative Ca²⁺ channel of *Typha latifolia* resulted in a cDNA fragment of 513 base pairs (bp) (Accession KF511802) that encodes for 171 amino acids with a calculated molecular mass of 20.2 kDa. The sequence homology results showed 80% similarity with the putative Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel TPC1 (mRNA for TPC1) from *Zea mays* (Accession EU954499), 78% similarity with that from *Oryza sativa* (Accession AB071014) and 77% similarity with that from *Triticum aestivum* (Accession AY114121); the data are presented in Table 1. The comparison of the cDNA comparison isolated from *T. latifolia* with the data presented in Table 1 confirms its homology to *TPC1* from monocotyledonous and dicotyledonous plants.

The cellular localization of *TPC1* in plants has been studied and debated. Molecular and electrophysiological studies have shown that *Arabidopsis* TPC1 is mainly localized at the tonoplast, where it functions as a slow vacuolar cation channel (SV channel) (Peiter et al., 2005; Schulze et al., 2011). In contrast, it has been suggested that TPCs in monocotyledons are plasma membrane calcium-permeable channels (Hamada et al., 2012; Kurusu et al., 2012). However, the expression of rice *OsTPC1* and wheat *TaTPC1* in the model plant *Arabidopsis* TPC1-2 mutant cells has suggested that the *TPC1* gene from monocotyledons plants encodes an endomembrane cation channel (Dadacz-Narloch et al., 2013).

In general, *TPC1* localized in the plasma membrane or tonoplast (i.e., slow vacuolar channel) has been implicated in a number of roles, including signaling and ion homeostasis (Peiter et al., 2005; Pottosin and Schönknecht, 2007; Senadheera et al., 2009; Hedrick and Marten, 2011; Kurusu et al., 2012). Gillihan et al. (2011) hypothesized that *TPC1* may be involved in Ca accumulation in plant cells. Pottosin and Schönknecht (2007) described that the *TPC1* channel in plants is activated with an increased concentration of Ca²⁺ in the cytoplasm but inactivated with an increase in the Ca²⁺ concentration in the vacuole. Moreover, Rienmüller et al. (2010) and Gilliam et al. (2011) proposed that the transcript abundance of *TPC1* is positively correlated to the channel's activity. Based on the above-described findings, we investigated the concentration's effect

of Ca on *TPC1* expression and its correlation with *TPC1* expression in *T. latifolia* roots exposed to Cd and Pb.

3.3. Effect of Ca, Cd and Pb on *TPC1* gene expression in *T. latifolia*

To determine the presence of *TITPC1* in the roots and leaves and the influence of Ca^{2+} concentration on *TITPC1* expression, *T. latifolia* plants were exposed to solutions containing 0 or 1 mM Ca, and the expression of *TITPC1* in sections of the roots and shoots collected at different times was determined. The results showed that *TITPC1* was expressed in the leaves and roots of *T. latifolia* (Fig. 4). In the roots, a similar expression level of *TITPC1* was observed at the beginning of the experiment, regardless of the presence of Ca. An increase in *TITPC1* expression was detected in the *T. latifolia* roots after 2 h of incubation in a nutrient solution with Ca, and this increase was statistically significant ($p < 0.05$) (Fig. 4A). The presence and absence of Ca in the nutrient solution differentially stimulated *TITPC1* only in the roots, whereas the expression of the *TITPC1* gene in the leaves was constant and independent from the presence of Ca in the nutrient solution (Fig. 4B). Previous studies have demonstrated that *TPC1* is ubiquitously expressed in all tissues of *Arabidopsis* and rice (Furuichi et al., 2001; Kurusu et al., 2004). No related studies with *T. latifolia* were found. Wang et al. (2005) found that *TaTPC1* can be induced in the roots but not in the wheat seedlings' shoots and that this induction of *TaTPC1* occurred in response to stimuli from the soil, such as increased salinity and water stress. In the present work, likely due to the short exposure time used, the concentration of Ca did not vary in the shoots, and a change in *TPC1* expression was thus not observed. Hence, we analyzed the effect of increasing concentrations of Ca, Cd and Pb on the expression of *TITPC1* in the roots of *T. latifolia* plants. Fig. 5 shows the *TITPC1* expression results obtained during the plants' exposure to Ca, Cd or Pb. Linear regression was performed, and the correlation coefficients (r) between the Ca, Cd or Pb treatments and the differential expression of *TITPC1* were 0.8793, 0.8628 and 0.8446, respectively (Fig. 5). The high correlations observed showed that the expression of *TITPC1* is related to the presence and concentration of Ca, Cd or Pb in the nutrient solution. Our results suggest that, due to their similar chemical properties, Cd and Pb may mimic Ca; therefore, a similar effect on *TITPC1* expression was observed. It would be interesting to analyze whether different cations other than divalent ions, such as monovalent ions, could cause a similar behavior in *TITPC1* expression or not. Rienmüller et al. (2010) and Gillihan et al. (2011)

reported a negative correlation between *TPC1* expression and Ca accumulation in vacuoles and a positive correlation between the expression of *TPC1* and the activity of *TPC1* in *Arabidopsis thaliana*. These findings could explain our results, which showed that a low Ca concentration in the nutrient medium results in a higher accumulation of Cd and Pb in the plant tissues (Figs. 3C and 3D) and that the expression of *TPC1* was low under these conditions (Fig. 5A).

Recent reports indicate that *TPC1/SV* may represent a potential tool for the investigation of calcium storage in plants by Ca^{2+} transport through the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters *CAX1/CAX3* as an attempt to achieve Ca biofortification in food crops (Beyhl et al., 2009; Gilliam et al., 2011). Hirschi et al. (2000) determined that tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing *CAX1/CAX2* accumulated more Ca^{2+} , Cd^{2+} and Mn^{2+} . Therefore, this feature may form the basis for engineering plants capable of accumulating Cd^{2+} and Pb^{2+} instead to Ca^{2+} .

The results presented in this work may indicate a possible role for *TITPC1* in the influx of Cd^{2+} and Pb^{2+} because the channel is located in the plasma membrane. In contrast, Cd^{2+} and Pb^{2+} , similarly to Ca^{2+} , could activate vacuolar *TPC1/SV* and promote ion transport across tonoplast. Further research on cellular localization using a *TITPC1*-green fluorescent protein and direct measurements using electrophysiological techniques are needed for the conclusive identification of *TITPC1* as a voltage-activated inward-rectifying Ca^{2+} channel and its role in Cd and Pb permeation and/or accumulation in plants.

4. Conclusions

Lead accumulation was increased in *T. latifolia* plants grown under Fe-deficiency conditions. Similarly, the removal and accumulation of Cd and Pb by *T. latifolia* plants were found to be regulated by the concentration of Ca in the medium because the total Cd or Pb (adsorbed + accumulated) removed by the plants was greater under Ca-deficiency conditions. According to these results, the influence of Fe or Ca on the removal of Pb, and Ca on the removal of Cd likely occurs through mechanisms involving the uptake of these heavy metals that are similar to those for Fe or Ca. We analyzed the participation of a Ca^{2+} -channel, namely *TPC1*, on Cd and Pb uptake by *T. latifolia* plants, and our results showed that Cd and Pb induced *TITPC1* expression in cattail roots. Moreover, a similar correlation was observed between Ca, Cd or Pb and *TITPC1* expression, indicating that the participation of a Ca^{2+} -channel in the uptake of Cd or Pb is likely in *T. latifolia*.

These results are important in the context of phytoremediation and contribute to the understanding of the mechanistic details of Cd and Pb transport and accumulation by *T. latifolia*, thereby forming a basis for future investigations on the improvement of phytoremediation through genetic engineering technologies.

Acknowledgments

This study was supported by CONACYT Grant No. J-2007-84962 and grants from the PROMEP-RED for the UASLP-CA37 and CONACYT-90228. Rodriguez-Hernandez M.C. acknowledges a PhD fellowship from CONACyT No. 201755. The authors are also greatly thankful to Dr. Gerardo Argüello-Astorga for supplying the laboratory equipment.

References

- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., Schoroeder, I.J., 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*. 411, 1053–1057. DOI: [10.1038/35082575](https://doi.org/10.1038/35082575)
- Alonso-Castro, A.J., Carranza-Álvarez, C., Alfaro-De la Torre, M.C., Chávez-Guerrero, L., García-De la Cruz, R.F., 2009. Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 688–696. DOI: [10.1007/s00244-009-9351-6](https://doi.org/10.1007/s00244-009-9351-6)
- Antosiewicz, D.M., 2005. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ. Pollut.* 134, 23–34. DOI: [10.1016/j.envpol.2004.07.019](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.019)
- Antosiewicz, D.M., Henning, J., 2004. Overexpression of *LCT1* in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.* 129, 237–245. DOI: [10.1016/j.envpol.2003.10.025](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.10.025)
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H., 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* 20, 171–182. DOI: [10.1046/j.1365-313x.1999.00588.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00588.x)
- ATSDR, 2011. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Priority List of Hazardous Substances. Division of Toxicology and Human Health Sciences. Atlanta, Georgia, USA.
- Bareen, F., Khilji, S., 2008. Bioaccumulation of metals from tannery sludge by *T. angustifolia* L. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3314–3320. DOI: [10.5897/AJB08.220](https://doi.org/10.5897/AJB08.220)
- Becker, R., Fritz, E., Manteuffel, R., 1995. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiol.* 108, 269–275. DOI: [10.1104/pp.108.1.269](https://doi.org/10.1104/pp.108.1.269)
- Beyhl, D., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Farmer, E.E., Fromm, J., Marten, I., Hedrich, R., 2009. The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel *TPC1* confers tolerance to inhibitory luminal calcium. *Plant J.* 58, 715–723. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2009.03820.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03820.x)
- Bienfait, H.F., van den Briel, W., Mesland-Mul, N.T., 1985. Free space iron pools in roots. Generation and mobilization. *Plant Physiol.* 78, 596–600. DOI: [10.1104/pp.78.3.596](https://doi.org/10.1104/pp.78.3.596)
- Bonanno, G., 2013. Comparative performance of trace element bioaccumulation and biomonitoring in the plant species *Typha domingensis*, *Phragmites australis* and *Arundo donax*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97, 124–130. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2013.07.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.017)
- Bruinsma, J., 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem. Photobiol.* 2, 241–249. DOI: [10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x)
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A.J., Alfaro-De La Torre, M.C., García-De La Cruz, R.F., 2008. Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* 188, 297–309. DOI: [10.1007/s11270-007-9545-3](https://doi.org/10.1007/s11270-007-9545-3)
- Chen, Y.L., Hong, X.Q., He, H., Luo, H.W., Qian, T.T., Li, R.Z., Jiang, H., Yu, H.Q., 2014. Biosorption of Cr (VI) by *Typha angustifolia*: Mechanism and responses to heavy metal stress. *Bioresour. Technol.* 160, 89–92. DOI: [10.1016/j.biortech.2014.01.022](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.022)

- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12043–12048. DOI: [10.1073/pnas.95.20.12043](https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.12043)
- Cohen, C.K., Fox, T.C., Garvin, D.F., Kochian, L.V., 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116, 1063–1072. DOI: [10.1104/pp.116.3.1063](https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1063)
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P., Verbruggen, N., 2007. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol.* 144, 1052–1065. DOI: [10.1104/pp.106.095133](https://doi.org/10.1104/pp.106.095133)
- Curie, C., Alonso, J. M., Le Jean, M., Ecker, J. R., Briat, J. F., 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347, 749–755. DOI: [10.1042/0264-6021:3470749](https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470749)
- Dadacz-Narloch, B., Kimura, S., Kurusu, T., Farmer, E.E., Becker, D., Kuchitsu, K., Hedrich, R., 2013. On the cellular site of two-pore channel TPC1 action in the Poaceae. *New Phytol.* 200, 663–674. DOI: [10.1111/nph.12402](https://doi.org/10.1111/nph.12402)
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008. How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1268–1280. DOI: [10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x)
- di Toppi, L.S., Gabbriellini, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130. DOI: [10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative response to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Exp. Bot.* 52, 1101–1109. DOI: [10.1093/jexbot/52.358.1101](https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1101)
- Farzadfar, S., Zarinkamar, F., Modarres-Sanavy, S.A., Hojati, M., 2013. Exogenously applied calcium alleviates cadmium toxicity in *Matricaria chamomilla* L. plants. *plants.* 20, 1413-1422. DOI: [10.1007/s11356-012-1181-9](https://doi.org/10.1007/s11356-012-1181-9)
- Favas, P.J., Pratas, J., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M.S., 2014. Accumulation of uranium by aquatic plants in field conditions: prospects for phytoremediation. *Sci. Total Environ.* 470-471, 993-1002. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2013.10.067](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.067)
- Flathman, P.E., Lanza, G.R., 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J. Soil Contam.* 7, 415–432. DOI: [10.1080/10588339891334438](https://doi.org/10.1080/10588339891334438)
- Furuichi, T., Cunningham, K.W., Muto, S., 2001. A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol.* 42, 900–905. DOI: [10.1093/pcp/pce145](https://doi.org/10.1093/pcp/pce145)
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 83, 33–46. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006)
- Gilliham, M., Athman, A., Tyerman, S.D., Conn, S.J., 2011. Cell-specific compartmentation of mineral nutrients is an essential mechanism for optimal plant productivity-another role for TPC1? *Plant Signal. Behav.* 6, 1656-1661. DOI: [10.4161/psb.6.11.17797](https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17797)

