

U 2
c. 1

RESPUESTAS DE ALFALFA AL ESTRES ARSENICAL

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Alex Quaas Fermandois

Julio, 1998

Director de Tesis: Dra. Luz María Pérez Roepke

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la facultad de ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ALEX QUAAS FERMANDOIS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 5 de junio de 1998.

Director de Tesis:

Dra. LUZ MARIA PEREZ



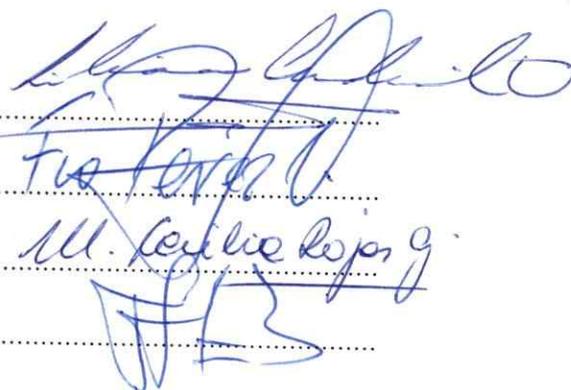
Comisión de evaluación de la Tesis

Dr. LUIS CORCUERA

Dr. FRANCISCO PEREZ

Dra. MARIA CECILIA ROJAS

Dr. FERNANDO ZAMBRANO



A Mónica, Alvaro y Carolina

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Fue financiada por los proyectos FONDECYT 2940002 y proyecto-beca PG-098-94, Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile.

En el desarrollo de esta tesis recibí la crítica y el aporte a este trabajo como también el apoyo, el estímulo, y la comprensión de muchas personas, a todas las cuales les agradezco su desinteresada colaboración. En forma especial debo agradecer:

A la Dra. Luz María Pérez R., quién junto con recibirme en su grupo de trabajo, aceptó la proposición de este trabajo, contando con su completo

apoyo y estímulo, como también su aporte crítico y comprensión en cada una de las etapas de esta tesis.

Al Dr. Luis Corcuera, por facilitar los instrumentos IRGA y PEA para realizar los análisis de asimilación de CO_2 y de fluorescencia en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, como también por sus valiosas sugerencias y discusión de esta tesis.

Al Dr. Jorge Garrido, por su disposición de realizar en su Laboratorio los análisis de Microscopía Electrónica.

Al Dr. León Bravo, por la colaboración prestada en las determinaciones de asimilación de CO_2 y de fluorescencia.

Al Magister Marcelo Jara, por su colaboración en la realización de los análisis de arsénico por la técnica de Espectroscopía de Absorción Atómica, en el Laboratorio de Evaluación Arsenical, Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Antofagasta.

Al Sr. Leonardo Figueroa, académico de la Universidad de Tarapacá, por proporcionar las semillas de alfalfa de la variedad que crece y se cultiva en el Valle de Lluta.

A la Dra. Daniela Seelenfreund, por su constante apoyo y análisis crítico de esta tesis como también por su invaluable colaboración en el análisis de los resultados de la Microscopía Electrónica.

A Cristian Gómez, por la colaboración prestada en parte de esta tesis.

A Nora Fanta, Patricia Pozo y Patricia Castañeda, por su amistad, comprensión y colaboración en el desarrollo experimental de esta tesis.

A las Dras. María Antonieta Valenzuela, Ana María Ketlun, Marta Mancilla, Aída Traverso y Lucía Collado, académicas del Laboratorio de Bioquímica General de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por su constante apoyo y sugerencias.

A la secretaria Patricia Fuentealba y a los asistentes Pedro Melo y Yesica Hurtado, quienes siempre estuvieron dispuestos a facilitar mi trabajo.

INDICE GENERAL

	Página
Indice de Materias	vi
Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
Abreviaturas	xiv
Resumen	xvi
Summary	xxi
1 Introducción	1
1.1 Antecedentes Generales	1
1.2 Antecedentes Específicos	17
2 Materiales y Métodos	27
2.1 Reactivos químicos y material biológico	27
2.1.1 Reactivos químicos	27
2.1.2 Material Vegetal	28
2.2 Métodos	29
2.2.1 Tratamiento de arena	29
2.2.2 Tratamiento de las semillas de alfalfa previo a la siembra	29
2.2.2.1 Determinación de viabilidad aparente de las semillas	29
2.2.2.2 Hidratación y esterilización de semillas	30
2.2.3 Siembra de semillas de alfalfa	31

2.2.4	Tratamiento químico durante la germinación y desarrollo de la plántula	31
2.2.5	Germinación de las semillas de alfalfa	32
2.2.5.1	Condiciones de germinación	32
2.2.5.2	Determinación de semilla germinada	32
2.2.5.3	Porcentaje de semillas germinadas	33
2.2.5.4	Desarrollo y crecimiento de plántulas	33
2.2.6	Índice de tolerancia media	34
2.2.7	Determinación de biomasa	34
2.2.8	Preparación de homogeneizados de plántulas de alfalfa	35
2.2.8.1	Amortiguador de extracción de enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL)	36
2.2.8.2	Amortiguador de extracción de enzima Gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa (G-3-PDH)	36
2.2.8.3	Amortiguador de extracción de enzima adenosín trifosfatasa (ATPasa)	37
2.2.8.4	Controles no enzimáticos	37
2.2.8.5	Determinación de proteínas en homogeneizados de plántulas de alfalfa	37
2.2.9	Determinación de actividades enzimáticas en plántulas de alfalfa	38
2.2.9.1	Fenilalanina amonio-liasa (PAL).	38
2.2.9.2	NAD ⁺ -Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)	39
2.2.9.3	Adenosín-trifosfatasa (ATPasa)	39
2.2.10	Determinación de fluorescencia	40
2.2.11	Determinación de asimilación de CO ₂	41
2.2.12	Microscopia Electrónica de transmisión	42
2.2.13	Determinación de Arsénico por Espectroscopía de Absorción Atómica	43
2.2.13.1	Preparación de muestras vegetales	43
2.2.13.2	Determinación de arsénico	43
2.2.14	Tratamiento estadístico de los datos	44

3 Resultados	45
3.1 Germinación y Desarrollo	45
3.1.1 Germinación	45
3.1.2 Desarrollo y crecimiento de plántulas de alfalfa	48
3.1.2.1 Desarrollo y crecimiento radicular	48
3.1.2.1.1 Efecto de arsenito	48
3.1.2.1.2 Efecto de arseniato	50
3.1.2.2 Desarrollo y crecimiento de hipocotilo	53
3.1.2.2.1 Efecto de arsenito	53
3.1.2.2.2 Efecto de arseniato	55
3.2 Índice de tolerancia media	57
3.3 Biomasa	61
3.4 Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa y distribución en los tejidos	61
3.4.1 Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55	63
3.4.2 Distribución de arsénico en tejidos de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55	68
3.5 Asimilación de CO ₂ en plántulas de alfalfa.	68
3.6 Análisis de Fluorescencia en Plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55	70
3.6.1 Determinación del parámetro Fo	72
3.6.2 Determinación de la eficiencia fotosistema II: Fv/Fm	74
3.6.3 Determinación del parámetro Fv	74
3.7 Morfología de cloroplastos en hojas de plántulas de alfalfa	77
3.7.1 Morfología de organelos en hojas de plántulas controles	77
3.7.2 Efecto de arsenito y arseniato sobre la variedad de alfalfa Lluta	79
3.7.3 Efecto de arsenito y arseniato sobre la variedad de alfalfa WLSL	79
3.7.4 Efecto de arsenito y arseniato sobre la variedad de alfalfa California 55	82
3.8 Determinación de actividades Enzimáticas en plántulas de alfalfa	82
3.8.1 Fenilalanina amonio liasa (PAL)	85

3.8.2	NAD ⁺ -Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)	90
3.8.3	Adenosin trifosfatasa (ATPasa)	95
4	Discusión	100
4.1	Germinación y Desarrollo	100
4.2	Actividad fotosintética	117
4.3	Actividades Enzimáticas	123
5	Conclusiones	132
6	Bibliografía	137

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efecto de arsenito y de arseniato en la biomasa de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55.	62
Tabla 2. Distribución de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas arsenito.	69
Tabla 3. Distribución de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arseniato.	69
Tabla 4. Asimilación de CO ₂ en plántulas de alfalfa.	71
Tabla 5. Recuento de grana y de tilacoides en cloroplastos de plántulas de alfalfa.	80

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Germinación de semillas de alfalfa.	47
Figura 2. Efecto de arsenito sobre el desarrollo radicular de plántulas de alfalfa.	49
Figura 3. Efecto de arseniato sobre el desarrollo radicular de plántulas de alfalfa.	52
Figura 4. Efecto de arsenito sobre el desarrollo de hipocotilo de plántulas de alfalfa	54
Figura 5. Efecto de arseniato sobre el desarrollo de hipocotilo de plántulas de alfalfa	56
Figura 6. Índice de tolerancia media (ITM) de plántulas de alfalfa tratadas con arsenito	59
Figura 7. Índice de tolerancia media (ITM) de plántulas de alfalfa tratadas con arseniato	60
Figura 8. Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arsenito	64
Figura 9. Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arseniato	67
Figura 10. Efecto de arsénico sobre los niveles de fluorescencia basal en plántulas de alfalfa.	73

Figura 11. Efecto de arsénico sobre la eficiencia fotosintética en plántulas de alfalfa	75
Figura 12. Efecto de arsénico sobre los niveles de fluorescencia variable en plántulas de alfalfa.	76
Figura 13. Morfología de organelos en células de hojas de plántulas de alfalfa	78
Figura 14. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad Lluta	81
Figura 15. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad WLSL	83
Figura 16. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad California 55	84
Figura 17. Efecto de arseniato sobre la actividad de la enzima Fenil alanina amonio liasa (PAL) en plántulas de alfalfa.	87
Figura 18. Efecto de arsenito sobre la actividad de la enzima Fenil alanina amonio liasa (PAL) en plántulas de alfalfa.	89
Figura 19. Efecto de arseniato sobre la actividad de NAD ⁺ -Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en plántulas de alfalfa.	92
Figura 20. Efecto de arsenito sobre la actividad de NAD ⁺ -Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en plántulas de alfalfa.	94
Figura 21. Efecto de arseniato sobre la actividad ATPasa total en plántulas de alfalfa.	97

Figura 22. Efecto de arsenito sobre la actividad ATPasa total en plántulas de alfalfa.	99
Figura 23. Longitudes de radícula e hipocotilo de plántulas de alfalfa y acumulación de arsénico en el tejido vegetal	107

ABREVIATURAS

AAS	espectroscopía de absorción atómica
As	arsénico
ATPasa	adenosín trifosfatasa
BSA	seroalbúmina de bobino
Ca55	alfalfa variedad California 55
DMA	dimetilarsénico
dm	decimetro
DSMA	metanoarseniato disódico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EPA	agencia de protección ambiental
F ₀	fluorescencia basal
F _m	fluorescencia máxima
F _v	fluorescencia variable
G3PDH	gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa
HEPES	ácido (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico)
IC ₅₀	inhibición de la catalisis en un 50 %
IRGA	analizador infrarrojo de gases
ITM	índice de tolerancia media

kat	katar
LD ₅₀	dosis letal 50%
Lluta	variedad de alfalfa producida en el valle de Lluta, I ^a Región
MES	ácido (2-N-morfolino)etanosulfónico
MMA	monometilarsénico
MSMA	metanoarseniato monosódico
β-NAD	β- nicotinamida dinucleotido
p	probabilidad estadística
PAL	Fenilalanina amonio-liasa
PEA	analizador de la eficiencia de la planta
PEG-4000	polietilenglicol 4000
Pi	fosfato inorgánico
PSII	fotosistema II
p/v	porcentaje peso /volumen
R ²	coeficiente de correlación
s	segundo
Tris	tris (hidroximetilaminoetano)
v/v	porcentaje volumen/volumen
WLSL	alfalfa variedad super lechera Baldrich

RESUMEN

En Chile, se encuentran elevados niveles de arsénico en la primera y segunda regiones del país, cuyos suelos son de origen volcánicos y donde se encuentra concentrada la gran minería del cobre. En estas dos regiones se cultivan diversos vegetales para el consumo humano y animal, entre los que se destaca el cultivo de la alfalfa por su importancia en la alimentación del ganado de la zona.