- Hadad, H.R., Mufarrege, M.M., Pinciroli, M., Di Luca, G.A., Maine, M.A., 2010. Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 666–675. DOI: [10.1007/s00244-009-9454-0](https://doi.org/10.1007/s00244-009-9454-0)
- Hamada, H., Kurusu, T., Okuma, E., Nokajima, H., Kiyoduka, M., Koyano, T., Sugiyama, Y., Okada, K., Koga, J., Saji, H., Miyao, A., Hirochika, H., Yamane, H., Murata, Y., Kuchitsu, K., 2012. Regulation of a proteinaceous elicitor-induced Ca^{2+} influx and production of phytoalexins by a putative voltage-gated cation channel, OsTPC1, in cultured rice cells. *J. Biol. Chem.* 287, 9931–9939. DOI: [10.1074/jbc.M111.337659](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337659)
- Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A., Sullivan, L.A., Kochian, L.V., 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116, 1413–1420. DOI: [10.1104/pp.116.4.1413](https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1413)
- Hashimoto, K., Saito, M., Matsuoka, H., Iida, K., Iida, H., 2004. Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene CCH1. *Plant Cell Physiol.* 45, 496–500. DOI: [10.1093/pcp/pch053](https://doi.org/10.1093/pcp/pch053)
- He, J.Y., Ren, Y.F., Wang, F.J., Pan, X.B., Zhu, C., Jiang, D.A., 2009. Characterization of cadmium uptake and translocation in a cadmium-sensitive mutant of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 299–306. DOI: [10.1007/s00244-008-9273-8](https://doi.org/10.1007/s00244-008-9273-8)
- Hedrich, R., Marten, I., 2011. TPC1-SV channels gain shape. *Mol. Plant.* 4, 428–441. DOI: [10.1093/mp/ssp017](https://doi.org/10.1093/mp/ssp017)
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., Wagner, G.J., 2000. Expression of Arabidopsis CAX2 in Tobacco. Altered Metal Accumulation and Increased Manganese Tolerance. *Plant Physiol.* 124, 125–134. DOI: [10.1104/pp.124.1.125](https://doi.org/10.1104/pp.124.1.125)
- Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. bot.* 2012, 1–37. DOI: [10.1155/2012/872875](https://doi.org/10.1155/2012/872875)
- Huang, J.W., Cunningham, S.D., 1996. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134, 75–84. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1996.tb01147.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01147.x)
- Induri, B.R., Ellis, D.R., Slavov, G.T., Yin, T., Zhang, X., Muchero, W., Tuskan, G.A., DiFazio, S.P., 2012. Identification of quantitative trait loci and candidate genes for cadmium tolerance in *Populus*. *Tree Physiol.* 32, 626–638. DOI: [10.1093/treephys/tps032](https://doi.org/10.1093/treephys/tps032)
- Islam, M.M., Munemesa, S., Hossain, M.A., Nakamura, Y., Mori, I.C., Murata, Y., 2010. Roles of AtTPC1, vacuolar two pore channel 1, in Arabidopsis stomatal closure. *Plant Cell Physiol.* 51, 302–311. DOI: [10.1093/PCP/PCQ001](https://doi.org/10.1093/PCP/PCQ001)
- Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S., Kuchitsu, K., 2004. Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 823–830. DOI: [10.1016/j.bbrc.2004.03.114](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.114)
- Kim, Y.Y., Yang, Y.Y., Lee, Y., 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116, 368–372. DOI: [10.1034/j.1399-3054.2002.1160312.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160312.x)

- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M. L., Pakrasi, H.B., 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* 40, 37–44. DOI: [10.1023/A:1026438615520](https://doi.org/10.1023/A:1026438615520)
- Kurusu, T., Hamada, H., Koyano, T., Kuchitsu, K., 2012. Intracellular localization and physiological function of a rice Ca^{2+} - permeable channel OsTPC1. *Plant Signal. Behav.* 7, 1–3. DOI: [10.4161/psb.22086](https://doi.org/10.4161/psb.22086)
- Kurusu, T., Sakurai, Y., Miyao, A., Hirochika, H., Kuchitsu, K., 2004. Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (OsTPC1) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol.* 45, 693–702. DOI: [10.1093/pcp/pch082](https://doi.org/10.1093/pcp/pch082)
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., Morel, F.M.M., 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature.* 435, 4–42. DOI: [10.1038/435042a](https://doi.org/10.1038/435042a)
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J., Chen, R., 2013. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol.* 13, 114. DOI: [10.1186/1471-2229-13-114](https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-114)
- Lombi, E., Tearall, K., Howarth, J., Zhao, F.J., Hawkesford, M., McGrath, S., 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 128, 1359–1367. DOI: [10.1104/pp.010731](https://doi.org/10.1104/pp.010731)
- Luo, B.F., Du, S.T., Liu, W.J., Lin, X.Y., Jin, C.W., 2012. Iron uptake system mediates nitrate-facilitated cadmium accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J. Exp. Bot.* 63, 3127–3136. DOI: [10.1093/jxb/ers036](https://doi.org/10.1093/jxb/ers036)
- Lyubenova, L., Pongrac, P., Vogel-Mikus, K., Mezek, G.K., Vavpetic, P., Grlj, N., Kump, P., Necemer, M., Regvar, M., Pelicon, P., Schröder, P., 2012. Localization and quantification of Pb and nutrients in *Typha latifolia* by micro-PIXE. *Metallomics.* 4, 333–341. DOI: [10.1039/c2mt00179a](https://doi.org/10.1039/c2mt00179a)
- Lyubenova, L., Pongrac, P., Vogel-Mikus, K., Mezek, G.K., Vavpetic, P., Grlj, N., Regvar, M., Pelicon, P., Schröder, P., 2013. The fate of arsenic, cadmium and lead in *Typha latifolia*: A case study on the applicability of micro-PIXE in plant ionomics. *J. Hazard. Mater.* 248–249, 371–378. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2013.01.023](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.023)
- Marchetti, C., 2013. Role of calcium channels in heavy metal toxicity. *ISRN Toxicol.* 2013, 1–9. DOI: [10.1155/2013/184360](https://doi.org/10.1155/2013/184360)
- Mills, R.F., Peaston, K.A., Runions, J., Williams, L.E., 2012. HvHMA2, a $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPase from Barley, Is Highly Conserved among Cereals and Functions in Zn and Cd Transport. *PLoS ONE.* 7(8), e42640. DOI: [10.1371/journal.pone.0042640](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042640)
- Papoyan, A., Kochian, L.V., 2004. Identification of *Thlaspi caerulescens* Genes That May Be Involved in Heavy Metal Hyperaccumulation and Tolerance. Characterization of a Novel Heavy Metal Transporting ATPase. *Plant Physiol.* 136, 3814–3823. DOI: [10.1104/pp.104.044503](https://doi.org/10.1104/pp.104.044503)
- Peiter, E., Maathuis, F.J.M., Mills, L.N., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., Sanders, D., 2005. The vacuolar Ca^{2+} - activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature.* 434, 404–408. DOI: [10.1038/nature03381](https://doi.org/10.1038/nature03381)

- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M, Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 4956–4960. DOI: [10.1073/pnas.97.9.4956](https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4956)
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. Plant J. 32, 539–548. DOI: [10.1046/j.1365-313X.2002.01442.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01442.x)
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 15–39. DOI: [10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214)
- Pottosin, I.I., Schönknecht, G., 2007. Vacuolar calcium channels. J. Exp. Bot. 58, 1559–1569. DOI: [10.1093/jxb/erm035](https://doi.org/10.1093/jxb/erm035)
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J., Gárate, A., 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd-Mn interaction. Plant Sci. 1, 761–767. DOI: [10.1016/S0168-9452\(02\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00017-1)
- Rienmüller, F., Beyhl, D., Lautner, S., Fromm, J., Al-Rasheid, K.A., Ache, P., Farmer, E.E., Marten, I., Hedrich, R., 2010. Guard cell-specific calcium sensitivity of high density and activity SV/TPC1 channels. Plant Cell Physiol. 51, 1548-1554. DOI: [10.1093/pcp/pcq102](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq102)
- Rodecap, K.D., Tingey, D.T., Lee, E.H., 1994. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. J. Environ. Qual. 23, 239–246. DOI: [10.2134/jeq1994.00472425002300020004x](https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300020004x)
- Samardakiewicz, S., Woźny, A., 2000. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. Plant Soil. 226, 107–111. DOI: [10.1023/A:1026440730839](https://doi.org/10.1023/A:1026440730839)
- Schecher, W.D., McAvoy, D.C., 2003. MINEQL+: a chemical equilibrium program for personal computers. User's manual. Version 3.0. Environ. Res. Software, Hallowell.
- Schulze, C., Stich, H., Meyerhoff, P., Dietrich, P., 2011. Differential contribution of EF-hands to the Ca²⁺-dependent activation in the plant two-pore channel TPC1. Plant J. 68, 424-432. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2011.04697.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04697.x)
- Senadheera, P., Sing, R.K., Maathuis F.J.M., 2009. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. J. Exp. Bot. 60, 255–2563. DOI: [10.1093/jxb/erp099](https://doi.org/10.1093/jxb/erp099)
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation, Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 78–84. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2010.08.037](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.037)
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol. 17, 35–52. DOI: [10.1590/S1677-04202005000100004](https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100004)
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, M., Sanders, D., Bouchez, D., Fromm, H., 2000. Expression of a truncated tobacco *NtCBP4* channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb²⁺ tolerance. Plant J. 24, 533–542. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2000.00901.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2000.00901.x)
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2011. Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. Plant Signal. Behav. 6: 1813–1816. DOI: [10.4161/psb.6.11.17587](https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17587)

- Taylor, G.J., Crowder, A.A., 1983. Uptake and accumulation of heavy metals by *Typha latifolia* in wetlands of the Sudbury, Ontario region. *Can. J. Bot.* 61, 63–73. DOI: [10.1139/b83-005](https://doi.org/10.1139/b83-005)
- Taylor, G.J., Crowder, A.A., Rodden, R., 1984. Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Typha latifolia* L. grown in solution culture. *Am. J. Bot.* 71(5), 666-675. DOI:
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 4991–4996. DOI: [10.1073/pnas.97.9.4991](https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4991)
- Tripathi, R.D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Kumar, A., Mishra, A., Chauhan, P. S., Norton, G. J., Nautiyal, C. S., 2014. Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants. *Metallomics.* 6, 1789-1800. DOI: [10.1039/C4MT00111G](https://doi.org/10.1039/C4MT00111G)
- Varga, A., Garcinuño-Martínez, R.M., Zárny, G., Fodor, F., 1999. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *Spectrochim. Acta B.* 54, 1455–1462. DOI: [10.1016/S0584-8547\(99\)00105-6](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(99)00105-6)
- Verret, F., Wheeler, G., Taylor, A.R., Farnham, G., Browlee, C., 2010. Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling. *New Phytol.* 187, 23-43. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2010.03271.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03271.x)
- Wang, Y.J., Yu, J.N., Chen, T., Zhang, Z.G., Hao, Y.J., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2005. Functional analysis of a putative Ca²⁺ channel gene *TaTPC1* from wheat. *J. Exp. Bot.* 56, 3051–3060. DOI: [10.1093/jxb/eri302](https://doi.org/10.1093/jxb/eri302)
- Weis, J.S., Weis, P., 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Int.* 30, 685–700. DOI: [10.1016/j.envint.2003.11.002](https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.11.002)
- White, P.J., Broadley, M.R., 2003. Calcium in Plants. *Ann. Bot.* 92, 487–511. DOI: [10.1093/aob/mcg164](https://doi.org/10.1093/aob/mcg164)
- Wojas, S., Rusczyńska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., Antosiewicz, D.M., 2007. Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by *LCT1*. *Environ. Pollut.* 147, 584–592. DOI: [10.1016/j.envpol.2006.10.012](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.012)
- Xiao, H., Yin, L., Xu, X., Li, T., Han, Z., 2008. The iron-regulated transporter, MbNRAMP1, isolated from *Malus baccata* is involved in Fe, Mn and Cd trafficking. *Ann. Bot.* 102, 881-889. DOI: [10.1093/AOB/MCN178](https://doi.org/10.1093/AOB/MCN178)
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1997. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytol.* 136, 469–480. DOI: [10.1046/j.1469-8137.1997.00759.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00759.x)
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J., 1998. Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aq. Bot.* 61, 55–67. DOI: [10.1016/S0304-3770\(98\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(98)00057-6)
- Zhao, F.J., Hamon, R.E., Lombi, E., McLaughlin, M.J., McGrath, S. P., 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 53, 535–543. DOI: [10.1093/jexbot/53.368.535](https://doi.org/10.1093/jexbot/53.368.535)

- Zhu, Y.L., Zayed, A.M., Qian, J.H., de Souza, M., Terry, N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J. Environ. Qual.* 28, 339–344. DOI: [10.2134/jeq1999.00472425002800010042x](https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800010042x)
- Zorring, W., Shahzad, Z., Abdelly, C., Berthomieu, P., 2012. Calcium enhances cadmium tolerance and decreases cadmium accumulation in lettuce (*Lactuca sativa*). *Afr. J. Biotechnol.* 11, 8441-8448. DOI: [10.5897/AJB11.2343](https://doi.org/10.5897/AJB11.2343)

TABLES

Table 1. Sequence homology of *TITPC1* cDNA with mono and dicotyledonous plants.

Species	GenBank number	Sequence homology	Type of sequence
<i>Zea mays</i>	EU954499	80%	mRNA for TPC1
<i>Oryza sativa</i>	AB071014	78%	mRNA for TPC1
<i>Triticum aestivum</i>	AY114121	77%	mRNA for putative calcium channel
<i>Hordeum vulgare</i>	AY465119	77%	mRNA for TPC1
<i>Ricinus communis</i>	XM_002517868	75%	mRNA for voltage-dependent L-type calcium channel
<i>Nicotiana tabacum</i>	AB124646	73%	mRNA for TPC1A
<i>Nicotiana tabacum</i>	AB124647	73%	mRNA for TPC1B
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XM_002874814	73%	mRNA for TPC1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AK316725	73%	mRNA for TPC1

The sequence alignment of cattail *TITPC1* cDNA was performed using the Blast program of NCBI-BLAST (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Figure legends

Fig. 1. Removal of Pb (A, C and E) and Cd (B, D and F) by *T. latifolia* exposed to nutrient solutions containing different concentrations of Fe, Ca or Zn. The data correspond to the means \pm SD from triplicate experiments.

Fig. 2. Iron concentration in the experimental solutions during the exposure of *T. latifolia* to Pb (A, C and E) or Cd (B, D and F) in nutrient solutions with varying concentration of Fe (A and B), Ca (C and D) or Zn (E and F).