En el presente trabajo se analizó el efecto de las especies arsenicales arsenito y arseniato sobre: a) la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*), la acumulación de estas especies arsenicales en diferente órganos de la planta, comportamiento del fotosistema II y asimilación de CO₂ (efectos fisiológicos); b) morfología de cloroplastos y c) actividades enzimáticas relacionadas con respuestas a estrés (efectos bioquímicos), con el fin de comprobar la hipótesis planteada:

“las variedades de alfalfa que pueden cultivarse en suelos con alto contenido arsenical son más tolerantes a este tipo de estrés que aquellas que se cultivan en suelos que no contienen arsénico”. Para ello se seleccionaron las siguientes variedades: **Lluta**, cuyas semillas fueron obtenidas del valle de Lluta, I^a Región, con suelos de alto contenido arsenical; **WLSL**, cuyas semillas se modificaron para ser cultivadas en distintos tipos de suelo y condiciones climáticas; y **California 55**, cuyas semillas se cultivan en la zona central de Chile donde los suelos no contienen arsénico.

El estudio se inició analizando el efecto de arsenito y arseniato sobre la germinación de las semillas de las tres variedades de alfalfa. Se estableció que estas especies químicas no afectaban el proceso germinativo. Luego se analizó el desarrollo radicular y del hipocotilo en las tres variedades de alfalfa cultivadas en presencia de arsenito o de arseniato. El desarrollo de ambos tejidos fue inhibido, aún cuando el arseniato produjo un mayor efecto inhibitorio. A partir de los resultados de desarrollo y crecimiento radicular de las plántulas de alfalfa, se calcularon los índices de

tolerancia media para las tres variedades de alfalfa. Se estableció que la variedad Lluta era la más tolerante.

Cuando se estudió el comportamiento fotosintético de las tres variedades de alfalfa, en presencia de arsenito o arseniato se observó que el arsenito producía una disminución en la asimilación de CO_2 , en la eficiencia del fotosistema II, en la biomasa y alteraba la morfología de los cloroplastos, sin alterar otros organelos celulares. Esta alteración de los cloroplastos se manifestó a través de una disminución del número de grana y formación de vesículas que se asociaban a los tilacoides. A su vez, el arseniato, produjo efectos semejantes solamente en la variedad California 55. Estos resultados correlacionaron bien con la distribución de arsénico en las plántulas de alfalfa, ya que aquellas tratadas con arsenito, acumulaban arsénico en sus hipocotilos ; mientras que aquellas tratadas con arseniato, lo hacían en sus raíces.

La absorción de las especies arsenicales en plántulas enteras de alfalfa resultó ser diez veces menor en la variedad Lluta. Adicionalmente, al

analizar la absorción en función de las concentraciones de arsenito o arseniato, se pudo determinar que las variedades WLSL y California 55 corresponden al de tipo “acumuladoras”, mientras que la variedad Lluta presenta un comportamiento de carácter “excluyente”.

Finalmente, arsenito y arseniato afectaron las actividades de las tres enzimas analizadas: Fenilalanina amonio-liasas (PAL), NAD^+ -Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y Adenosíntrifosfatasa (ATPasa) en las tres variedades de alfalfa estudiadas. Estas, tratadas con arsenito, disminuyeron la actividad de la PAL y no mostraron actividad de G3PDH después del tratamiento a tiempos largos, y aumentaron la actividad de ATPasa total. La variedad Lluta no modificó su actividad de PAL en respuesta al tratamiento con arseniato, pero disminuyó su actividad de G3PDH y aumentó la actividad de ATPasa total. Las variedades WLSL y California 55, disminuyeron la actividad de la G3PDH. La variedad WLSL aumentó tanto su actividad de PAL como la de ATPasa, mientras que la variedad California 55 disminuyó su actividad de PAL y mantuvo la actividad de la ATPasa. El efecto de arseniato sobre la actividad ATPasica

fue el de incrementar sus niveles en las plantulas de las variedades Lluta y WLSL, mientras que no tiene efecto en la variedad California 55.

Los resultados permiten concluir que la variedad Lluta, que se cultiva en suelos con alto contenido arsenical, es más tolerante a este tipo de estrés que las variedades WLSL y California 55.

SUMMARY

Soils from regions I and II of Chile, have a vulcan origin and contain several minerals where the main one is copper. They contain high levels of arsenic and are used for cultivation of different plants for human and animal consumption. Among these, alfalfa is one of the most important because of its use for animal feeding.

The effect of different arsenic species, arsenite and arsenate, was studied on: a) germination of seeds and development of seedlings from alfalfa (*Medicago sativa*), accumulation of these arsenic species in different organs of the plant, behaviour of photosystem II and CO₂ assimilation (physiological effects); b) chloroplast morphology and c) enzyme activities related to stress response (biochemical effects), in order to test the following hypothesis: **“alfalfa varieties which can be cultivated in soils with high arsenic content are more tolerant to this type of stress than those cultivated in soils without arsenic”**. For this purpose, the following

varieties were selected: **Lluta**, because of its culture in soils with high arsenic content such as Lluta valley, I region of Chile; **WLSL**, modified to be cultivated in different types of soils and weather conditions; and **California 55**, which is normally cultivated in Central Chile, where soils do not contain arsenic.

First, the effect of arsenite and arsenate was tested on germination of alfalfa seeds. None of these chemical species affected germination of any of the three alfalfa varieties. The analysis of the effect of these arsenic species on radicle and hypocotyl development showed that both arsenite and arsenate decreased radicular and hypocotyl lengthening, although arsenate was the anion which affected the most. From these results, the mean tolerance index was calculated and it was established that Lluta variety was the most tolerant to arsenic stress.

When photosynthetic parameters were analyzed, a decrease in CO₂ assimilation, in photosystem II efficiency and in biomass, along with an alteration of the morphology of chloroplasts were observed as a result from

arsenite treatment in the three alfalfa varieties. This alteration was visualized as a decrease in grana number and vesicle formation closed to thylacoidal membranes. On the other hand, arsenate only affected California 55 variety in a similar way as arsenite. These results correlate well with arsenic distribution: plants treated with arsenite accumulated arsenic in their hypocotils, while those treated with arsenate showed arsenic mainly in their roots.

Absorption of arsenic in whole alfalfa seedlings was 10 times less in Lluta variety as compared with WLSL and California 55. In addition, the analysis of the concentration-dependent absorption of arsenite or arsenate allowed to establish that WLSL and California 55 varieties are accumulative plants, while Lluta variety is an excluder one.

Finally, arsenite and arsenate affected the activity of the three enzymes studied: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), NAD^+ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) and Adenosine triphosphatase (ATPase), in all three alfalfa varieties. Their treatment with

arsenite resulted in a decrease of PAL activity and a in a suppression of G3PDH activity after long time treatments; but in an increase of total ATPase. Lluta variety did not change its PAL activity in response to arsenate treatment, decreased its G3PDH and increased its total ATPase. On the other hand, both WLSL and California 55 decreased their G3PDH activity. WLSL increased PAL activity as well as its ATPase, while California 55 decreased PAL and maintained its ATPase activities. Then, arsenate induced an increase of ATPase activity in Lluta and WLSL, and did not affect this enzyme activity in California 55 variety.

Results allow to conclude that Lluta variety, which is cultivated in soils with high arsenic content is more tolerant to this type of stresses than WLSL and California 55.

1 INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

El arsénico es un elemento de transición o metaloide y pertenece al grupo V, que se caracteriza porque los elementos que lo constituyen -nitrógeno, fósforo, arsénico, antimonio y bismuto- presentan diferencias en sus propiedades metálicas. Los elementos más livianos del grupo V son no metálicos y los más pesados son metálicos, mientras que los elementos ubicados en la parte intermedia del grupo, como es el caso del arsénico, tienen características tanto metálicas como no metálicas (Sienko y Plane, 1966).

Los elementos metálicos que tienen una densidad superior a 6 g/cm^3 , se denominan metales pesados (Carrasco, 1994), y se caracterizan por ser altamente tóxicos y letales a la mayoría de los organismos vivos (Hartl, 1980). Aunque la densidad del arsénico sólo es de $5,45 \text{ g/cm}^3$, dadas sus

características metálicas y tóxicas; es considerado por algunos autores como un metal pesado (Bolt y Bruggenwert, 1976; Hartl, 1980).

El arsénico es de origen volcánico y se distribuye amplia y heterogéneamente en la naturaleza: el 90 % del arsénico inorgánico se encuentra en la litósfera (rocas, suelos y sedimentos), entre un 7 % y 8 % se distribuye en la atmósfera y porcentajes menores en la hidrósfera (mares, lagos, cursos de aguas superficiales y profundos) y en la biósfera. El arsénico forma diversos compuestos químicos, dependiendo del estado de oxidación que presente el átomo de arsénico: +3, +5 y -3. La contaminación natural de los suelos y del medio ambiente con arsénico, se produce por solubilización del material geoquímico de origen volcánico que es transportado, principalmente, por el agua desde sus orígenes cordilleranos hacia los valles y suelos que se encuentran a nivel del mar (Sancha, 1994).

El arsénico se encuentra presente en numerosos minerales, determinándose las concentraciones más altas de éste en los arsenitos de cobre, plomo, plata, oro o en los sulfuros, siendo la arsenopirina (FeAsS) el

mineral que contiene mayor cantidad de arsénico. Además, se encuentra en los minerales de carbón y es uno de los componentes del petróleo (Tchernitchin y Tchernitchin, 1991).

En zonas no volcánicas y/o no contaminadas, los contenidos de arsénico son de 1 a 5 mg/m³ en el aire, de 5 a 6 mg/kg en el suelo, de 2 mg/kg en la corteza terrestre y menores de 0,01 µg/l en aguas superficiales. El arsénico, en zonas volcánicas o contaminadas, alcanza concentraciones de 550 mg/kg en suelos, de 0,3 µg/ml en aguas superficiales, de 280 µg/ml en aguas subterráneas y de 9 µg/ml en aguas termales (Walsh y Keeney, 1975). En general, los suelos tratados y/o contaminados con arsénico inorgánico contienen niveles del contaminante 10 a 100 veces mayores que los suelos no tratados (Walsh y col., 1977), mientras que éstos últimos raramente contienen concentraciones de arsénico superiores a 10 mg/kg (Walsh y Keeney, 1975).

Las especies arsenicales experimentan diferentes reacciones en los suelos en que se encuentran. Los compuestos organoarsenicales pueden

ser oxidados y reducidos por la acción de microorganismos (Marcus y Rains, 1982). Por ejemplo, el ácido cacodílico es oxidado a arseniato o reducido a metil arsinas volátiles (Woolson, 1977; Woolson y Kearney, 1973); mientras que el arseniato reacciona con hierro y aluminio presentes en los suelos para formar arseniatos insolubles (Woolson y Kearney, 1973). Al respecto cabe mencionar que en la ciudad de Antofagasta, el agua fue tratada con aluminio y en la actualidad es tratada con hierro con la finalidad de precipitar el arsénico y disminuir así su concentración en el agua potable que se suministra a la población (ESSAN, comunicación personal).

Dada las altas concentraciones de arsénico que se han determinado en suelos y aguas de regadíos en zonas contaminadas (Pastenes y col., 1992; Smith y col., 1992), las poblaciones vegetales, animales y humanas que habitan estos lugares están más expuestas a la asimilación e ingesta de las especies arsenicales, con los consiguientes efectos que el arsénico tiene en la producción agrícola y riesgo en la salud de los animales y del hombre.

La presencia de arsénico en el aire se debe, en un porcentaje importante, a fuentes contaminantes de carácter antrópicas. En este sentido, la combustión del carbón mineral y la refinación de minerales de cobre, plomo y zinc, entre otros, constituyen la principal fuente de emisión de arsénico al aire, ya que estos procesos que se producen a alta temperatura, favorecen la volatilización del arsénico producido como subproducto en los procesos de fundición (Tchernitchin y Tchernitchin, 1991).

El arsénico en su estado de oxidación +3, forma los compuestos inorgánicos trióxido de arsénico (As_2O_3), óxido arsenioso (arsénico blanco), ácidos arseniosos (H_3AsO_3 , HAsO_2^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-}), tricloruro de arsénico (AsCl_3) y trisulfuro de arsénico (As_2S_3). El arsénico en su estado de oxidación +5, forma los compuestos inorgánicos pentóxido de arsénico (As_2O_5), ácido arsénico u ortoarsénico (H_3AsO_4), y los ácidos arsenenucos, arseniatos y sus sales (HAsO_3^- , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-}) (Jolliffe, 1993). El arsénico también forma parte de compuestos orgánicos como el ácido monometilarsénico, ácido dimetilarsénico, óxido de trimetilarsina, monometilarsina, dimetilarsina, ácido arsanílico, arsfenamina, carbarsona,

triparsamida, ácido 3-nitro-4-hidroxi-fenilar sénico, ácido 4-nitrofenilar sénico, arsenobetaina, arsenocolina, dialcildicloroarsina, alcildicloroarsina, entre otros que se han determinado en la naturaleza (Jolliffe, 1993; Knowles y Benson, 1983; Shibata y col., 1992).

Generalmente, los compuestos arsenicales presentes en los suelos y aguas contaminadas dependen de las características del medio: si éste es oxigenado y tiene pH básico, preferentemente se encontrarán compuestos formados por arsénico oxidado o pentavalente, mientras que en aquellos medios reducidos y/o ácidos, los compuestos mayoritariamente estarán formados por arsénico reducido o trivalente (Sancha, 1994).

La toxicidad del arsénico depende del estado de oxidación del elemento. Se ha establecido que los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los compuestos orgánicos, existiendo diferencias en el grado de toxicidad entre los compuestos inorgánicos y orgánicos entre sí. De acuerdo al LD₅₀, determinado en ratas y monos, se puede establecer un gradiente de toxicidad entre los compuestos arsenicales, que ordenados de mayor a menor

es: As III > As V > Monometilarsénico > Dimetilarsénico > Trimetilarsénico > Arsenocolina > Arsenobetaina (Shibata y col., 1992).

A través de la historia y en la actualidad, el arsénico -cuyo nombre proviene de la palabra griega "arsenicon" que significa "potente"- se ha utilizado ampliamente en medicina, ganadería, agricultura, electrónica, metalurgia, en la fabricación de vidrio y de material pirotécnico, e incluso como gas de guerra en la forma de 2-clorovinilarsina, denominado gas Lewisita, reconociéndose su época de esplendor en los siglos XVIII y XIX (Tchernitchin y Tchernitchin, 1991).

En agricultura, los compuestos monometilarsénico (MMA) y dimetilarsénico (DMA), así como sus derivados, se han usado frecuentemente como pesticidas, herbicidas y desfoliantes (Knowles y Benson, 1983; Smith y col., 1992). Los herbicidas y desfoliantes arsenicales fueron usados hasta la década de los sesenta en los cultivos de algodón en California (U.S.A.), debido a su gran efectividad y bajo costo (Marcus y Rains, 1982). En 1967, los pesticidas, desfoliantes y herbicidas en base a

compuestos de arsénico inorgánico fueron prohibidos en los Estados Unidos de Norteamérica (Walsh y Keeney, 1975), siendo reemplazados por productos basados en organoarsenicales. Entre estos últimos se encuentran los herbicidas metanoarseniato monosódico (MSMA) y metanoarseniato disódico (DSMA), usados para el control de post-emergencia de las malezas perennes, y el desfoliante óxido de hidroxidimetilarsina o ácido cacodílico, usado en la etapa de cosecha. La aplicación de los plaguicidas y herbicidas que contienen compuestos arsenicales, junto con incrementar la dispersión ambiental del arsénico, aumenta la posibilidad de que el arsénico sea asimilado en mayores cantidades por los vegetales aumentando de esta forma su contenido en arsénico, lo que redundaría en un aumento en la ingesta diaria de arsénico en los animales y en la especie humana a través de su alimentación. Este aumento en la ingesta de arsénico produciría una irritación a nivel gastrointestinal y daños en los tejidos hepático y renal. (Meek y Hughes, 1992).

En ganadería, se han utilizado los derivados orgánicos del arsénico (como derivados fenilados del ácido arsénico), cuyas características

de toxicidad son muy inferiores a las del arsénico inorgánico, como suplemento alimenticio para promover la engorda y el crecimiento de las aves de corral y de otros animales domésticos y de granja. También se han utilizado en la profilaxis de enfermedades entéricas en el ganado, aunque se desconoce su mecanismo de acción. Lo que sí se ha determinado es que, además de la acción benéfica señalada, la ingesta de altas dosis de arsénico aún en su forma de derivados orgánicos, tiene efectos neurotóxicos en los animales (Smith y col., 1992).

A partir de 1700, el arsénico se ha usado como componente de pigmentos y colorantes, de los preservativos utilizados en la industria de la curtiembre, en la fabricación de vidrio (Smith y col., 1992) y en la fabricación de fuegos pirotécnicos (Tchernitchin y Tchernitchin, 1991).

La ingesta media diaria de arsénico en la especie humana, a través de su dieta normal, depende no solo de su alimentación sino también del lugar de residencia o de procedencia de su alimentación. Así, por ejemplo, se han determinados ingestas diarias de 16,7 μg de arsénico en

Canada (Dabeka y col., 1987), de 31,9 μg en Polonia (Nabrzyski y col., 1985), de 45,9 μg en los Estados Unidos de Norteamérica (Gartrell y col., 1986) y de 129 μg en Inglaterra (Hazell, 1985).

Las algas son organismos acumuladores de arsénico, por excelencia, por lo que las concentraciones de arsénico determinadas en las algas son del orden de 1000 mg/kg peso seco o mayores (Reay, 1972), mientras que en el resto de los organismos marinos los contenidos de arsénico son variables, fluctuando su concentración entre 0,5 y 21 mg/kg peso seco (Santa María y col., 1986).

Las algas y los organismos marinos que se encuentran expuestos a altas concentraciones de arsénico inorgánico, tienen la capacidad de metabolizarlo, transformándolo en arsénico orgánico (Budd y Craig, 1981). Como resultado de este proceso metabólico, propio de los organismos acuáticos, se forman arsenobetaína, arsenolípidos y arsenorribósidos, entre otros (Benson, 1989). De esta manera, se entiende

que las algas y organismos marinos, generalmente, no son afectados por el efecto tóxico del arsénico en su desarrollo (Budd y col., 1986).

A pesar de la disminución del uso de arsénico en diferentes áreas en los últimos 60 años, la contaminación proporcionada por este elemento sigue en aumento. Para el año 2.000 se estima un incremento de arsénico como contaminante en un 1 a 2 %, dado que el nivel de arsénico atmosférico se incrementa debido a su mayor volatilización (Pacyna, 1987), producto del proceso de erosión de los suelos, de la actividad volcánica y de la actividad de la industria minera, prevista en nuestro planeta (Moore y Luoma, 1990).

Generalmente, los suelos de áreas contaminadas de la tierra presentan concentraciones tóxicas de uno o más metales pesados, mientras que las concentraciones de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y potasio en estos suelos son anormalmente bajas (Hartl, 1980).

El estudio del efecto de los metales pesados en los vegetales superiores se ha realizado, principalmente, en plantas que se cultivan en suelos vecinos a ciertos yacimientos de minerales o en plantas cultivadas en suelos altamente contaminados con algunos metales pesados (Baker, 1987). Estos estudios se han centrado, preferentemente, en determinar el efecto de zinc y de cobre, ya que estos metales son requeridos en procesos fisiológicos y bioquímicos. El zinc y el cobre, además, de tener importancia en la estructura de algunas proteínas y en la actividad catalítica de varias enzimas, son factores esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Steffens, 1990). El estudio del efecto de otros metales pesados, sólo se ha realizado principalmente en plantas y cultivos de interés comercial que crecen en suelos contaminados con dichos metales (Khattak y col., 1989; Kattak y col., 1991).