Fig. 3. Distribution of Pb (A, C and E) and Cd (B, D and F) in the adsorbed and accumulated fractions (roots and shoots, respectively) of *T. latifolia* as a function of the Fe, Ca and Zn concentrations supplemented in the nutrient solutions. The results are presented as the means \pm SD from triplicate experiments. The asterisks indicate a significant difference with respect to the controls (0 μ M Ca, Fe or Zn) according to Tukey's test ($p < 0.05$).

Fig. 4. Expression of *TPC1* in cattail roots (**A**) and leaves (**B**) exposed to solutions with or without calcium. First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from the roots and amplified by RT-PCR. The data were normalized to *ACTIN1*. The error bars represent the mean values \pm SD ($n=3$). The statistical analysis of the data was performed using Tukey's test ($p < 0.05$).

Fig. 5. Effects of the Ca (A), Cd (B) and Pb (C) concentration on *TITPC1* expression in *T. latifolia* roots after 4 h of exposure to each treatment. First-strand cDNA was synthesized from the total RNA extracted from the roots and amplified by RT-PCR. The data were normalized to *ACTIN1*.

FIGURE 1

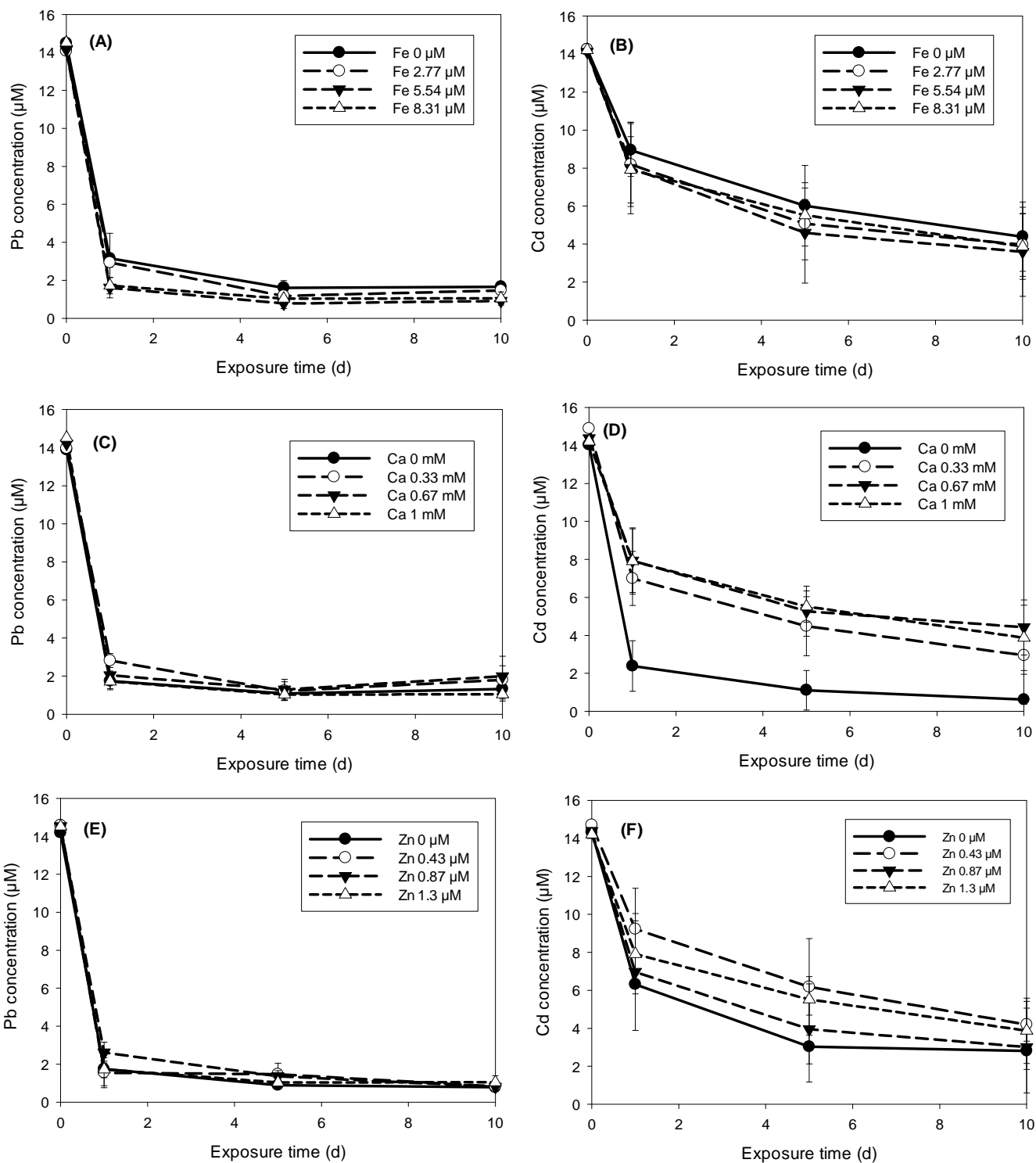


FIGURE 2

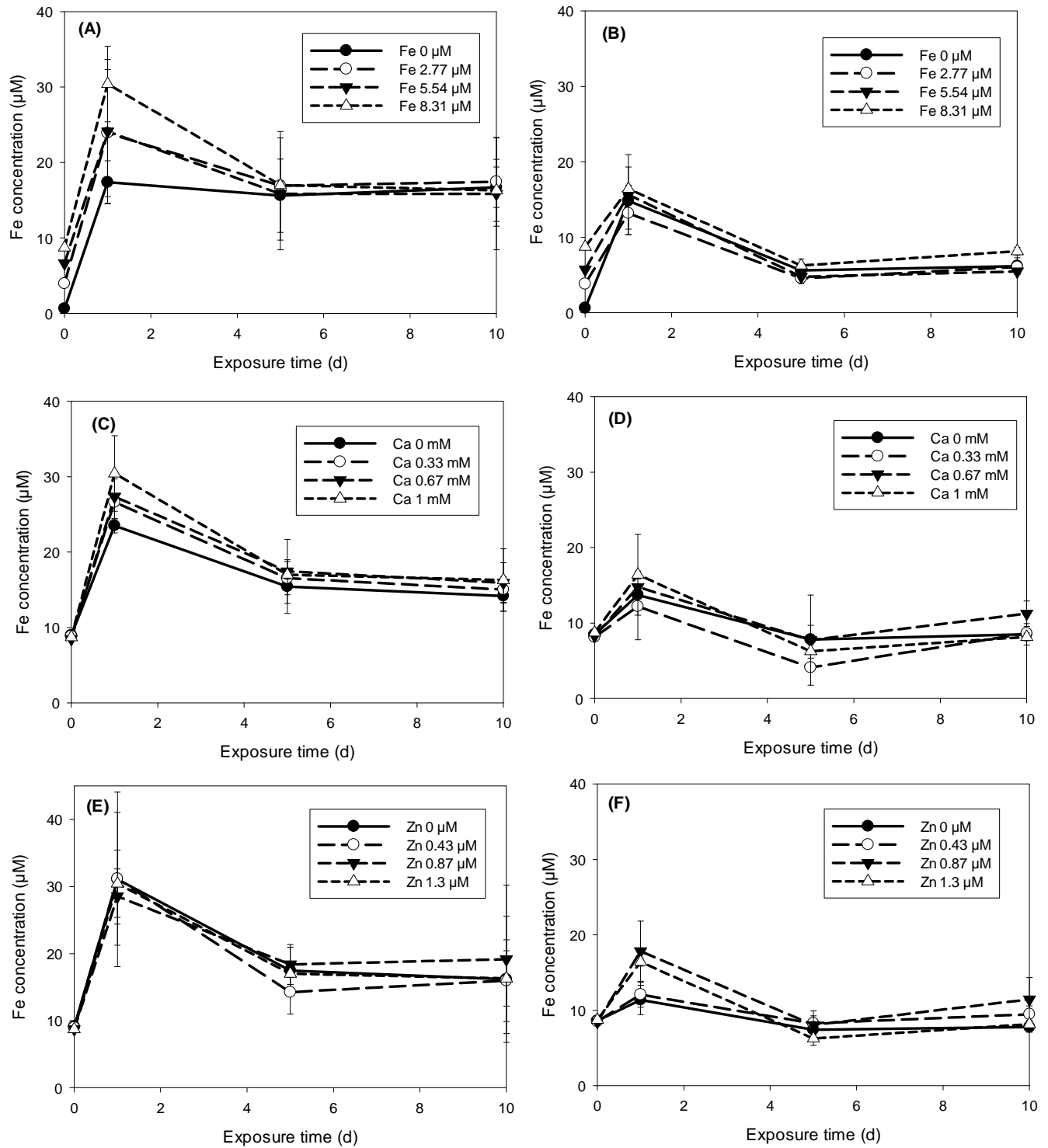


FIGURE 3

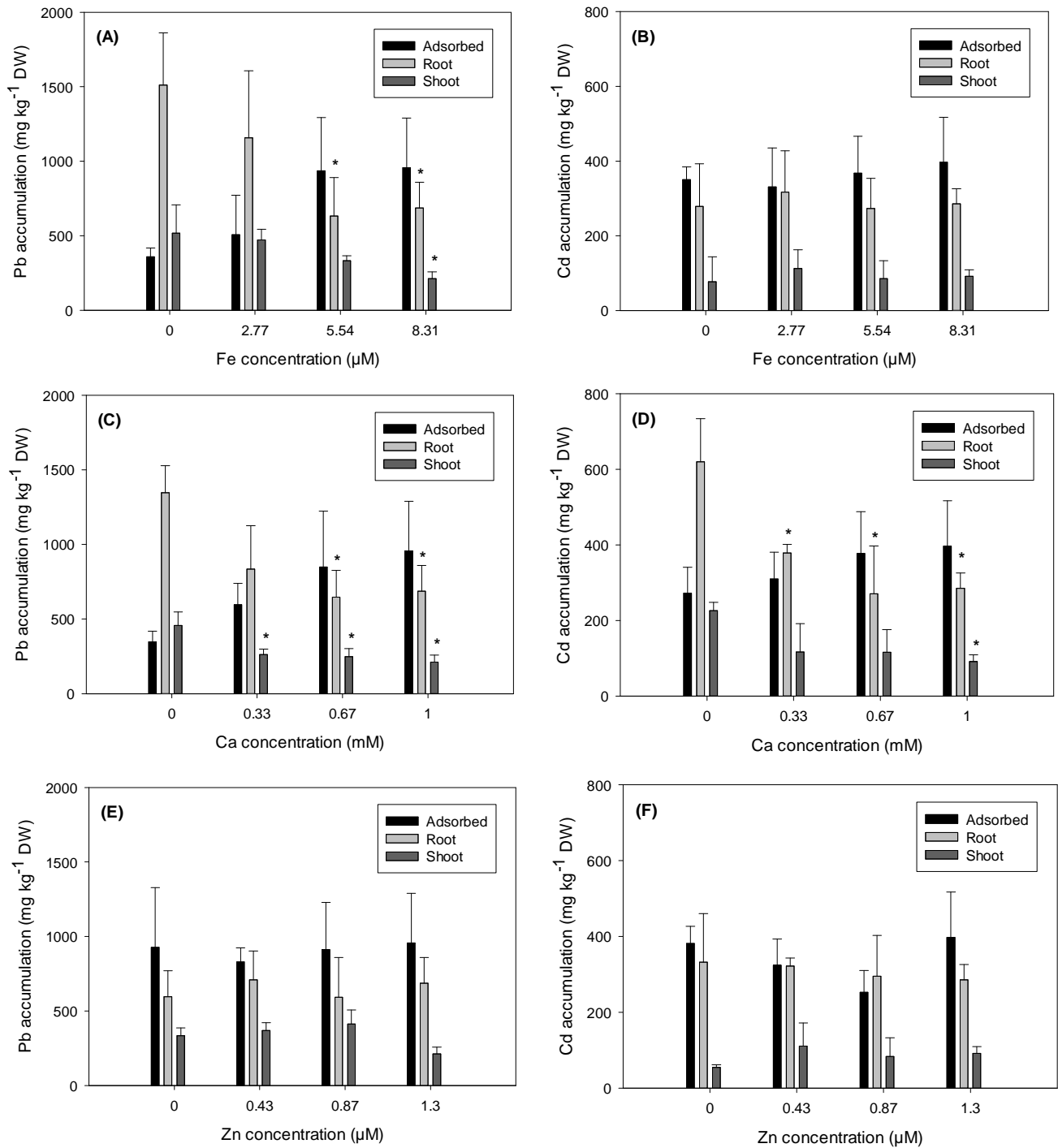


FIGURE 4

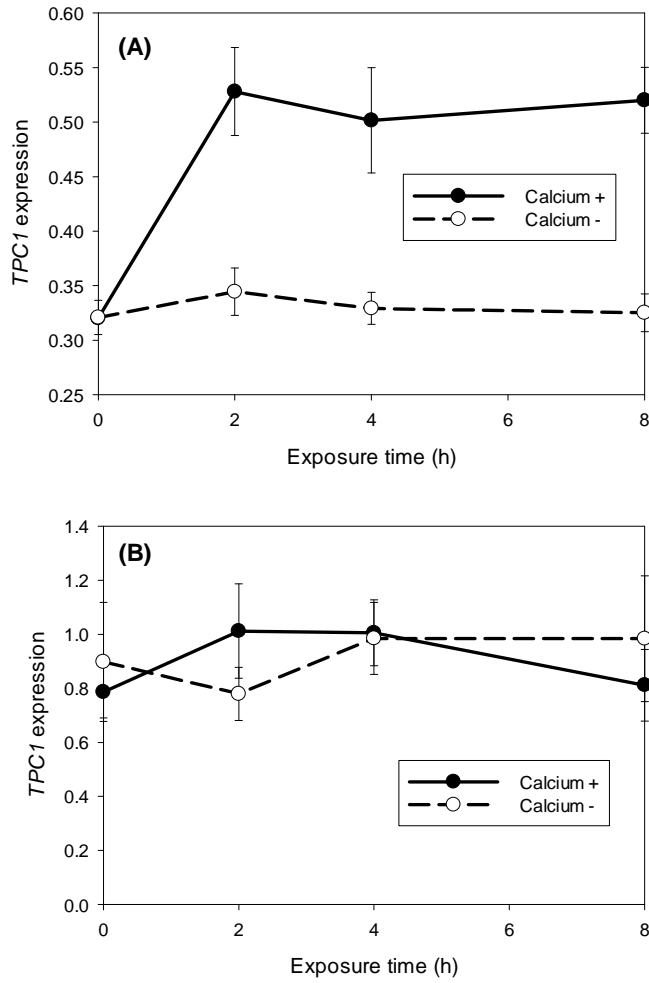
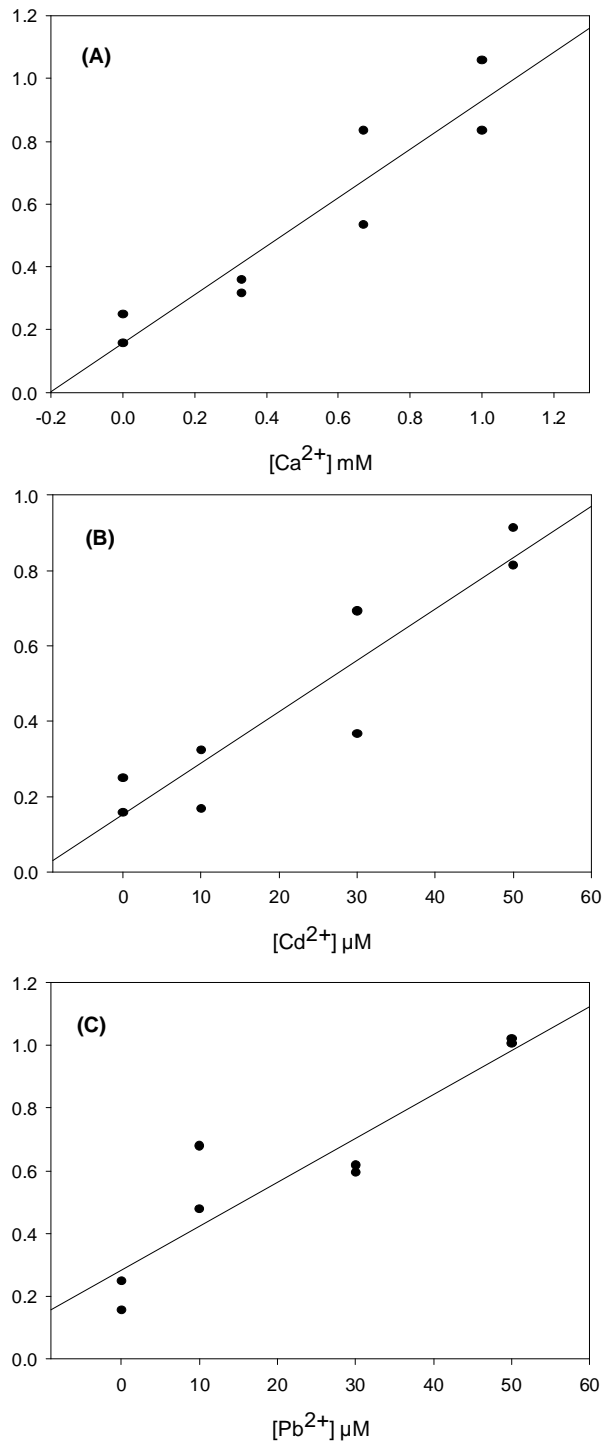


FIGURE 5



CAPÍTULO 5

Aislamiento de Protoplastos de Raíces de Espadaña y Vetiver

1. INTRODUCCIÓN

Las células de los tejidos de las plantas poseen paredes con una matriz rica en pectina correspondiente a la lámina media que une células adyacentes. Un protoplasto es una célula que carece de pared celular, se encuentra rodeada por su membrana plasmática y es potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse (Azpiroz 1994; Gutiérrez et al. 2003).

Ya que la membrana plasmática está involucrada en la síntesis de la pared, se establece un contacto íntimo permanente entre la membrana y la pared celular, sin embargo, en soluciones hipertónicas, la membrana plasmática se contrae de su pared permitiendo que bajo presencia de enzimas específicas, la pared puede ser removida de la célula. La subsecuente remoción de la pared libera grandes poblaciones de protoplastos (células "desnudas"). Bajo estas condiciones la membrana plasmática es la única barrera entre el citoplasma y su ambiente externo inmediato, convirtiendo a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte, permeabilidad, posibles funciones de asociación de membrana como resistencia a enfermedades, fusión de membrana y durante la síntesis de la pared celular, la relación de la membrana con su pared celular (Smith 1978; Davey et al. 2005; Mazarei et al. 2008).

Se ha descrito que la ausencia de una pared celular funcional podría afectar la permeabilidad de la membrana celular y permitir una libre filtración de solutos del protoplasto (Smith 1978). Sin embargo, Lin (1980) demostró que protoplastos aislados de raíces de maíz (*Zea mays*) realizaron un proceso activo de transporte de iones de manera idéntica a los tejidos de los que fueron derivados, indicando que los protoplastos aislados pueden ser usados para obtener información adicional en el mecanismo del transporte de iones en las células vegetales. Los mecanismos de transporte han sido estudiados previamente empleando protoplastos de raíz de cebada (*Hordeum vulgare*) y de chile (*Capsicum annuum*) (Murthy y Tester 2006; Chen et al. 2007). De las técnicas empleadas en el análisis del funcionamiento y especificidad de los canales iónicos en protoplastos, Patch-clamp es una de las más utilizadas (Moran et al. 1984; Ogden y Stanfield, 1987).

Respecto al método de aislamiento de protoplastos, existen dos métodos: el mecánico y el enzimático, siendo este último el más utilizado debido a su efectividad. El método

mecánico consiste en sumergir el tejido en una solución hipertónica provocando plasmólisis, se secciona el tejido y se liberan los protoplastos (Vasil et al., 1980; Davey et al., 2005). Mediante este método se evita el daño metabólico causado por el uso de enzimas, pero se obtiene una cantidad pequeña de protoplastos, además de que se segregan desechos citoplásmicos de las células dañadas por el corte. El método enzimático consiste en incubar las células en una mezcla de enzimas que degradan la pared celular, en general son celulasas, hemicelulasas y pectinasas con estabilizadores osmóticos. La preparación enzimática de protoplastos tiene ciertas ventajas: 1) grandes cantidades de protoplastos pueden ser aislados fácilmente, 2) hay menos estrés osmótico y 3) las células permanecen relativamente intactas y no son dañadas como en el caso de los métodos mecánicos (Ruesink 1971). En la Tabla 1 se indican las enzimas que comúnmente se utilizan para el aislamiento de protoplastos. Los principales factores que se deben considerar para el éxito de este método son: el tipo de enzimas que se utilizarán, la composición del medio y el material de origen de los protoplastos (Roca y Mroginski, 1993).

En teoría es posible aislar protoplastos de cualquier tipo de planta, órgano o tejido, pero las fuentes que se usan comúnmente son mesófilo foliar y tejidos cultivados in vitro como células en suspensión, callos y ápices de plántulas (Ruesink 1980; Vasil et al. 1980). El estado fisiológico de la fuente del tejido influye en la liberación de protoplastos viables. Además, la variación temporal, afecta la reproducibilidad del aislamiento de protoplastos de plantas crecidas en invernadero, lo anterior puede ser efectivamente eliminado usando tejidos crecidos in vitro (Davey et al., 2005).

El objetivo fue el de desarrollar una técnica que permita la obtención de protoplastos de raíces de *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides* como base para el posterior estudio de la relación de Ca^{2+} en el transporte de Cd^{2+} y Pb^{2+} en estas especies vegetales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Con el objetivo de promover el crecimiento radical, plantas de Vetiver (21.1 ± 3.9 g/planta) y Espadaña (27.2 ± 4.4 g/planta) fueron crecidas durante 10 días en una solución de KNO_3 10 mM a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz de día natural. Pasado este periodo de tiempo, 1g de raíces secundarias de cada planta fueron desinfectadas con etanol al 70% (v/v) durante 90 s, se desechó el etanol y se enjuagó 3 veces con agua estéril.