El efecto de los metales pesados sobre los vegetales se asemeja al producido por los factores de estrés, ya que modifican procesos bioquímicos y fisiológicos en la planta, cuyo resultado es una disminución

en el vigor del vegetal y, en condiciones extremas, la completa inhibición de su crecimiento (Baker, 1987).

Los mecanismos de resistencia o tolerancia que presentan las plantas frente a la contaminación por metales pesados varían entre las diferentes especies y se pueden clasificar en términos generales en: a) de exclusión, en el cual el metal es impedido de ingresar a la célula; b) de destoxificación interna, en los que el metal al interior de la célula es atrapado, inactivado o secuestrado en compartimentos subcelulares diferentes a aquellos donde afectaría una determinada función; y; c) de excreción, en el cual el metal que ha ingresado a la célula, es eliminado mediante secreción interna (Punz y Sieghardt, 1993).

Los mecanismos bioquímicos involucrados en la alteración de la homeostasis y, eventualmente, de la muerte celular por acción de los metales pesados son poco conocidos. Sin embargo, su toxicidad está relacionada, al menos, a dos eventos: i) Interacción con grupos funcionales de los residuos de aminoácidos de las proteínas, debido a que los metales

pesados reaccionan con los grupos sulfhidrilos, imidazol de histidinas y carboxilatos de cadenas laterales de aminoácidos de proteínas, modificando la estructura y/o función de ellas; y, ii) Formación de radicales libres e inducción de estrés oxidativo, lo que produce alteraciones estructurales de las proteínas debido a oxidación de cadenas laterales de aminoácidos o a coordinación de las mismas con los metales pesados (Readdy y col., 1981).

Existen diversas especies y ecotipos que son capaces de crecer en suelos contaminados por metales pesados, encontrándose diversas especies de plantas tolerantes a ellos, que pertenecen a familias tales como *Caryophyllaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Leguminosae* y *Gramineae* (Antonovics, 1975). Los primeros estudios realizados en plantas a las que se suministró altas concentraciones de metales pesados, demostraron que éstos inhibían el crecimiento de las raíces y de los tallos (Bradshaw, 1952; Wilkins, 1957), inhibían la síntesis de clorofila y las actividades de algunas enzimas (Cox y Hutchinson, 1980a).

Se ha demostrado que la capacidad de la mayoría de las plantas que crecen en suelos metalíferos se debe a que éstas pueden adquirir tolerancia a la toxicidad producida por los metales pesados (Baker, 1987). Las características fisiológicas y bioquímicas relacionadas con este tipo de tolerancia son de carácter hereditaria, y a menudo se producen a través de cambios simples o múltiples a nivel génico (Bell y col., 1962; Wu y Antonovics, 1976; Baker, 1987).

Frecuentemente, la tolerancia desarrollada por los vegetales en respuesta a la toxicidad por metales pesados es específica para el o los metales, y para el o los metaloides presentes en exceso en los suelos (Jowett, 1964). También se ha determinado, en algunos casos, una tolerancia múltiple a metales pesados, como por ejemplo, en clones de *Agrostis gigantea* Roth, que es tolerante a cobre, níquel y cobalto (Hogan y Rauser, 1979), y en *Deschampsia cespitosa* (L.), que es tolerante a cobre, níquel, cobalto, aluminio, plomo, zinc, plata y arsénico, lo que le ha permitido a esta especie invadir vigorosamente áreas contaminadas con metales en las

inmediaciones de la fundición de Sudbury (Cox y Hutchinson, 1979, 1980b, 1981).

En ciertas bacterias Gram negativas y Gram positivas, la resistencia a arsenito y a arseniato se produce a través de proteínas que se encuentran codificadas en plasmidios, y cuya función es transportar las especies arsenicales desde el interior al exterior de las bacterias por un mecanismo activo que requiere ATP (Ji y Silver, 1992; Kaur y Rosen, 1992; Rosenstein y col., 1992; Rossman y col., 1980; Silver y Keach, 1982; Silver y col., 1989).

Finalmente, es interesante mencionar que el arsénico usado en dosis terapéuticas ha servido para el tratamiento de diversas enfermedades y también puede ser considerado como un micronutriente esencial, ya que la ausencia de este elemento en la dieta de animales de granja como pollos, chanchos, ratas y cabras, produce disminución en el crecimiento y una serie de anomalías en la función reproductora (EPA, 1988). Si bien no se ha

informado de la esencialidad del arsénico en la especie humana, se ha estimado que su requerimiento en ésta sería de 10 a 30 $\mu\text{g}/\text{día}$.

1.2 ANTECEDENTES ESPECIFICOS

El efecto tóxico del arsénico en los vegetales, primariamente, se relacionó con la plasmólisis de las raíces y el marchitamiento de las hojas, las que posteriormente se descoloraban, produciéndose una necrosis de sus puntas y márgenes (Machlis, 1941).

En la actualidad, se ha establecido que los efectos fitotóxicos producidos por arsénico en los vegetales son variados y afectan a diversas especies de importancia en la producción agrícola, como arroz (Marin y col., 1992), poroto (Milton y col., 1989), cebollas (Pepper y col., 1988) y algodón (Marcus y Rains, 1982), con el consiguiente perjuicio económico (Walsch y Keeney, 1975; Woolson, 1973).

La asimilación de arsénico en las plantas depende de la concentración de arsénico en los suelos y en las aguas de regadío (Figuroa y

col., 1988; Pepper y col., 1988); del estado de oxidación y del tipo de compuesto químico que forma el elemento (Marín y col., 1992; Anderson y Avron, 1976); del pH y del contenido de arcillas de los suelos (Smith y col., 1992; Pick y Bassilian, 1982) y de la presencia de otros iones y metales (Khattak y col., 1989; Kattak y col., 1991; Meharg y Macnair, 1992; Peryea, 1991). También se ha encontrado que la acumulación de arsénico en los diferentes tejidos de una planta, depende de la especie química del arsénico y de la especie vegetal (Marín y col., 1992; Anderson y Avron, 1976).

Los vegetales que crecen en medios arsenicales o que se han sido sometidos a altas concentraciones de arsénico, muestran respuestas de carácter bioquímico diferentes y variadas. Se ha descrito que en presencia de arseniato: a) se induce la síntesis de fitoquelatinas (Grill y col., 1987; Steffens, 1990); b) se inhiben las enzimas ribulosa-5-fosfato quinasa de cloroplastos de espinaca (Latzko y col., 1970); piruvato deshidrogenasa de *Synechococcus leopoliensis* (Budd y Craig, 1981); glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH málico deshidrogenasa, NADP⁺-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ribulosa-5-fosfato quinasa y pseudoheptulosa-1,7-

difosfatofosfatasa de *Pisum sativum* (Anderson y Avron, 1976), entre otras; c) se producen cambios en la modulación de la actividad de la enzima ATPasa cloroplástica (Lohse y col., 1989); y d) se observa la interferencia en la activación de la fosforilación en *Lemna gibba* (Ullrich-Eberius y col., 1989).

Los efectos de arsénico a nivel celular se pueden explicar en función de las especies químicas arsenito y arseniato. La especie arsenito (As^{3+}) tiene una alta afinidad e interactúa con los grupos sulfhidrilos de proteínas y enzimas, por lo que arsenito alteraría la función celular a través de la inhibición de la actividad catalítica de todas las enzimas que presentan grupos -SH en su sitio activo o directa o indirectamente relacionados con este sitio (Knowles y Benson, 1983). La especie arseniato (As^{5+}) tiene una gran similitud con la estructura electrónica y tridimensional, y con el comportamiento físico-químico del ortofosfato, Pi, de manera que el arseniato compite con el ortofosfato en todos aquellos procesos fisiológicos y bioquímicos en que participa este último (Figuroa y col., 1992). Además, el arseniato impide la formación de los intermediarios fosforilados a nivel

celular, cuya carencia afecta el desarrollo normal de la planta, produciéndose la correspondiente toxicidad a nivel del organismo (Kaur y Rosen, 1992). Adicionalmente, el arseniato es asimilado a través del sistema transportador de ortofosfato que poseen las angiospermas, bacterias, y hongos (Jung y Rothstein, 1965; Asher y Reay, 1979; Beever y Burns, 1980; Silver y Misra, 1988; Ullrich-Eberius y col., 1989).

La alfalfa, *Medicago sativa* L., es una especie herbácea, Dicotiledónea, que pertenece al grupo IX de las leguminosas, a la familia de las *Papilionaceae*, a la tribu IV de la *Trifolieae* y al género *Medicago*. Es el más importante de los cultivos forrajeros en el mundo (Bolton y col., 1972), ya que: a) es una fuente de nitrógeno para otros cultivos rotacionales, b) produce el mejoramiento de los suelos, c) es una fuente completa de nutrientes para la producción de carne y de leche, y d) es un alimento de alta calidad para los animales. Además, se la ha reconocido por su valor medicinal en las afecciones de la piel de los animales (Bolton y col., 1972).

La alfalfa se caracteriza por cultivarse y crecer bajo diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, altas y bajas temperaturas limitan su expansión a nuevas regiones: el efecto de las primeras se traduce en la inhibición de su crecimiento y en la reducción de su producción; mientras que las bajas temperaturas producen daños subletales y letales de invierno, los que están relacionados con una disminución del vigor durante el crecimiento posterior, y de la permanencia (Mckenzie y col., 1988).

La zona más contaminada con arsénico que se encuentra en Chile se ubica en la I y II regiones, con un mayor grado de contaminación en esta última. Así, en la ciudad de Antofagasta se ha detectado un contenido natural de 3,2 g arsénico por kg de suelo. La presencia de arsénico en las aguas superficiales y profundas en la II región de Chile está asociada al volcanismo cuaternario de la cordillera de Los Andes (Pastenes y col., 1992), donde se pueden encontrar concentraciones de arsénico entre 26,27 y 233,28 mg/kg en los suelos superficiales de Chiu-Chiu y Quillagua, II Región (Pastenes y col., 1983; Pastenes y col., 1984).

En estas dos regiones de Chile se cultivan unas 3.000 hectáreas de alfalfa, en suelos y aguas que se caracterizan por ser salinos y arsenicales, lo que influye en los bajos rendimientos por hectárea, no alcanzando a satisfacer las necesidades de consumo del ganado en la zona (Escobar, 1984).

Los estudios relacionados con el efecto de arsénico en alfalfa son escasos en nuestro país. Estos se han limitado a analizar su asimilación y se han realizado en los valles de la provincia de Arica, que tienen diferentes niveles de contaminación arsenical, encontrándose una correlación directa entre los niveles de arsénico en el suelo y en la alfalfa cultivada en dichos valles (Figuroa y col., 1988). El grupo de Khattak en Canadá ha estudiado la influencia de otros elementos químicos que acompañan al arsénico en zonas contaminadas, como es el caso de selenio y molibdeno, encontrando que éstos incrementan la asimilación de arsénico en el vegetal (Khattak y col., 1989). Este mismo grupo ha demostrado que la adición de fosfato inorgánico disminuye la asimilación de arsénico en la planta (Khattak y col.,

1991) y que la acumulación de arsénico se produce principalmente a nivel de las raíces (Khattak y col., 1989).

Se ha establecido que la alfalfa responde a estrés por altas temperaturas sintetizando proteínas de baja masa molecular (Gyorgyey y col., 1991); responde a diferentes condiciones de estrés ambiental incrementando los transcritos para la enzima fenilalanina amonio liasa, los que implican un aumento de su actividad enzimática (Gowri y col., 1991). También se ha descrito en alfalfa, la estructura primaria de una proteína de función desconocida, que es inducida tanto por estrés ambiental como por ácido abscísico (Luo y col., 1991). Sin embargo, en esta especie vegetal no se han descrito los parámetros bioquímicos y/o fisiológicos alterados por el arsénico.

Algunas variedades de alfalfa pueden cultivarse en la I y II regiones de Chile, lo que indica que esta especie vegetal tiene la capacidad para adaptarse y crecer en un medio ambiente de alto contenido arsenical. Es así como la alfalfa denominada como variedad Lluta se ha cultivado durante

décadas en estas regiones. No ocurre lo mismo con otras variedades de alfalfa disponibles en forma comercial.

Considerando los antecedentes mencionados y la importancia de la alfalfa como cultivo forrajero en zonas que presentan altos contenidos de arsénico en suelos, aguas de riego y aerosol, como son la I y II Regiones de Chile, se ha planteado la siguiente hipótesis de trabajo: **“las variedades de alfalfa que pueden cultivarse en suelos con alto contenido arsenical son más tolerantes que aquellas que se cultivan en suelos que no contienen arsénico”**.

Para comprobar esta hipótesis se ha planteado como objetivo general estudiar el efecto que producen las especies arsenito y arseniato en variedades de la especie vegetal alfalfa, *Medicago sativa* L. que se pueden cultivar en suelos con diferente contenido arsenical.

Como objetivos específicos se consideraron:

- a) establecer si arsenito y/o arseniato afectan la germinación de las semillas de las diferentes variedades de alfalfa;
- b) establecer si arsenito y/o arseniato alteran el desarrollo de la plántulas de las diferentes variedades de alfalfa;
- c) establecer si arsenito y/o arseniato se absorben diferencialmente en plántulas de las diferentes variedades de alfalfa;
- d) determinar la distribución de arsénico (arsenito y arseniato) en los diferentes tejidos de las plántulas de las diferentes variedades de alfalfa;
- e) determinar si arsenito y/o arseniato alteran los parámetros fotosintéticos como emisión de fluorescencia y asimilación de CO_2 en plántulas de las diferentes variedades de alfalfa;
- f) determinar si arsenito y/o arseniato modifican la actividad de las enzimas:
 - i) Fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima marcadora de la vía fenilpropanoide e inducible bajo condiciones de estrés ambiental;
 - ii) Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), enzima de la vía glicolítica que usa P_i como sustrato y que tiene grupos -SH en su sitio activo y
 - iii) Adenosín trifosfatasa (ATPasa); enzima ampliamente

- distribuída en la célula, y que genera Pi durante la reacción que cataliza, en plántulas de las diferentes variedades de alfalfa;
- g) establecer si arsenito y/o arseniato modifican la integridad celular de plántulas de las diferentes variedades de alfalfa.

Para cumplir los objetivos planteados se seleccionaron semillas para la obtención de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*) de las variedades Lluta, WLSL y California-55. La elección de estas tres variedades se basó en su capacidad para ser cultivadas en suelos con diferente contenido de arsénico. Una variedad a estudiar se cultiva en el valle de Lluta, en la provincia de Arica, extremo norte de Chile, valle que se caracteriza por la contaminación arsenical de sus suelos y aguas de regadío (*Lluta*); una segunda variedad se ha producido para ser cultivada y crecida bajo diversas condiciones ambientales, (*WLSL*); y una tercera variedad a estudiar es cultivada preferente en la zona central, (*California 55*).

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos químicos y material biológico.

2.1.1 Reactivos químicos.

Todos los reactivos utilizados en el desarrollo experimental de este trabajo de tesis, fueron de grado analítico y se obtuvieron de las firmas comerciales que se indican a continuación:

Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA.

ATP, azul de Coomassie G-250, EDTA, DL-fenilalanina, glicina, DL-gliceraldehido-3-fosfato, glutaraldehido, HEPES, manitol, MES, 2-mercaptoetanol, β -NAD, seroalbumina de bovino (BSA), Trizma base.

Merck Química, Darmstadt, Alemania.

Acetona, ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, ácido tricloroacético, arseniato de sodio, borohidruro de sodio, cacodilato de sodio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, cloruro de sodio, citrato de plomo, dextrano, epoxiresina,

fosfato de potasio, hidróxido de sodio, manilacetato, molibdato de sodio, nitrato de calcio, nitrato de potasio, PEG 4000, sulfato de cobre, sulfato de fierro, sulfato de magnesio, sulfato de zinc.

Riedel de Haën, Seelze, Alemania.

Estándar de trióxido de arsénico.

Bayer de Chile.

Fungicida Captan^{MR}

Otras fuentes de reactivos químicos.

Hipoclorito de sodio (NaOCl) (Clorex).

2.1.2 Material Vegetal.

Se usaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) de tres variedades diferentes: 1) variedad cultivada en valle de Lluta, en la provincia de Arica, 19° latitud sur, primera región, Chile, **Lluta**; 2) variedad WLSL Superlechera de Baldrich, lote 2003, **WLSL**; 3) variedad California 55, **California 55**. Las semillas de las variedades de alfalfa WLSL y California 55 se obtuvieron comercialmente, mientras que las semillas de la variedad

denominada Lluta, fueron gentilmente donadas por el Sr. Leonardo Figueroa (Universidad de Tarapacá, Arica).

Las semillas de alfalfa de las tres variedades en estudio fueron sembradas en arena de río (de origen comercial), la que fue usada como sustrato inerte. El proceso de germinación de las semillas y el desarrollo y crecimiento de las plántulas de alfalfa se realizó en arena sobre sustrato arena, usando como medio de riego una solución Hoagland adicionada de los diferentes tratamientos.

2.2 Métodos.

2.2.1 Tratamiento de la arena.

La arena obtenida comercialmente, fue lavada con agua destilada y posteriormente tratada con fungicida Captan al 1% p/v, para evitar desarrollo de microorganismos durante los tratamientos.

2.2.2 Tratamiento de las semillas de alfalfa previo a la siembra.

2.2.2.1 Determinación de viabilidad aparente de las semillas.

La viabilidad aparente de las semillas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55 se determinó mediante la prueba de flotación. Esta prueba consistió en colocar las semillas en un recipiente con agua y se consideró viable a toda semilla que se sumergió y se mantuvo en el fondo del recipiente, mientras que la semilla que se mantuvo en la superficie del agua se consideró no viable, y fue eliminada. El fundamento de la prueba se basa en que la semilla que flote debe contener en su interior un determinado volumen de aire, lo que supone una disminución del material de reserva existente en ella (proteínas- lípidos- carbohidratos), necesario para que se produzca la germinación de la semilla y el desarrollo de las primeras etapas de la plántula.

2.2.2.2 Hidratación y esterilización de semillas.

Las semillas de alfalfa de las tres variedades en estudio seleccionadas como viables (sección 2.2.2.1), se hidrataron en un vaso de precipitados con agua destilada durante 8 a 12 horas. Las semillas hidratadas se esterilizaron superficialmente para eliminar cualquier microorganismo que pudiera desarrollarse durante la germinación y/o desarrollo,

sumergiéndolas en solución de hipoclorito de sodio comercial al 1% v/v durante 3 minutos, siendo posteriormente, lavadas exhaustivamente con agua destilada estéril antes de ser sembradas.

2.2.3 Siembra de semillas de alfalfa.

Las semillas de alfalfa de las tres variedades se sembraron en grupos de 50 semillas por caja de plástico de 64 cm², en arena previamente tratada (sección 2.2.1) y a 1,5 cm de la superficie. Las semillas se cubrieron con arena, se regaron con solución Hoagland (Arnon y Hoagland, 1940) para los diferentes tratamientos, y se mantuvieron a temperatura ambiente (22 - 25°C) hasta su análisis.

2.2.4 Tratamiento químico durante la germinación y desarrollo de la plántula.

Las semillas y las plántulas controles de alfalfa de las tres variedades se regaron cada 36 horas con solución de Hoagland. Las semillas y las plántulas de las tres variedades de alfalfa tratadas con arsénico, se regaron con solución Hoagland enriquecida con diferentes concentraciones

de arsenito de sodio o arseniato de sodio, de acuerdo a los tratamientos predefinidos. Las concentraciones de arsenito y arseniato en las soluciones de riego fueron de 0- 0,02- 0,04- 0,40- 1,20 y 2,00 ppm.

2.2.5 Germinación de las semillas de alfalfa.

2.2.5.1 Condiciones de germinación.

Las semillas de alfalfa de las tres variedades se germinaron a temperatura ambiente (22° a 25° C), en cajas de plástico tapadas, con el fin de mantener una alta humedad. Las semillas se regaron cada 36 horas con solución Hoagland, en el caso de las semillas controles. Las semillas con tratamiento arsenical se regaron con solución Hoagland adicionada de arsenito o arseniato en las concentraciones correspondiente a cada tratamiento.

2.2.5.2 Determinación de semilla germinada.

Toda semilla que desarrolló una emergencia o crecimiento radicular igual o superior a 0,5 cm de longitud se consideró como semilla

germinada. La medición de la longitud de la radícula de la semilla se realizó con una regla milimetrada o sobre papel milimetrado.

2.2.5.3 Porcentaje de semillas germinadas.

El porcentaje de semillas germinadas se determinó a las 48 horas en las variedades Lluta y WLSL y a las 72 horas en la variedad California 55, mediante la razón entre el número de semillas germinadas y el número de semillas sembradas. El porcentaje de semillas germinadas se obtuvo, para cada variedad de alfalfa, determinando la germinación en al menos 5 cajas compuestas por 50 semillas sembradas, para cada tratamiento.

2.2.5.4 Desarrollo y crecimiento de plántulas.

El desarrollo y crecimiento de las plántulas de alfalfa, de las tres variedades se estudió a través de la medición de la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada plántula tratada con arsenito, con arseniato o no tratada a los cinco y diez días post-germinación. Los resultados

corresponden al promedio de tres cajas que contenían 50 semillas sembradas cada una.