2.2 Aislamiento de protoplastos

Para el aislamiento de protoplastos las raíces de ambas plantas fueron cortadas en trozos de 2-3 mm, depositadas en tubos de centrifuga de 15 mL y se adicionó 5 mL de una solución enzimática conteniendo, celulasa 2% (w/v), pectinasa 0.1% (w/v), Manitol 0.4 M, MES 20 mM, CaCl_2 1 mM ajustada a un pH de 5.5 con KOH. Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se analizaron diferentes tiempos de incubación, 6, 8 y 16 h para Espadaña y 16 y 38 h para Vetiver. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad, a 30°C y en agitación constante (70 rpm).

2.3 Lavado

Una vez terminado el periodo de incubación, la solución enzimática se filtró a través de un filtro de nylon (180 μm) para remover el tejido vascular y el material no digerido de la solución. El material vegetal resultante se lavó 3 veces agitando gentilmente con 10 mL de la solución de lavado que consistió en manitol 0.4 M, MES 20 mM y CaCl_2 1 mM ajustada a un pH de 5.9 con KOH. En cada lavado el tejido se colectó empleando un colador con un tamaño de poro de 0.5 - 1 mm. La solución obtenida de los lavados se filtró a través de un filtro de nylon (180 μm) y las soluciones de incubación y de lavados se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. La pastilla conteniendo los protoplastos se resuspendió en 5 mL de la solución de lavado, se agitó cuidadosamente y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante 10 min.

2.4 Purificación y conteo

Esta preparación “cruda” de protoplastos contenía además restos celulares por lo que fue importante remover estos contaminantes. Para ello se procedió a realizar la purificación de los protoplastos. La pastilla de protoplastos se resuspendió en 2 mL de solución de lavado y finalmente se estratificó con 9 mL de la solución de flotación (sacarosa 0.4 M, MES 20 mM y CaCl_2 1 mM ajustada a un pH de 5.9 con KOH). Estas fracciones se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. La fracción de protoplastos formaron una banda en la interfase la cual se recuperó con una pipeta pasteur y finalmente se mezcló con un volumen equivalente de la solución de lavado. Se les permitió a los protoplastos equilibrarse en el medio de lavado por incubación en la oscuridad durante 30 min. Para determinar el número de los protoplastos aislados se tomó una muestra de 100 μL de suspensión de protoplastos y se realizó conteo en un microscopio triocular compuesto

DME, Leica, utilizando una Cámara de Neubauer. Los resultados fueron expresados como número total de protoplastos aislados por gramo de tejido vegetal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la obtención de protoplastos de *Typha latifolia* y *Vetiveria zizanioides*; sin embargo, cabe mencionar que el procedimiento de purificación debe ser mejorado ya que en el caso de Espadaña aún se observaron restos celulares al analizar las muestras bajo el microscopio; mientras que en el caso de Vetiver los protoplastos no se estratificaron en la interfase (Figuras 2 y 3). Bracho et al. (2008) reportó que mediante el empleo de la solución de Histopaque® 1077 se logró recuperar un mayor número de protoplastos en comparación con la solución de sacarosa. Así mismo, el empleo de Histopaque® 1077 resultó ser más efectivo para la remoción de detritus, obteniéndose poblaciones de protoplastos más limpios.

El diámetro de los protoplastos fue de 30-36 μm para *T. latifolia* y de 11-25 μm para *V. zizanioides* (Figuras 1 y 2). Prasertsongskun (2004) reportó que el tamaño de protoplastos de células en suspensión derivadas de inflorescencias de vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) se encontraron en un tamaño de 10-25 μm . Esta diferencia en diámetro puede ser atribuida a la variación en tamaño de las células y particularmente al grado de vacuolación de las mismas (Uchimiya y Murashige 1974; Lin 1980; Kanchanapoom et al. 2001).

Se observó que el tiempo de incubación y la purificación fueron los parámetros que influenciaron la eficiencia del aislamiento de los protoplastos de Espadaña y Vetiver. El tiempo de incubación fue proporcional al número de protoplastos aislados/g de raíz de Espadaña, obteniendo a las 6, 8, y 16 h un número de protoplastos de 16 000, 21 000 y 84 000 cel/g de raíz, respectivamente, mientras que al realizar la semipurificación con sacarosa a las 16 h el rendimiento disminuyó un 17 %, recuperando 70 000 cel/g de raíz. En el caso de Vetiver, con base en las observaciones realizadas en la obtención de protoplastos en Espadaña, el tiempo de incubación fue fijado en 16 y 38 h. El número de protoplastos aislados a estos tiempos fue de 52 700 y 38 100 cel/g de raíz, respectivamente. Esta disminución en el número de protoplastos a las 38 h pudo deberse a que el tiempo de incubación fue excesivo, lo cual propició el rompimiento de los protoplastos altamente sensibles al medio externo. A las 16 h aún se observó la liberación

de los protoplastos del tejido radical (Figura 2C) indicando que un periodo entre 16-38 h sería óptimo para obtener la mayor cantidad de protoplastos de células radicales de Vetiver. Prasertsongskun (2004) aisló protoplastos de células en suspensión derivadas de inflorescencias de Vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash) obteniendo un rendimiento de 8.4×10^4 protoplastos/mL usando celulasa Onozuka R10, 2%; macerozima R10, 2%, pectinasa, 5%, manitol, 0.4 M y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7 mM; en un periodo de incubación de 10 h a 50 rpm. El rendimiento de protoplastos aislados de tejido radical de *Allium cepa*, L. fue de 31 465 protoplastos/g de raíz. Aislados en un medio de incubación con una mezcla de enzimas de celulasa, 1% y pectinasa, 0.5%. Se ha reportado que la eficiencia del aislamiento enzimático depende de varios factores entre los que se tiene el material vegetal de origen, el tipo y concentración de enzimas utilizadas, la temperatura, el tiempo de acción y el método de recuperación (Guangyu et al. 1997; Assani et al. 2001; Pindel 2007; Geerts et al. 2008). Así como también es necesario el empleo de más de una enzima para lograr una completa eliminación de la pared. Por ejemplo, Uchimiya y Murashige (1974), observaron que la celulasa por si sola es completamente ineficiente para la liberación de protoplastos a partir de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* L. cultivar "Bright yellow".