Adicionalmente se midió la longitud de la radícula y del hipocotilo, en forma separada, usando una regla milimetrada y/o papel milimetrado. Cuando el desarrollo no fue lineal, la medición se realizó por segmentos a lo largo del tejido. Los resultados corresponden al promedio de tres cajas que contenían 50 semillas sembradas cada una.

2.2.6 Índice de tolerancia media.

El valor de índice de tolerancia media, medido como porcentaje, se obtuvo de la razón entre el valor medio de la longitud de la raíz o del hipocotilo de plántulas tratadas y el valor medio de la longitud de la raíz o del hipocotilo de plántulas controles (Paliouris y Hutchinson, 1991).

2.2.7 Determinación de biomasa.

La determinación de biomasa en plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55, se realizó a los 15 días de

tratamiento, extrayendo las plántulas de la arena donde se encontraban sembradas evitando que sufrieran daño mecánico. Las plántulas fueron lavadas exhaustivamente con agua destilada, para remover la arena adherida al vegetal y se colocaron sobre papel filtro en una estufa con aireación, marca Memert, a 60° C hasta lograr peso constante. Este se determinó pesando las plántulas en una balanza analítica marca Sartorius. Los resultados se obtuvieron para cada tratamiento considerando 3 cajas de siembra que contenían 50 semillas.

2.2.8 Preparación de homogeneizados de plántulas de alfalfa.

Las plántulas de alfalfa de las tres variedades se extrajeron cuidadosamente de la arena en la cual estaban sembradas, evitando el rompimiento de sus raicillas. Se lavaron exhaustivamente con agua destilada para remover la arena y los iones y compuestos de la solución de riego adheridos a la superficie de las raíces, tallos y hojas del vegetal. El material vegetal se colocó sobre papel absorbente para remover el exceso de agua y luego se pesaron en una balanza granataria Shimadzu. Las plántulas fueron picadas finamente con una hoja de filo simple en una placa Petri, puesta

sobre hielo. Por cada gramo de plántulas se adicionó un ml de amortiguador. El extracto obtenido se filtró a través de gasa y el filtrado se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos en un rotor SS- 34 en una centrifuga Sorvall. En el sobrenadante obtenido se determinó la concentración de proteínas y las actividades enzimáticas.

2.2.8.1 Amortiguador de extracción de enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL).

La extracción de la enzima fenilalanina amonio-liasa del tejido vegetal se realizó con amortiguador borato de sodio 0,1 M pH 8,80, que contenía β -mercaptoetanol 0,01 M recién preparado.

2.2.8.2 Amortiguador de extracción de enzima Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

La extracción de la enzima G3PDH del tejido vegetal se realizó con amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 8,50, que contenía β -mercaptoetanol 0,01 M recién preparado.

2.2.8.3 Amortiguador de extracción de enzima Adenosín trifosfatasa (ATPasa).

La extracción de las enzimas adenosin trifosfatasas se realizó en amortiguador Tris-MES 10 mM pH 6,00.

2.2.8.4 Controles no enzimáticos.

Para la cuantificación de las actividades de PAL, de G3PDH y de ATPasa se realizaron controles no enzimáticos, reemplazando a la enzima por una alícuota equivalente de amortiguador o de enzima hervida. Los valores obtenidos se restaron de los correspondientes valores de actividad.

2.2.8.5 Determinación de proteínas en homogeneizados de plántulas de alfalfa.

La concentración de proteínas de los homogeneizados de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55 se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), haciendo reaccionar una alícuota de muestra de 100 μ l con 3 mL de solución de reactivo de Azul de Coomassie G-250, determinándose la absorbancia a 595

nm en un espectrofotómetro Shimadzu de doble haz UV-150-02. Como estándar se usó una solución de BSA de concentración 0,6 mg/ml.

2.2.9 Determinación de actividades enzimáticas en plántulas de alfalfa.

2.2.9.1 Fenilalanina amonio-liasa (PAL).

La actividad de la PAL se determinó a 290 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02, cuantificando la absorbancia del ácido trans-cinámico - que es el producto de la reacción enzimática y que presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda - formado a partir de L-fenilalanina de acuerdo al método de Zucker (Zucker, 1965). El medio de ensayo se compuso de 650 μ l de amortiguador borato de sodio 0,1 M pH 8,8, β -mercaptoetanol 0,01 M, 750 μ l de L-fenilalanina 20 mM y 100 μ l de enzima. La actividad de la PAL se expresó en μ kat / mg de proteínas, utilizando el valor de $10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el coeficiente de extinción del ácido trans-cinámico a una longitud de onda de 290 nm. Los resultados son el promedio de al menos 5 determinaciones realizadas para cada tratamiento

y cada muestra se obtuvo de una caja de siembra que contenía 50 semillas sembradas.

2.2.9.2 NAD⁺ - Gliceraldehido -3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

La actividad de la G3PDH se determinó a través de la cuantificación del β -NADH - a 340 nm - formado a partir de β -NAD⁺, de acuerdo al método de Allison (Allison, 1966), usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02. El medio de ensayo se realizó en un volumen final de 2,5 ml y contenía amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 8,50, β -mercaptoetanol 3,5 mM, Fluoruro de sodio 20 mM, β -NAD⁺ 5 mM, arseniato de sodio 17 mM pH 8,50, 0,3 μ moles de gliceraldehido-3-fosfato y 0,1 mL de extracto enzimático. La actividad de la enzima se expresó en pkat/mg de proteínas totales en el ensayo enzimático. Los resultados son el promedio de al menos 5 determinaciones realizadas para cada tratamiento y cada muestra se obtuvo de una caja de siembra que contenía 50 semillas sembradas.

2.2.9.3 Adenosín trifosfatasa (ATPasa).

La actividad de la ATPasa se determinó cuantificando el fosfato inorgánico liberado a partir de ATP, por el método de Fiske-Subbarow (1925), a 620 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02. El medio de ensayo consistió 700 μ l de amortiguador Tris-MES 10 mM y $MgCl_2$ 5 mM pH 6,00, 200 μ l de ATP 10 mM y 100 μ l de extracto enzimático. La actividad de la enzima se expresó en μ kat/miligramos de proteínas totales en el ensayo enzimático. Los resultados son el promedio de al menos 5 determinaciones realizadas para cada tratamiento y cada muestra se obtuvo de una caja de siembra que contenía 50 semillas sembradas.

2.2.10 Determinación de fluorescencia.

Los parámetros de fluorescencia se determinaron en hojas de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55, por medio del instrumento Plant Efficiency Analyser (PEA), de Hansatech. Las determinaciones se realizaron a 20° C, con un 75 % de intensidad de luz, equivalente a 2.250 $\mu E/m^2s$ y durante un tiempo de 40 segundos. Los resultados corresponden al promedio de las determinaciones realizadas por cada tratamiento en al menos 5 plántulas; y en cada plántulas realizando

mediciones en tres hojas. La emisión de fluorescencia se analizada por PEA y entregada en unidades relativas de fluorescencia.

2.2.11 Determinación de asimilación de CO₂.

Las plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55 se colocaron en una cámara herméticamente sellada, a la que se hizo pasar aire externo (atmosférico), cuya concentración de CO₂ se determinó para cada experimento, usando un flujo de 3,33 cm³ s⁻¹. La diferencia de CO₂ producida entre las cámaras analizadora y de referencia se determinó por medio de un Analizador de Gases Infrarrojo (Infra Red Gas Analyser, IRGA, serie 225; The Analytical Development Co. Ltda.). Los análisis se realizaron a 20° C, a un 76-80% de humedad y con una intensidad de luz de 1500 μE/m²s.

El calculo de la asimilación de CO₂ se determinó en base a los siguientes parametros: δ CO₂, lectura diferencial proporcionada por el IRGA en ppm; A, área foliar en dm²; J_A, flujo de aire que pasa por la cámara expresado en litros/hora; J CO₂, volumen de CO₂ acumulado por la hoja en

una hora ($J \text{ CO}_2 = J_A \times \delta \text{ CO}_2$); $I(\text{dc})$, masa de CO_2 acumulada por la hoja en una hora, ($I(\text{dc}) = J \text{ CO}_2 \times \tau$), siendo τ equivalente a 2 g/l. El consumo de CO_2 expresado en mg de CO_2 asimilado por dm^2 en hoja en una hora, es igual a $[I(\text{dc}) \times 1000] / A$. Se realizaron determinaciones en al menos 3 cajas de siembra que contenían 50 semillas sembradas cada una de ellas, 3 veces para cada caja.

2.2.12 Microscopia Electrónica de Transmisión.

Se obtuvieron cortes de hojas de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL, California 55 usando hojas de filo simple y se cortaron en trocitos de 0,2 x 0,2 mm; se fijaron en glutaraldehído al 2 % v/v preparado en amortiguador cacodilato 0,2 M pH 7,4 durante 48 horas; y se postfijaron en OsO_4 al 1 % p/v durante 2 horas. Las muestras se incluyeron en Epon 812 después de deshidratar en series de acetona de concentración creciente. Se obtuvieron cortes finos para observación al Microscopio Electrónico (Siemens, modelo 102). Los cortes finos se recogieron sobre grillas de cobre de malla 200 y se tiñeron directamente con acetato de uranilo al 4% en metanol y después con citrato de plomo al 2%.

2.2.13 Determinación de Arsénico por Espectroscopía de Absorción Atómica.

2.2.13.1 Preparación de muestras vegetales.

Los tejidos y las plántulas de alfalfa cinco, diez y quince días post-germinación, de las variedades en estudio, se secaron sobre papel filtro, hasta peso constante en estufa Memert con aireación a 60° C. Los tejidos y las plántulas secas, de las diferentes variedades y tratamientos arsenicales, fueron pesadas en balanza analítica Sartorius, y luego se colocaron en tubos de cuarzo donde fueron digeridas en 3 ml de HCl concentrado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 3 ml de agua destilada, dejándose reaccionar por 30 minutos y posteriormente se calentaron a 115° C durante 14 minutos en un calefactor-digestor programable Biebisch.

2.2.13.2 Determinación de arsénico.

La determinación de arsénico se realizó a través de Espectroscopía de Absorción Atómica, mediante la técnica de generación de hidruros. La cuantificación se realizó a 193.7 nm. en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer, modelo 4000. Los resultados

son el promedio de al menos 3 determinaciones realizadas para cada tratamiento y cada muestra, obtenida de una caja de siembra que contenía 50 semillas sembradas. El análisis para cada muestra se realizó en duplicado.

2.2.14 Tratamiento estadístico de los datos.

Los datos que se muestran en los resultados son el promedio de todas las determinaciones y/o ensayos realizadas para experimento. Las barras de error de los graficos corresponden a los valores de desviación estándar. El estadístico *t*-Student se utilizó para determinar significancia de las variaciones experimentales observadas en los diferentes tratamientos con las especies arsenicales.