Los protoplastos aislados de vetiver no mostraron una forma esférica en su mayoría (Figura 2 E y F). Mientras que los protoplastos de Espadaña mostraron una serie de estructuras cuasi-geométricas (Figura 1). Hahne y Hoffmann (1984) mencionan que una forma no esférica en protoplastos de *H. rosa-sinesis* no fue debida a residuos de la pared celular sino a un proceso de estabilización de la red citoplasmática, además de presentar una superficie con "hendiduras", con estructuras sumamente similares a las observadas en los protoplastos derivados de Espadaña, ellos demostraron que dichas "hendiduras" son debidas al sistema de filamentos citoplasmáticos relacionados al flujo citoplásmico en el citoesqueleto de la célula. Sin embargo, no debe ser descartada una incompleta digestión de la pared celular en las plantas de Vetiver y Espadaña. Calcofluor White, un fluorocromo inespecífico que se enlaza a la celulosa pudiese emplearse para la detección de residuos de la pared celular en estas plantas.

4. CONCLUSIONES

La técnica desarrollada permitió el aislamiento de protoplastos de *T. latifolia* y *V. zizanioides*, sin embargo, son requeridos una optimización en el método de purificación de los protoplastos y un análisis que defina la completa eliminación de la pared celular.

REFERENCIAS

- Assani A, Haicour R, Wenzel G, Cote F, Bakry F, Foroughi-Wehr B, Ducreux G, Aguillar M-E, Grapin A. 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20: 482-488.
- Azpíroz, S. 1994. La biotecnia y el sector agropecuario. *Agronomía mesoamericana* 5: 140-158.
- Bracho M, García-P M, Marcano L, Rodríguez S, Guíñez J, del Campo A. 2008. Obtención y aislamiento de protoplastos de tejido radicular de *Allium cepa*, L. *Ciencia* 16: 141-147.
- Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA, Shabala S. 2007. Root plasma membrane transporters controlling K⁺/Na⁺ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology*. 145: 1714-1725.
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23: 131-171.
- Geerts P, Druart P, Ochatt S, Baudoin J. 2008. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (1): 41-46.
- Guangyu CH, Conner A, Christey M, Fautrier A, Field R. 1997. Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. *International Journal of Plant Sciences* 158: 537-542.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J., y Rodríguez, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal in vitro. *e-Gnosis* 1: 1-19.
- Hahne G, Hoffmann F. 1984. The effect of laser microsurgery on cytoplasmic strands and cytoplasmic streaming in isolated plant protoplast. *European Journal of Cell Biology*. 33: 175-179.
- Kanchanapoom K, Jantaro S, Rakchad D. 2001. Isolation and Fusion of Protoplasts from Mesophyll Cells of *Dendrobium Pompadour*. *Science Asia* 27: 29-34.
- Lin W. 1980. Corn Root Protoplasts. *Plant Physiol.* 66: 550-554.
- Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, Lowe SB. 1980. Microtubules, Protoplasts and Plant Cell Shape. *Planta*. 147: 500-506.
- Mazarei M, Al-Ahmad H, Rudis MR, Stewart CN Jr. 2008. Protoplast isolation and transient gene expression in swithgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnology Journal*. 3: 354-359.
- Moran N, Ehtenstein G, Iwasa K, Bare C, Mischke C. 1984. Ion Channels in plasmalemma of wheat protoplast. *Science*. 126: 835-838.
- Murthy M, Tester M. 2006. Cation currents in protoplasts from the roots of a Na⁺ hyperaccumulating mutant of *Capsicum annum*. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1171-1180.
- Ogden D, Stanfield P. 1987. *Microelectrode techniques: The Plymouth Workshop Handbook*. Cambridge: The Company of Biologists, Ltd.
- Pindel A. 2007. Optimization of isolation conditions of *Cymbidium* protoplasts. *Folia Horticulturae* 19: 79-88.

- Prasertsongskun S. 2004. Isolation and culture of suspension protoplast of vetiver. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 411-416.
- Roca WM, Mroginski LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Colombia.
- Ruesink AW. 1971. The plasma membrane of avena coleptile protoplast. Plant Physiol. 47: 192-195.
- Ruesink AW. 1980. Protoplasts of plant cells. Methods in Enzymology. 69: 69-84.
- Smith H. 1978. The Molecular Biology of Plant Cells. Botanical Monographs. University of California Press. Berkeley · Los Angeles · Oxford.
- Uchimiya H, Murashige T. 1974. Evaluation of Parameters in the Isolation of Viable Protoplasts from Cultured Tobacco Cells. Plant Physiology 54: 936-944.
- Vasil V, Vasil IK. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. Theor. Appl. Genet. 56:97-99.

TABLAS

Tabla 1. Enzimas que se utilizan para el aislamiento de protoplastos

Enzimas	Producto comercial
Celulasas	
Celulasa Onozuka R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co Ltd., Nishiromiya, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokio, Japón.
Celulisina	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Meicelasa	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio, Japón.
Pectinasas	
Pectinasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
Macerozima R10	Kinki Yakult Biochemicals Co., Ltd.
Macerasa	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Pectoliasa Y 23	Seishiu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japón.
Hemicelulasas	
Rhozima HP 150	Rohm & Haas, Filadelfia, PN, U.S.A.
Hemicelulasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

FIGURAS

Figura 1. Protoplastos aislados de *T. latifolia*. A) 6 h de incubación sin purificar, B) 8 h de incubación sin purificar, C y D) 16 h de incubación sin purificar, E y F) 16 h de incubación semipurificadas.

Figura 2. Protoplastos aislados de *V. zizanioides*. A, B y C) 16 h de incubación sin purificar, D, E y F) 38 h de incubación sin purificar.

FIGURA 1

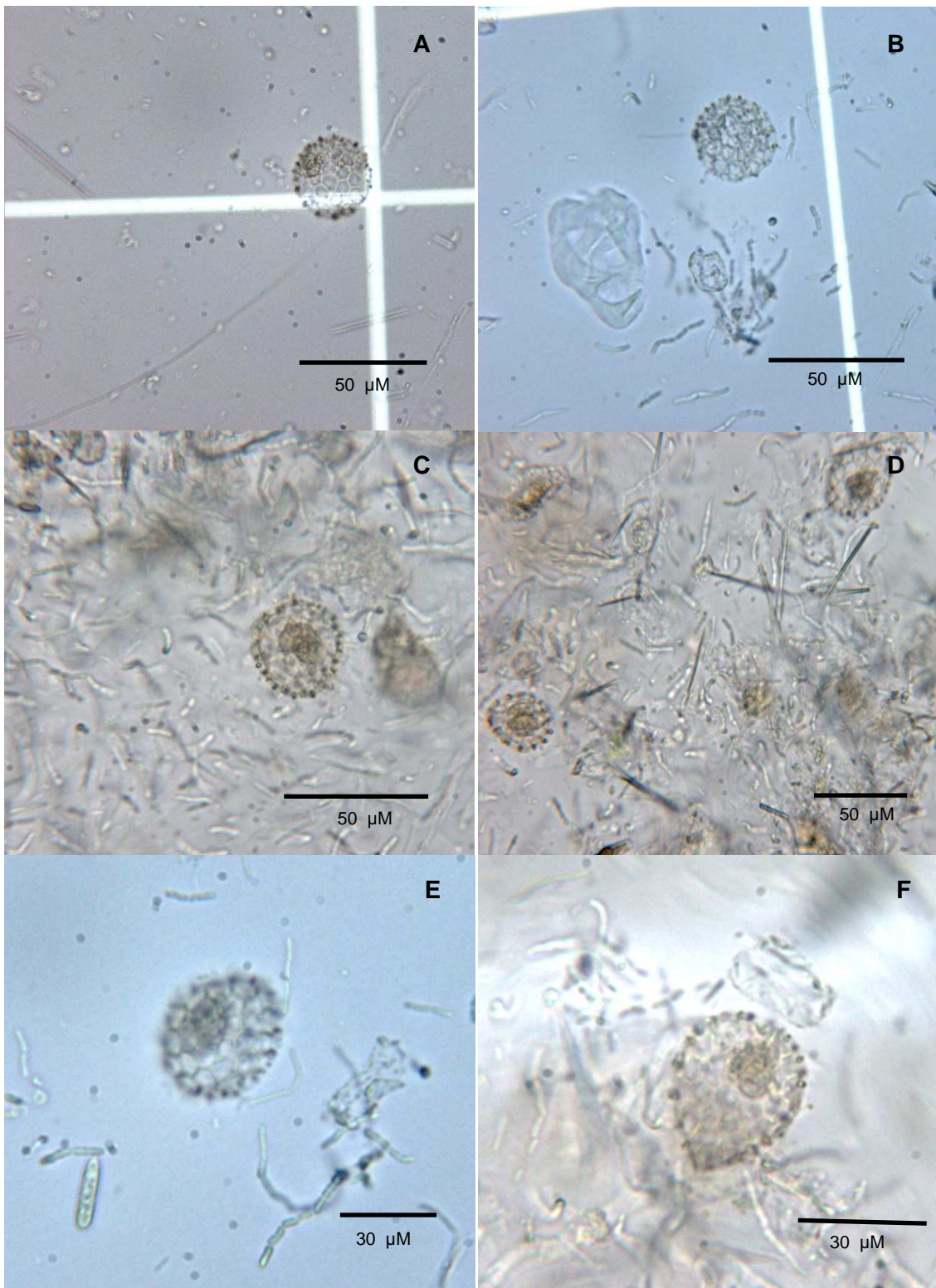
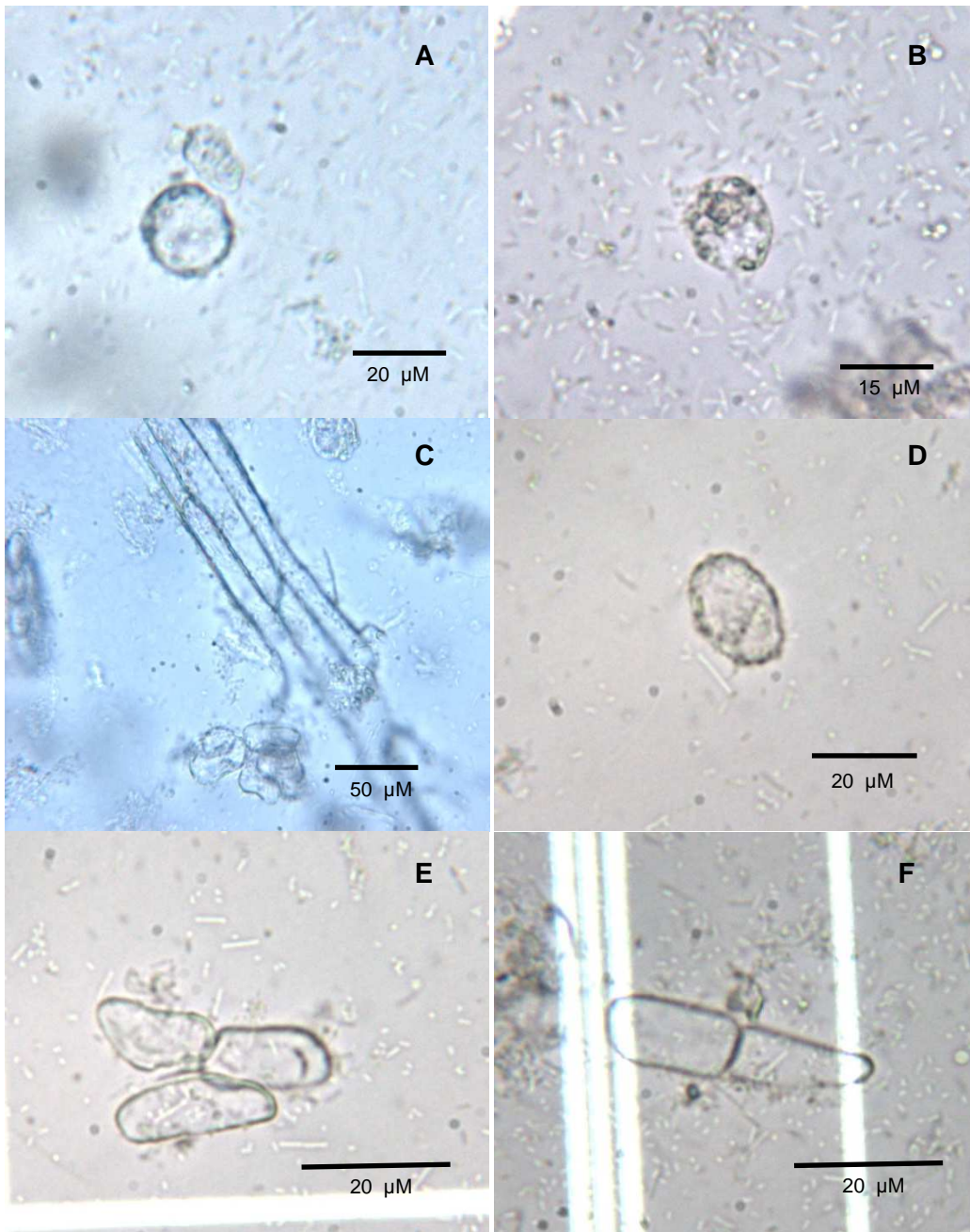


FIGURA 2



ANEXO A

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES: BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO Y PLOMO

Introducción

La biodisponibilidad es la fracción de la cantidad total de una sustancia presente en un compartimento ambiental específico que, entre un espacio de tiempo específico es disponible o puede estar disponible para su captación por microorganismos o plantas ya sea por circundar el organismo o por ingestión (Peijnenburg y Jager, 2003). Por lo tanto la concentración total de un metal en un sitio no es una buena medida de la biodisponibilidad y no tan práctica para cuantificar contaminación y potencial ambiental. Se ha descrito que la biodisponibilidad de los metales traza, su captación biológica y sus efectos ecotoxicológicos pueden entenderse en términos de especiación química (Krishnamurti et al. 2007).

Debido a la baja solubilidad que poseen Fe y Pb (Hell y Stephan, 2003; Mori, 1999; Martínez y Motto, 2000), se procedió a analizar la biodisponibilidad de estos dos elementos en soluciones nutritivas de distintas composiciones.

Metodología

La biodisponibilidad de Fe y Pb en las soluciones experimentales se verificó de tres formas diferentes. Primero se realizó un modelamiento químico empleando el software MINEQLver.4.5, considerando la composición descrita en la Tabla 1 a un pH de 6. Por otra parte, se analizó la concentración de Fe y Pb soluble de forma experimental; para ello se prepararon soluciones bajo las condiciones expresadas en la Tabla 1. La solución nutritiva fue centrifugada a $3\ 000 \times 10$ min con el objetivo de remover cualquier especie precipitada y el sobrenadante se analizó por EAA-F (Papoyan et al., 2007). Finalmente plantas de Espadaña y Vetiver fueron crecidas durante 10 días en soluciones cuya composición se describe en la Tabla 1; sin embargo, en esta ocasión se realizó una variación a la solución "C" añadiéndose EDTA a la concentración de 8.31×10^{-6} M (solución C-2). Las plantas fueron previamente aclimatadas durante 10 días en una solución cuya fuerza iónica se ajustó a 0.01M con KNO_3 en un rango de pH de 5.7-6, la

solución fue amortiguada por adición de MES a la concentración de 2 mM. El procesamiento de las muestras de tejidos vegetales se describe en los capítulos 2 y 4.

Resultados y discusión

Al analizar las especies prioritarias de Fe y Pb obtenidas por modelamiento químico con MINEQL (Tabla 2) se observa que la presencia de EDTA (soluciones A y C-2) incrementó la solubilidad Pb a diferencia de las soluciones a las que se adicionó fosfatos en ausencia de este agente quelante (soluciones B y C) en donde la especie mayoritaria es $Pb_5(PO_4)_3Cl$ (piromorfita). Según este análisis computacional Pb^{2+} tiene una mayor afinidad a EDTA encontrándose prioritariamente la especie $Pb[EDTA]$ a $Fe[EDTA]$; sin embargo, en la solución donde se agregó hierro como Fe^{3+} (Solución A) forma la especie insoluble Fe_2O_3 (hematita), a diferencia de la solución donde se agregó como Fe^{2+} (solución C-2) en donde se encuentra en más del 90% soluble como ion libre (Fe^{2+} ; 69.9%) y formando quelatos con EDTA ($Fe[EDTA]$; 25%) . En las soluciones B y C (ausencia de EDTA) el hierro se encuentra en más del 90% como ión libre mientras que plomo muestra gran afinidad por los grupos fosfatos presentes formando la especie insoluble piromorfita ($Pb_5(PO_4)_3Cl$). La solución D muestra una gran solubilidad tanto de hierro como plomo encontrándose ambos en más del 90% como iones libres (Tabla 2). Estos valores se verificaron experimentalmente y los resultados se muestran en la Figura 1 en donde se observa que las soluciones experimentales coinciden con los valores predichos con excepción de la solución A, en donde se observa una inversión en los resultados esperados para plomo y hierro, encontrándose una gran cantidad de hierro soluble y de manera contraria plomo insoluble (Figura 1 A y B). Lo anterior puede ser explicado en términos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de hierro y de plomo en donde corresponden a 27.7 y 19.8 para $Fe[EDTA]$ y $Pb[EDTA]$, respectivamente (Stum y Morgan, 1996).

Finalmente se procedió a verificar la biodisponibilidad de Fe y Pb mediante el análisis de tejidos vegetales provenientes de plantas crecidas en soluciones con la misma composición modelada, sin embargo, en este caso la solución C fue eliminada debido a la similitud de resultados con la solución B. (Figura 2). El análisis de los tejidos de Espadaña y Vetiver revelaron una mayor acumulación de Pb en los tratamientos donde las plantas fueron expuestas a la solución D (Figura 2 A, B). Estos datos concuerdan con

los datos obtenidos experimentalmente en donde plomo se encuentra prioritariamente en su forma soluble (Figura 1 A), y según el modelado con MINEQLver.4.5, en la especie Pb^{2+} . Respecto a hierro, no se observó alguna tendencia en su contenido en los tejidos en los distintos tratamientos (Figura 2 C, D), reflejando su biodisponibilidad en todos los tratamientos; resultado congruente con los datos obtenidos en el análisis de solubilidad de hierro obtenido experimentalmente (Figura 1 B). Hierro se encontró en un 91-94 % en raíces de Espadaña y en un 90 - 95% en raíces de Vetiver. Se ha reportado que la concentración de hierro en las raíces normalmente es superior a la de las hojas (Mengel, 1994).

De acuerdo a los resultados en el modelamiento de las soluciones por el programa MINEQL ver.4.5 y los resultados obtenidos experimentalmente, se eligió la composición de la solución D. Para los estudios de la influencia de Ca, Fe y Zn en la captación de Cd y Pb por las plantas de *Vetiveria zizanioides* y *Typha latifolia*.

Referencias

- Hell R, Stephan UW. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*. 216: 541-551.
- Krishnamurti GSR, Pigna M, Arienzo M, Violante A. 2007. Solid-phase speciation and phytoavailability of copper in representative soils of Italy. *Chem Spec Bioavailability*. 19: 57-67.
- Martínez CE, Motto HL. 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ Pollut*. 107: 153-158.
- Mengel K. 1994. Iron availability in plants tissues-iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil*. 165: 275-283.
- Mori S. 1999. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol* 2:250-253.
- Papoyan A, Piñeros M, Kochian LV. 2007. Plant Cd^{2+} and Zn^{2+} status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol*. 175: 51-58.
- Peijnenburg WJG M, Jager T. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotox Environ Safe*. 56: 63-77.
- Stumm, W., Morgan, J.J., 1996. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. Wiley-Interscience, New York.

TABLAS

Tabla 1. Composición de la soluciones experimentales.

Compuesto	A	B	C	D
NH ₄ H ₂ PO ₄	125 µM	125 µM	42 µM	-
KNO ₃	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Ca(NO ₃) ₂	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Fe-EDTA	11 µM	-	-	-
ZnSO ₄	1 µM	1 µM	1 µM	1.3 µM
KCl	50 µm	50 µm	50 µm	50 µm
FeSO ₄	-	8.31 µm	8.31 µm	8.31 µm
Pb(NO ₃) ₂	10 µm	10 µm	10 µm	10 µm

Tabla 2. Principales especies de Pb y Fe en las soluciones experimentales.

Experimento	Elemento	Especie	Concentración (µM)	Porcentaje	
A	Fe	Fe[EDTA]	1.39	16.7	
		Fe ₂ O ₃ (hematita)	4.8	57.8	
	Pb	Pb[EDTA]	8.46	84.6	
		Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl (piromorfita)	0.298	3.00	
B	Fe	Fe ²⁺	7.78	93.0	
		FeH ₂ PO ₄ ⁺	0.44	5.29	
	Pb	Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl (piromorfita)	2	20.0	
C	Fe	Fe ²⁺	8.13	97.8	
		FeH ₂ PO ₄ ⁺	0.138	1.66	
		Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl (piromorfita)	2	20.0	
C-2	Fe	Fe ²⁺	5.81	69.9	
		FeH ₂ PO ₄ ⁺	0.34	4.09	
		Fe[EDTA]	2.08	25.0	
	Pb	Pb[EDTA]	6.81	68.1	
Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl (piromorfita)		0.631	6.31		
D	Fe	Fe ²⁺	8.29	99.8	
		Pb	Pb ²⁺	9.45	94.5
			PbNO ₃ ⁺	0.421	4.21

Las especies fueron definidas empleando el software MINEQLver.4.5

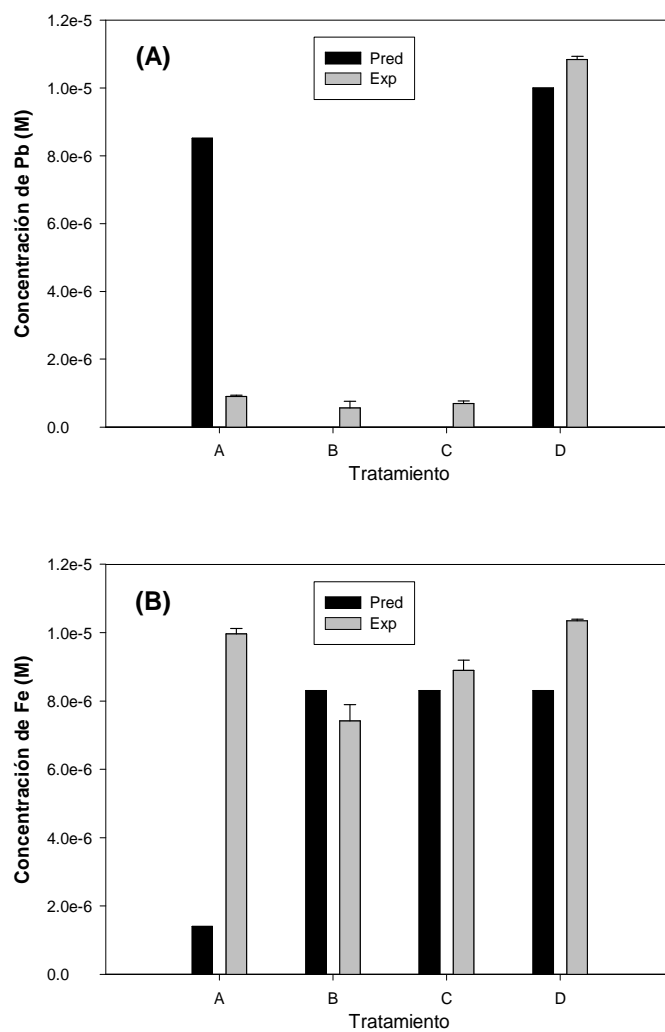


Figura 1. Comparación de la concentración de plomo total soluble (A) y hierro total soluble (B) en las distintas soluciones experimentales obtenidas por modelamiento químico (MINEQLver.4.5) y las concentraciones experimentales.

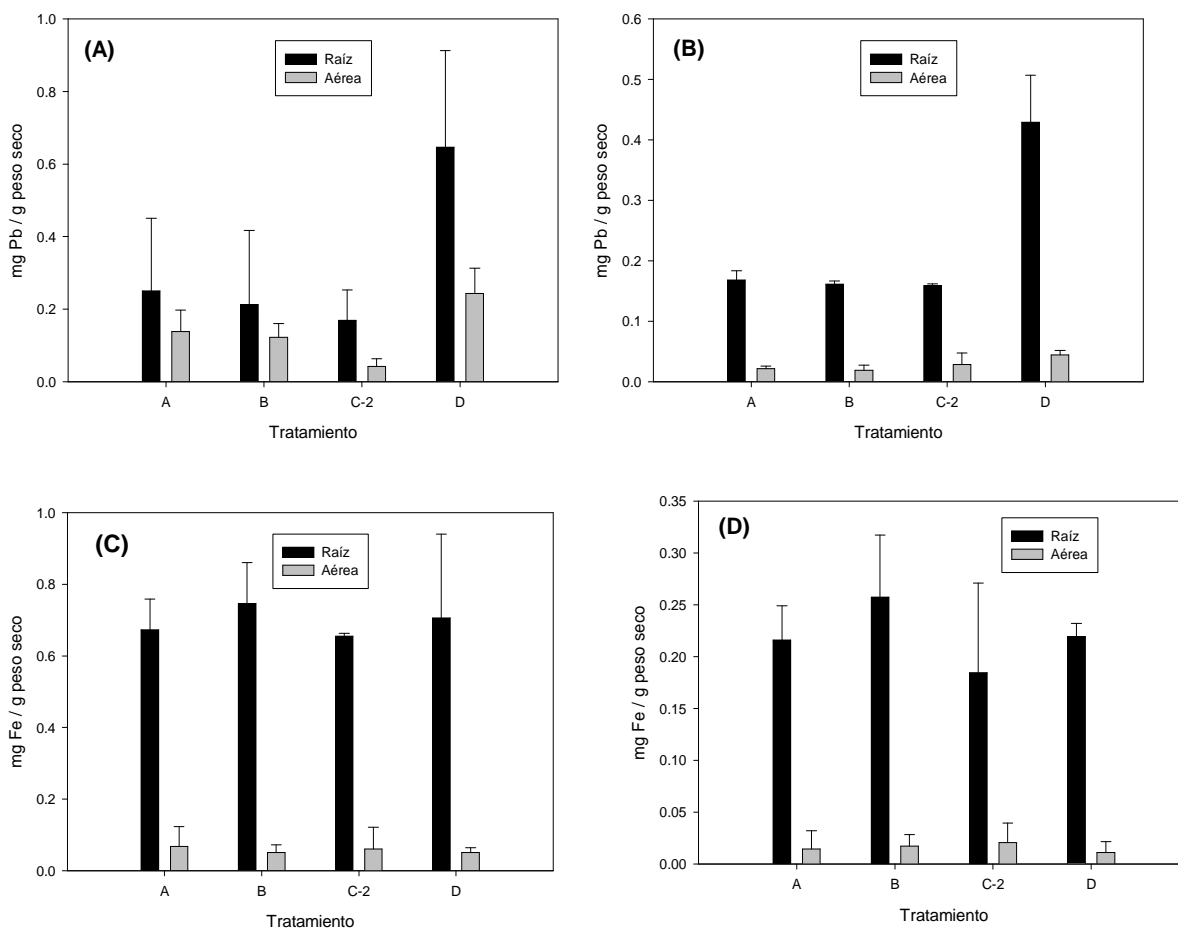


Figura 2. Concentración de plomo y hierro en Espadaña (A, C) y Vetiver (B, D). Las plantas fueron expuestas durante 10 días a soluciones nutritivas de distinta composición, los tejidos de la planta se secaron y digirieron para el posterior análisis de los metales (EAA-F). Los resultados son presentados como promedio \pm DE de los experimentos realizados por triplicado.