3 RESULTADOS

3.1 Germinación y Desarrollo.

Se estudió el efecto de arsenito y de arseniato en la germinación de semillas y en el desarrollo del crecimiento de las plántulas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) de las variedades Lluta (cultivada en suelos con alto contenido de arsénico), WLSL (producida para ser cultivada en diferentes condiciones de estrés) y California 55 (cultivada en la zona central de Chile).

3.1.1 Germinación.

Se sembraron las semillas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55 (sección 2.2.3), que mostraban un 100% de viabilidad aparente, previamente determinada mediante la prueba de flotación (sección 2.2.2.1), por lo que todas las semillas sembradas tenían la capacidad potencial de germinar y desarrollar una plántula entera.

La germinación de las semillas de alfalfa de las variedades Lluta y WLSL se produjo entre las 36 y 48 horas posterior a la siembra, mientras que las semillas de la variedad California 55 requirieron entre 60 y 72 horas para que se produjera su germinación, bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad e iluminación (sección 2.2.5.1).

El porcentaje de germinación de las semillas controles (sección 2.2.5.3) en las variedades Lluta y WLSL fue de un 100 % determinado a las 48 horas post-siembra, mientras que en la variedad California 55, éste alcanzó a un 58,7 % determinado a las 72 horas post-siembra, aún cuando la viabilidad aparente de las semillas era de un 100% (Figura 1).

Los tiempos requeridos para que se produjera la germinación de las semillas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55, y los porcentajes de germinación en cada variedad tratada con diferentes concentraciones de arsenito o de arseniato, no mostraron diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en las semillas controles (Figura 1).

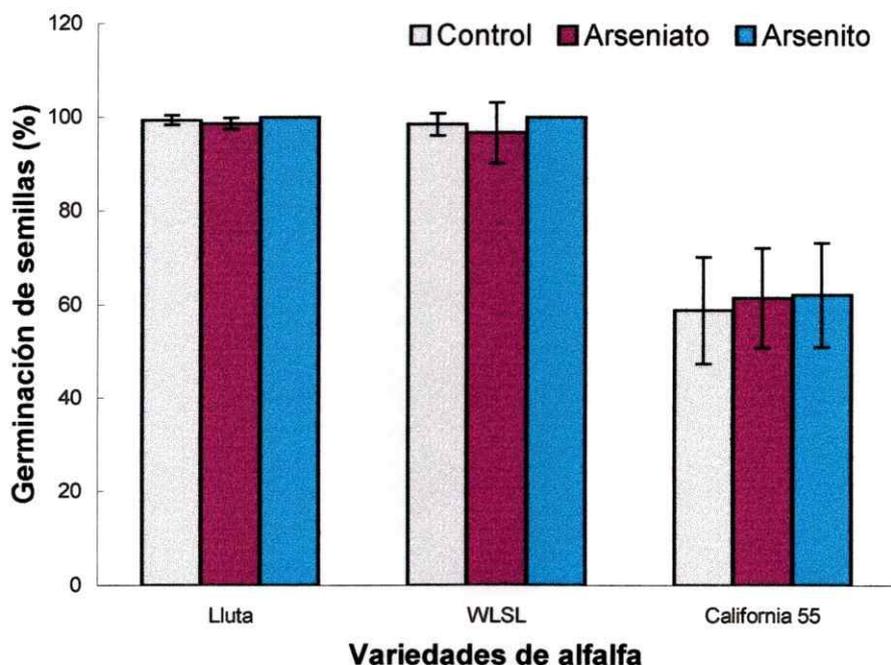


Figura 1. Germinación de semillas de alfalfa. El porcentaje de semillas germinadas se determinó a las 48 horas (var. Lluta y WLSL) y a las 72 horas (var. California 55). Las semillas tratadas se regaron con 2 ppm de arseniato o arsenito en solución Hoagland. Los porcentajes de germinación graficados son el promedio de las determinaciones realizadas en 5 cajas de cultivo con 50 semillas sembradas cada una. La barra de error (BE) es la desviación estándar (SD) de los porcentajes de germinación determinados para cada variedad

3.1.2 Desarrollo y crecimiento de plántulas de alfalfa.

3.1.2.1 Desarrollo y crecimiento radicular.

3.1.2.1.1 Efecto de arsenito.

La adición de arsenito a las semillas germinadas de las variedades Lluta y WLSL de alfalfa, en todo el rango de concentraciones usado no afectó el crecimiento radicular en los primeros diez días post-germinación, en relación a los controles respectivos (Figuras 2a, 2b). La longitud de las radículas fluctuaron entre 0,9 y 1,4 cm al quinto día y entre 1,2 y 1,8 cm al décimo día post-germinación, en plántulas de la variedad Lluta. En las plántulas de la variedad WLSL el desarrollo y crecimiento radicular fue mayor, fluctuando la longitud de la radícula en plántulas sometidas a los diferentes tratamientos, incluyendo al control, entre 1,4 y 1,6 cm al quinto día y entre 1,6 y 2 cm al décimo día post-germinación. El análisis de las variaciones observadas, en las medidas de longitud de las radículas de las variedades de alfalfa Lluta y WLSL, en los diferentes tratamientos con arsenito, tanto a nivel intra como intervariedades no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

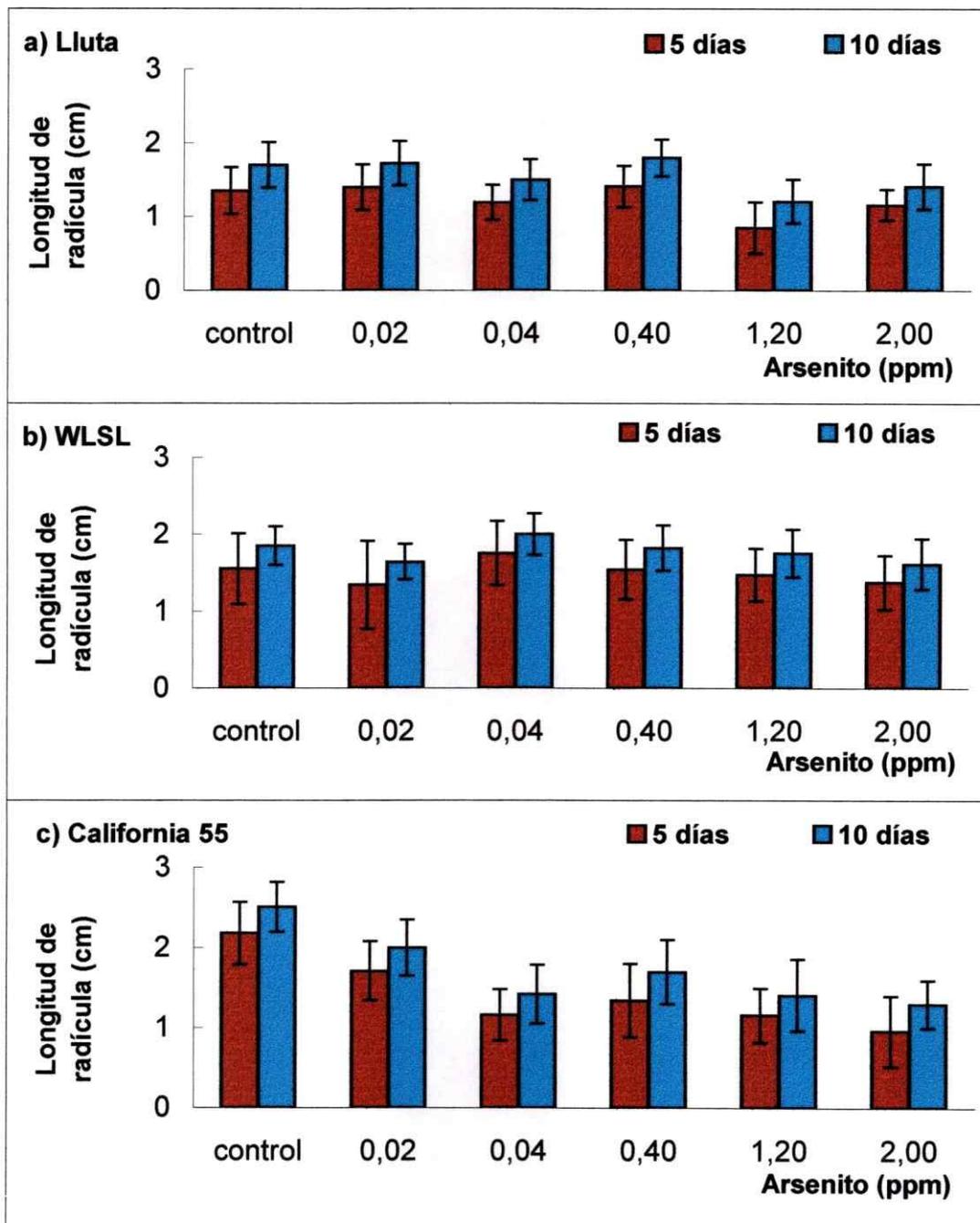


Figura 2. Efecto de arsenito sobre el desarrollo radicular de plántulas de alfalfa. Las longitudes de radícula de las plántulas controles y tratadas, de las tres variedades de alfalfa, se midieron a los 5 y 10 días de tratamiento. Las BE son SD de las mediciones realizadas en 3 cajas de cultivo con 50 plántulas cada una, para cada variedad y tratamiento.

A diferencia del comportamiento de las variedades Lluta y WLSL de alfalfa, se observó que el crecimiento radicular en las plántulas de la variedad California 55, era menor para todas las concentraciones crecientes de arsenito (Figura 2c). La disminución del crecimiento radicular fue observada a partir del quinto día post-germinación. Al realizar el análisis estadístico de los datos, se pudo establecer que existían diferencias significativas entre las plántulas controles y los tratamientos; sin embargo, entre los tratamientos con distintas concentraciones de esta especie arsenical, las diferencias en longitud de radícula no fueron estadísticamente significativas para los dos tiempos analizados (Figura 2c).

3.1.2.1.2 Efecto de arseniato.

La adición de concentraciones crecientes de arseniato, en las soluciones de riego de las plántulas de alfalfa, produjo diferentes respuestas en relación al desarrollo y crecimiento radicular dependiendo de la variedad de alfalfa en estudio.

El crecimiento radicular en las plántulas de alfalfa de la variedad Lluta, mostró que concentraciones menores de 1,2 ppm de arseniato, no afectaron el desarrollo de las radículas de las plántulas tratadas, mientras que concentraciones iguales y superiores a 1,2 ppm de arseniato inhibieron el desarrollo de las radículas (Figura 3a).