ANEXO B

EFFECTO DE LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS EN VETIVER Y ESPADAÑA

Metodología

Las plantas de Espadaña y Vetiver fueron previamente aclimatadas durante 5 días en una solución cuya fuerza iónica se ajustó a 0.01M con KNO_3 en un rango de pH de 5.7-6, la solución fue amortiguada por adición de MES (2 mM). Al día 6 las plantas fueron expuestas a una solución conteniendo KNO_3 1 mM, KCl 50 μM , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM, FeSO_4 8.31 μM y $\text{Zn}(\text{SO}_4)_2$ 1.3 μM (control) o bien crecidas en soluciones en ausencia de Ca (def-Ca), Fe (def-Fe) o Zn (def-Zn). Al día 10 las soluciones fueron sustituidas por otras con la misma composición. Durante los siguientes 10 días se evaluó el índice de crecimiento (IC; cociente de la biomasa al día 0 y 10, peso seco); se cuantificó el contenido de clorofila total al inicio y final del experimento (día 0 y 10) (Bruinsma 1963) y se midió la elongación de hojas.

Resultados

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el índice de crecimiento, elongación de hojas y el contenido de clorofila total en las plantas de *T. latifolia* y *V. zizanioides* bajo los tratamientos señalados ($p > 0.05$) (Tabla 1). Las plantas no se vieron afectadas por la composición de la solución nutritiva elegida, así como por la deficiencia de Ca, Fe y Zn inducida durante 15 días.

Referencias

Bruinsma J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. Photochem Photobiol. 2: 241–249.

Tabla 1. Índice de crecimiento (IC), elongación de hojas (EH), clorofila total (Chl total) de plantas de *T. latifolia* y *V. zizanioides* desarrolladas durante 10 días en distintos tratamientos de Ca, Fe y Zn ($n = 3 \pm SD$).

Planta <i>T. latifolia</i> (μM)	IC	EH (cm)	Clorofila total (Chl total)	
			Inicio	Final
Control	0.95 \pm 0.22	17.2 \pm 9.7	0.26 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03
Def-Ca	0.86 \pm 0.27	16.3 \pm 5.8	0.30 \pm 0.05	0.37 \pm 0.06
Def-Fe	0.96 \pm 0.30	18.5 \pm 8.8	0.39 \pm 0.09	0.44 \pm 0.14
Def-Zn	1.01 \pm 0.28	14.0 \pm 9.0	0.31 \pm 0.10	0.38 \pm 0.11
V. <i>zizanioides</i>				
Control	1.10 \pm 0.02	21.3 \pm 4.8	1.24 \pm 0.14	1.13 \pm 0.23
Def-Ca	1.06 \pm 0.18	17.2 \pm 4.8	1.11 \pm 0.29	0.95 \pm 0.30
Def-Fe	1.11 \pm 0.06	28.3 \pm 6.0	0.86 \pm 0.15	1.08 \pm 0.26
Def-Zn	1.14 \pm 0.08	25.2 \pm 4.5	1.52 \pm 0.29	1.43 \pm 0.15

Los valores de IC y EH no difieren estadísticamente con control; los valores finales de clorofila total no difieren estadísticamente con el contenido de clorofila total al inicio de cada tratamiento ($P > 0.05$).

ANEXO C

CONTENIDO DE Ca, Fe y Zn EN LAS SOLUCIONES DE EXPERIMENTACIÓN

Descripción

El diseño experimental así como las condiciones de análisis de las muestras se detalla en la Sección de Materiales y Métodos, Capítulo 3. La remoción de Ca, Fe y Zn en las soluciones de los tratamientos con Vetiver bajo diferentes concentraciones de Ca, Fe o Zn se muestran en las Figuras 1-3. Los El análisis de los nutrientes en las soluciones experimentales de Espadaña se muestran en las Figuras 4 y 5.

Ca en Vetiver

El contenido de Ca en todos los tratamientos con Vetiver mostró un patrón común, dependiendo si el tratamiento fue con Pb o Cd. La concentración de calcio en los tratamientos de Fe y Zn en presencia de Pb incrementó 3-4 veces al día 10 respecto al inicio del experimento (día 0) (Figura 1 A, C). Por otro lado, aunque la concentración de calcio en los tratamientos con cadmio tuvo una tendencia a incrementarse al día 1, al día 10 se observa una disminución de un 50 - 80 % de calcio en la solución (Figura 1 B, D). El incremento de la concentración de Ca al día 1 podría ser consecuencia de un proceso de intercambio de intercambio catiónico en el apoplasto, permitiendo la liberación de Ca de las paredes celulares (White and Broadley, 2003). Mientras que el diferente efecto en la concentración de Ca observado a los días 5 - 10 para los tratamientos de Cd y Pb, sugiere una interacción diferente de cadmio o plomo con calcio.

Fe en Vetiver

El contenido de hierro en la soluciones nutritivas a las cuales no se adicionó Fe para vetiver muestra un incremento significativo al día 5 respecto a las soluciones a las cuales se adicionó la mayor concentración de hierro ($p < 0.05$; Figura 2 C, D). Bienfait et al. (1985) describe que bajo condiciones aireadas parte del hierro es oxidado y precipitado como hidróxido o sales de fosfato las cuales se depositan en el apoplasto. Estos depósitos comprenden más del 95% del contenido de hierro en raíz en un cultivo hidropónico y puede ser usado bajo condiciones de deficiencia de hierro (Becker et al., 1995). Por lo tanto, en condiciones de deficiencia de hierro, las plantas de vetiver

podieron haber solubilizado el hierro (previamente depositado en el apoplasto) incrementando del mismo modo su concentración en la solución de crecimiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento de Zn ($p > 0.05$; Figura 2 E, F). En el caso de los tratamientos donde se varió la concentración de Ca en presencia de Pb, se observó un incremento significativo de la concentración de Fe al día 5 en el tratamiento en ausencia de Ca respecto a los tratamientos a los cuales se añadió Ca ($p < 0.05$; Figura 2 A). Se ha reportado que Fe se une a las paredes celulares por intercambio catiónico, por lo que una menor concentración de calcio en la solución pudo estimular una mayor adsorción de Fe en las raíces (Römheld y Marschner, 1983). Mahamadi and Nharingo (2010) demostraron que Pb(II) presentó una mayor afinidad hacia biomasa no viva de *Eichhornia crassipes* que otros metales como Cd(II) o Zn(II) en solución acuosa. Además, experimentos en carbón activado de cáscara de naranja han demostrado que Pb posee una mayor capacidad de adsorción que Fe, Cu o Zn (Bernard y Jimoh. 2013).

Zn en Vetiver

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de Zn en los tratamientos en donde se varió la concentración de Ca y Fe (Figura 3 A-D). En el caso de las soluciones donde se varió la concentración de Zn, se observa para todas las soluciones que a partir del día 1 la concentración de Zn se estabiliza alrededor de $1.3 \mu\text{M}$ (Figura 3 E, F). Lo anterior pudiera ser un efecto de regulación del contenido de Zn en la solución a la concentración que previamente a la aclimatación en condiciones de deficiencia de Zn, fueron crecidas las plantas.

Ca y Zn en Espadaña

El contenido de Ca y Zn en las soluciones nutritivas conteniendo Cd o Pb a las cuales fueron expuestas las plantas de Espadaña durante 10 días se muestran en la Figura 4 y 5. Aunque se observaron ligeras variaciones en la concentración de Ca en los tratamientos en donde se añadió Pb no se demostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$; Figura 4 C, E). En los tratamientos restantes no se observó alguna tendencia o diferencias significativas en el contenido de Ca en la solución (Figura 4 D, F). El contenido de Ca en los tratamientos en donde se varió la concentración de Ca en la solución no varió respecto al tiempo (Figura 4 A, B). Resultados similares se observan en

el contenido de Zn en las soluciones (Figura 5), sin embargo, a diferencia de Ca en las soluciones, el contenido de Zn en las soluciones en donde se varió la concentración de Zn inicial se estabilizó alrededor de 1.3 μM al día 10 (Figura 5 E, F); resultado similar al observado en las plantas de Vetiver bajo las mismas condiciones (Figura 3 E, F).

Referencias

- Becker R, Fritz E, Manteuffel R. 1995. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiol* 1995:269–275.
- Bienfait HF, van den Briel W, Mesland-Mul NT. 1985. Free space iron pools in roots. Generation and mobilization. *Plant Physiol* 78:596–600.
- Bernard E, Jimoh A. 2013. Adsorption of Pb, Fe, Cu, and Zn from industrial electroplating wastewater by orange peel activated carbon. *International Journal of Engineering and Applied Sciences*. 4 (2).
- Mahamadi C, Nharingo T. (2010). Competitive adsorption of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} ions onto *Eichhornia crassipes* in binary and ternary systems. *Bioresour Technol*. 101:859-864.
- Römheld V, Marschner H. 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants. I. Fe(III) reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *71*: 949-954.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany*. 92, 487–511.

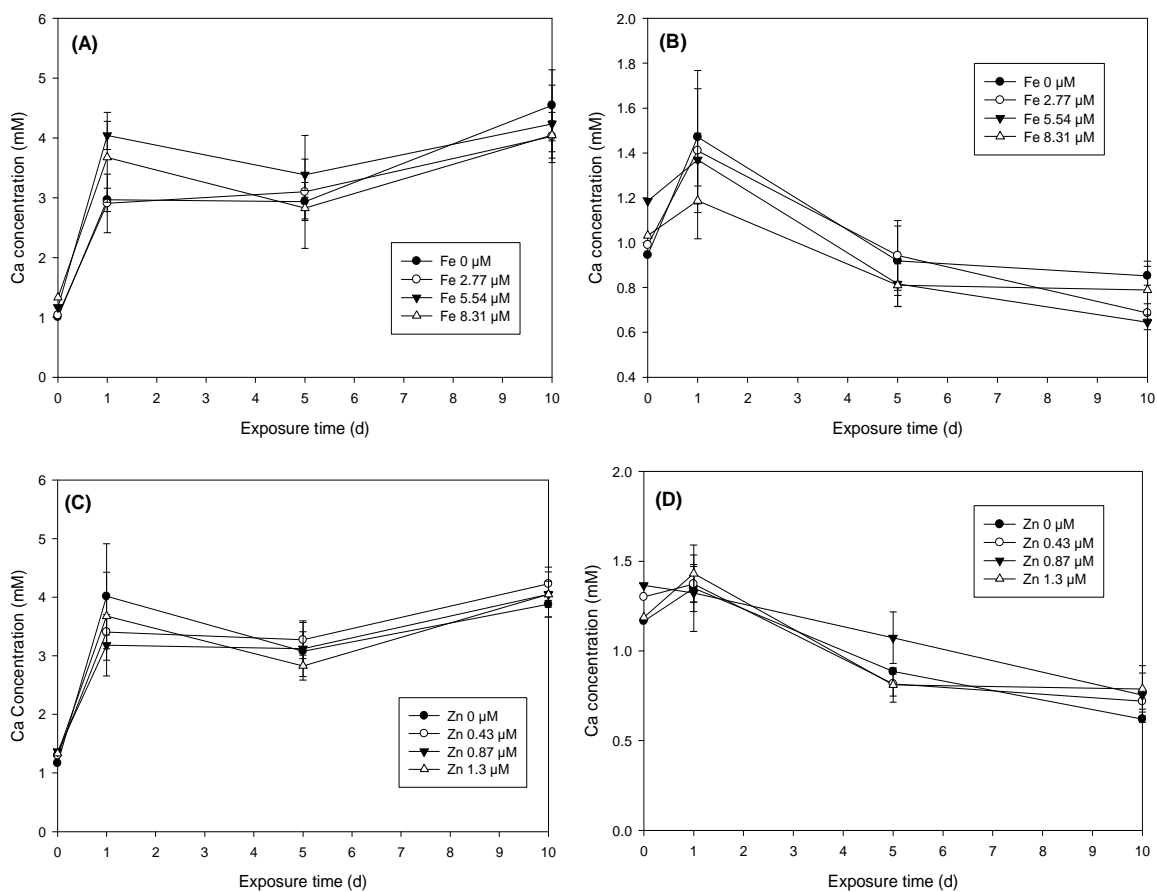


Figura 1. Contenido de calcio en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb (A, C) y Cd (B, D) a la concentración de 10 μM bajo diferentes condiciones de Fe (A, B) y Zn (C, D).

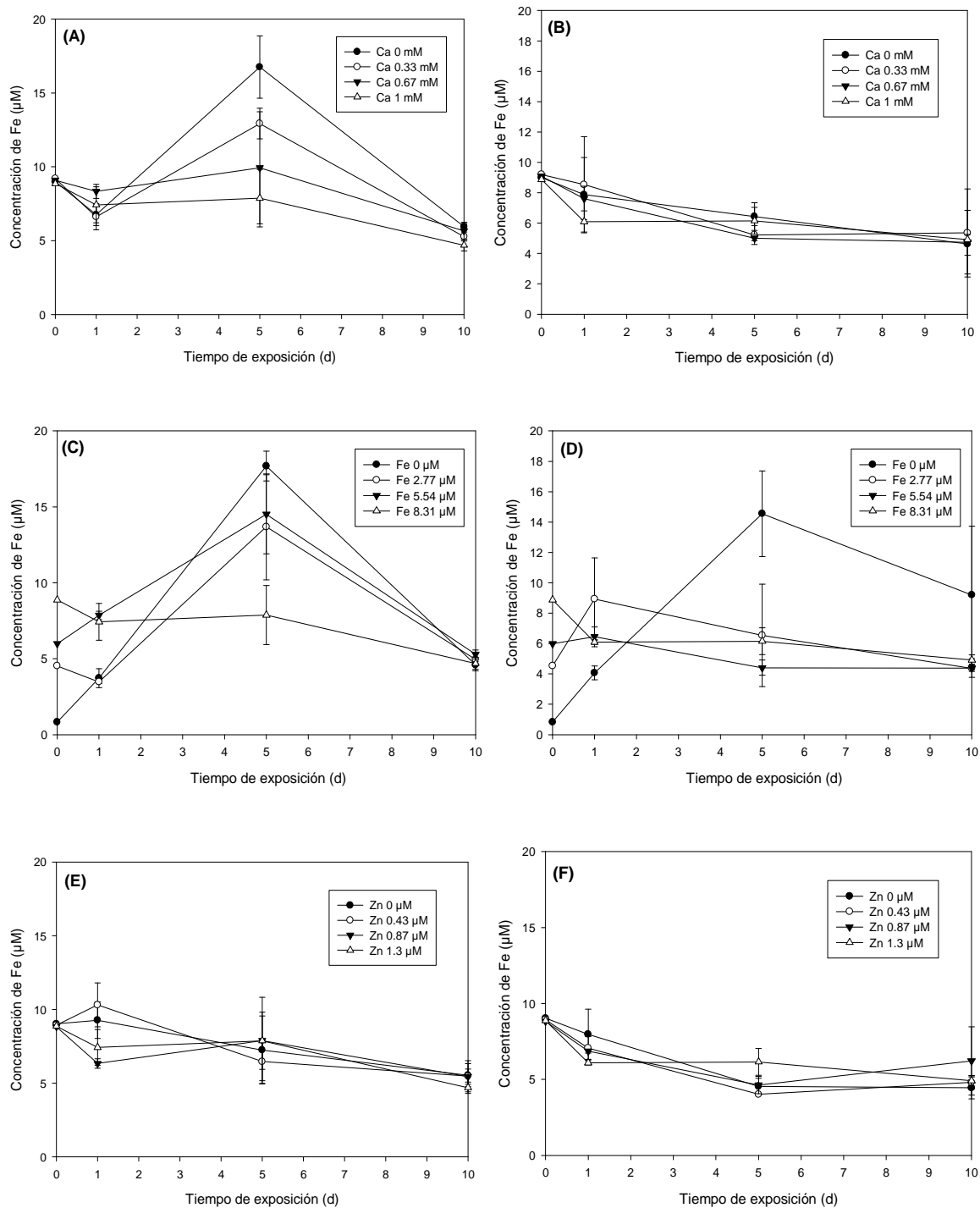


Figura 2. Contenido de hierro en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb (A, C, E) y Cd (B, D, F) a la concentración de 10 µM bajo diferentes condiciones de Ca (A, B), Fe (C, D) y Zn (E, F).

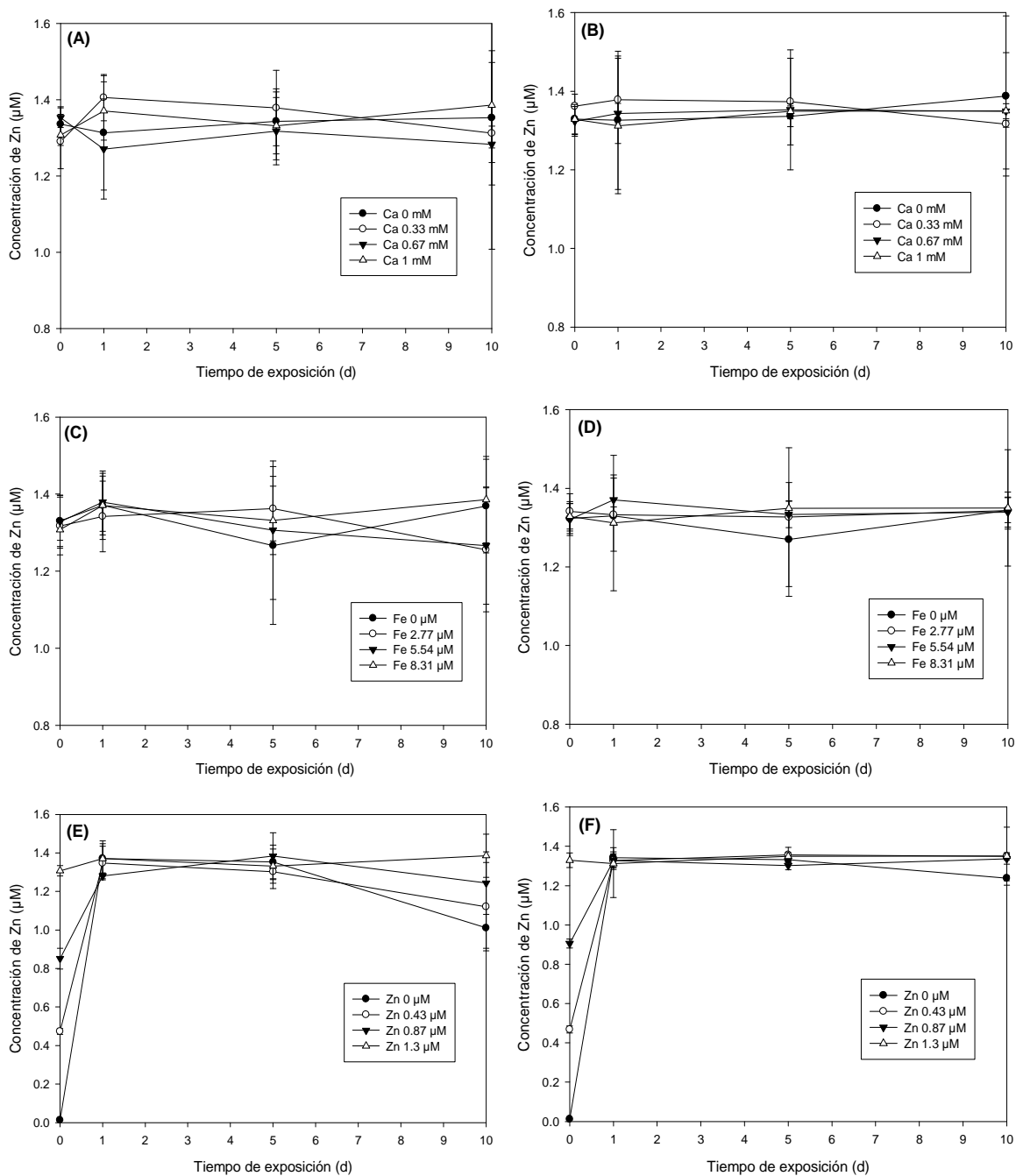


Figura 3. Contenido de zinc en las soluciones de experimentación de Vetiver conteniendo Pb (A, C, E) y Cd (B, D, F) a la concentración de 10 µM bajo diferentes condiciones de Ca (A, B), Fe (C, D) y Zn (E, F).

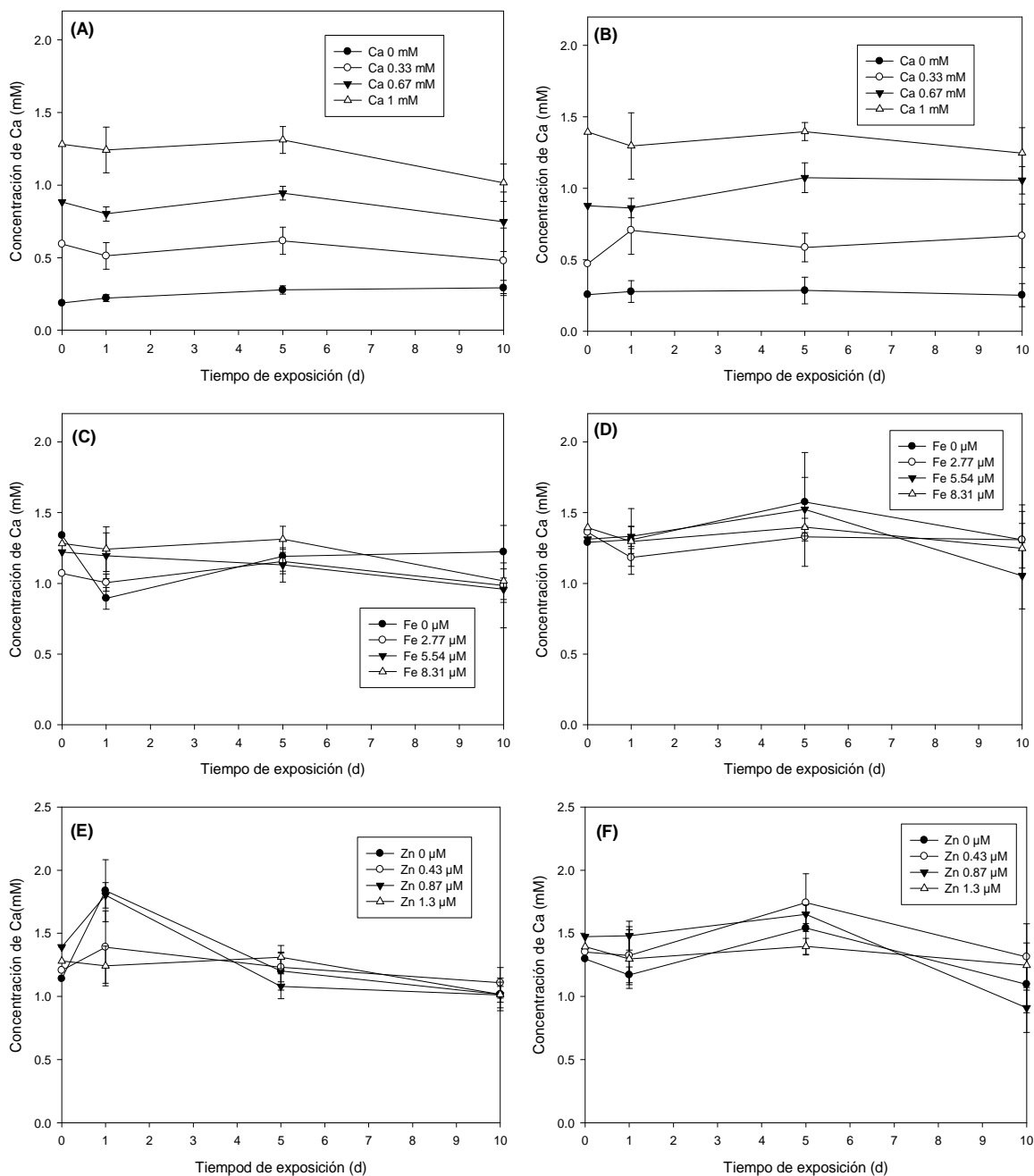


Figura 4. Contenido de calcio en las soluciones de experimentación de Espadaña conteniendo Pb (A, C, E) y Cd (B, D, F) a la concentración de 10 μM bajo diferentes condiciones de Ca (A, B), Fe (C, D) y Zn (E, F).

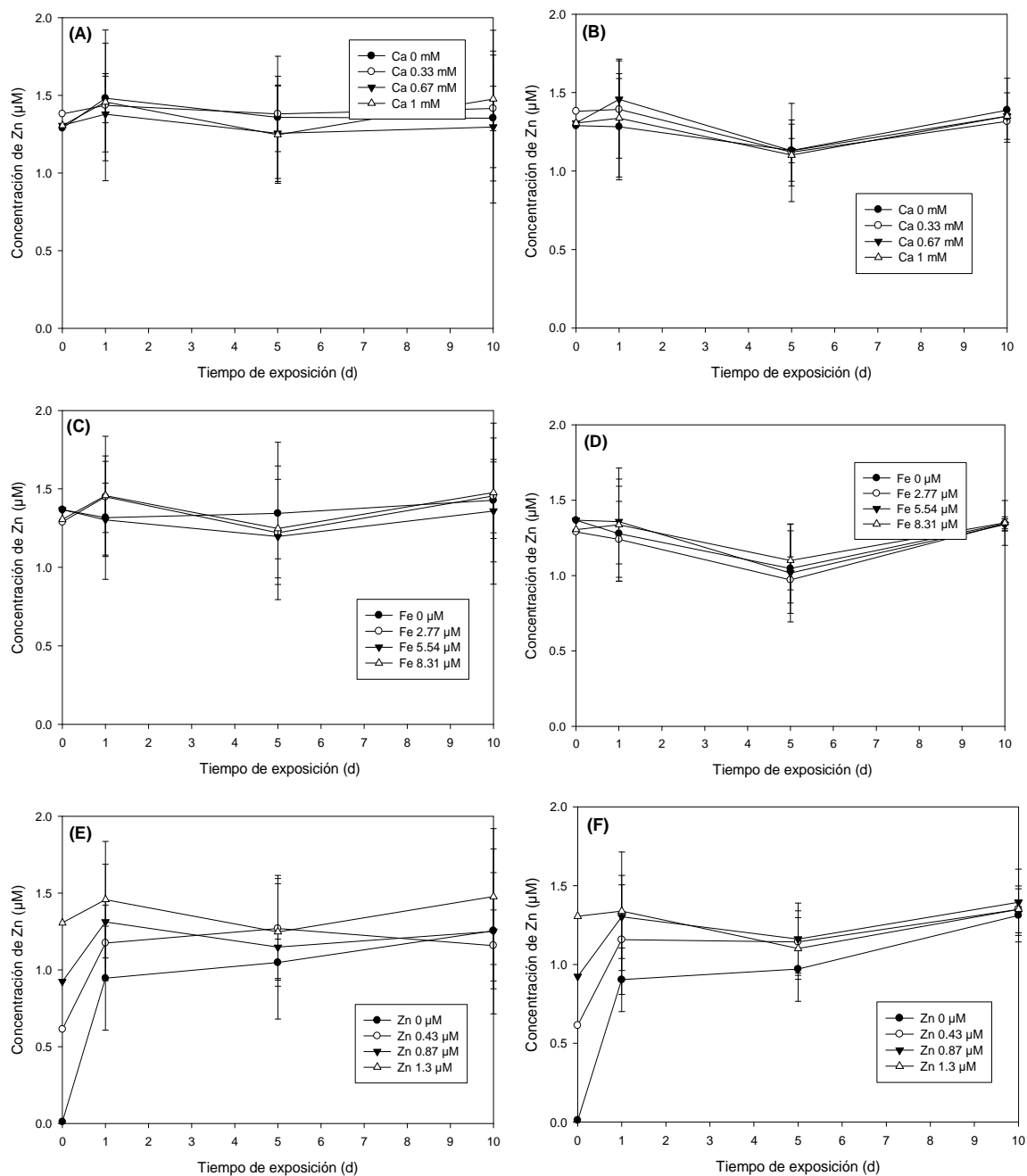


Figura 5. Contenido de zinc en las soluciones de experimentación de Espadaña conteniendo Pb (A, C, E) y Cd (B, D, F) a la concentración de 10 µM bajo diferentes condiciones de Ca (A, B), Fe (C, D) y Zn (E, F).