En la variedad WLSL, se observó que la elongación radicular, a los tiempos de post-germinación analizados, no presentó una variación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), para concentraciones de arseniato igual o menores a 0,04 ppm en las soluciones de riego. Al incrementar la concentración de arseniato sobre 0,4 ppm se observó una inhibición del desarrollo radicular, el que resultó ser dependiente de la concentración de arseniato (Figura 3b). Al quinto día de tratamiento, la inhibición del desarrollo radicular para concentraciones de arseniato entre 0,4 y 2 ppm fue directamente proporcional a la concentración de esta especie arsenical ($R^2 = 1,0000$); al décimo día también se observó el mismo comportamiento, aunque la inhibición resultó ser 2,5 veces mayor entre 1,2 y 2 ppm de arseniato.

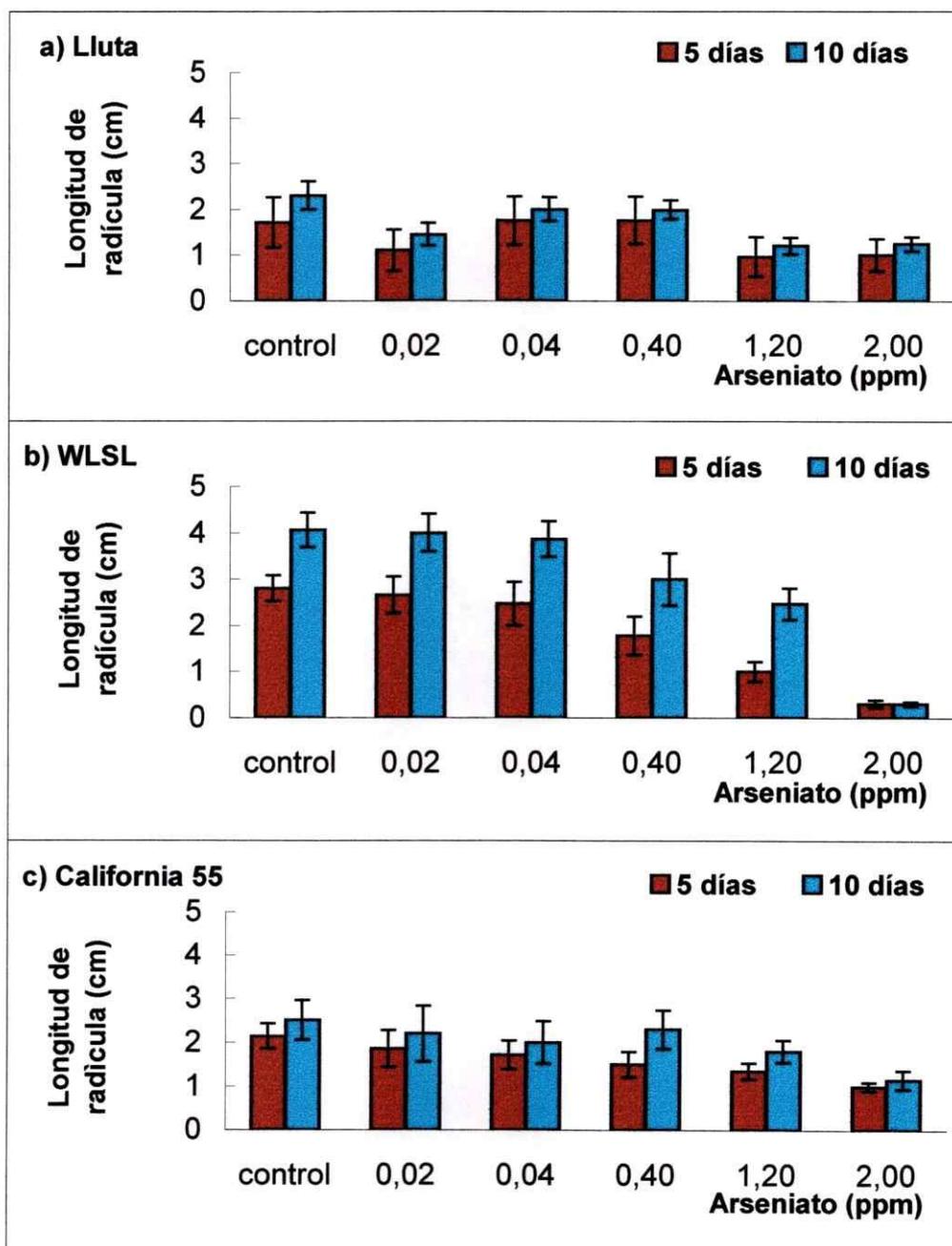


Figura 3. Efecto de arseniato sobre el desarrollo radicular en plántulas de alfalfa. Las longitudes de radícula de las plántulas de alfalfa, controles y tratadas de las tres variedades, se midieron a los 5 y 10 días de tratamiento. Las BE son SD de las mediciones realizadas en tres cajas que contenían 50 plántulas cada una.

En las plántulas de alfalfa de la variedad California 55, se observó una inhibición gradual del crecimiento radicular con concentraciones crecientes de arseniato. En plántulas tratadas con concentraciones de 2 ppm, la inhibición fue de un 50 % y de un 45 % al quinto y décimo día de tratamiento, respectivamente (Figura 3c).

3.1.2.2 Desarrollo y crecimiento de hipocotilo.

3.1.2.2.1 Efecto de arsenito.

La adición de concentraciones crecientes de arsenito desde 0,02 ppm a 2 ppm a las plántulas de alfalfa no afectó el crecimiento y desarrollo de los hipocotilos en ninguna de las tres variedades de alfalfa estudiadas al comparar con sus respectivos controles en los primeros diez días post germinación (Figuras 4a, 4b y 4c).

Además, se pudo determinar que las diferencias intervariedades observadas para los valores de longitud de hipocotilo a los diferentes tiempos y tratamientos con arsenito, resultaron no ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

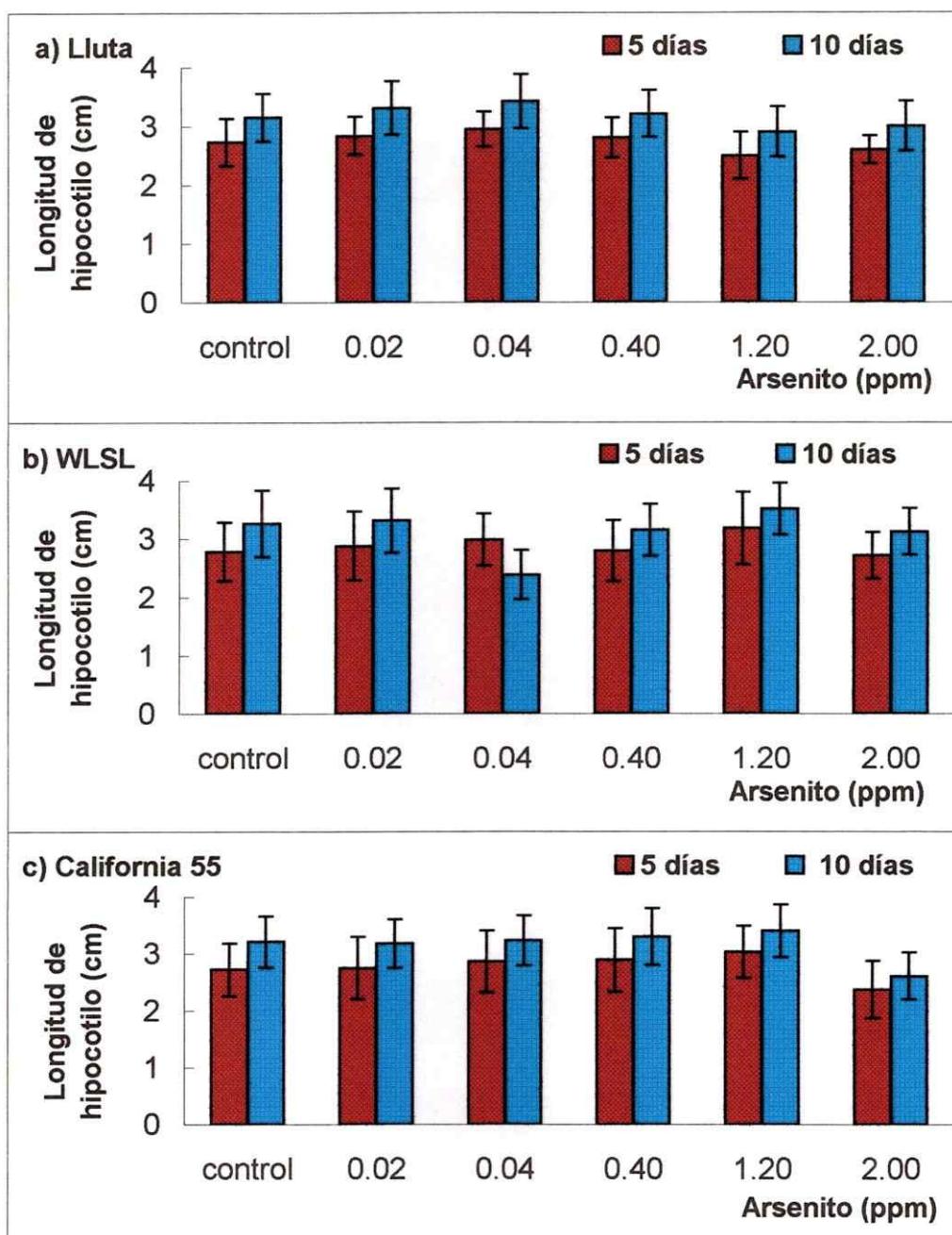


Figura 4. Efecto de arsenito sobre el desarrollo de hipocotilo de plántulas de alfalfa. Las longitudes de hipocotilo de las plántulas controles y tratadas, de las tres variedades de alfalfa, se midieron a los 5 y 10 días de tratamiento. Las BE son SD de las mediciones realizadas en 3 cajas de cultivo con 50 plántulas cada una, para cada variedad y tratamiento.

3.1.2.2.2 Efecto de arseniato.

El desarrollo del hipocotilo en plántulas de la variedad Lluta de alfalfa, no fue afectado por el tratamiento con arseniato, en todo el rango de concentraciones estudiadas. El crecimiento de los hipocotilos de las plántulas tratadas fue equivalente al crecimiento de los hipocotilos de las plántulas controles, determinándose que las variaciones observadas en sus crecimientos no eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 5a).

El arseniato produjo una disminución del crecimiento del hipocotilo en plántulas de alfalfa variedad WLSL cuando la concentración de arseniato fue igual o mayor que 0,4 ppm. La disminución de longitud observada al quinto día post-germinación resultó ser dependiente en forma lineal de la concentración de arseniato aplicada a las plántulas ($R^2 = 0,9979$). Al décimo día de tratamiento también se observó el mismo efecto inhibitorio. Tratamientos con concentraciones menores a 0,4 ppm de arseniato no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de los hipocotilos en plántulas de esta variedad ($p < 0,05$) (Figura 5b).

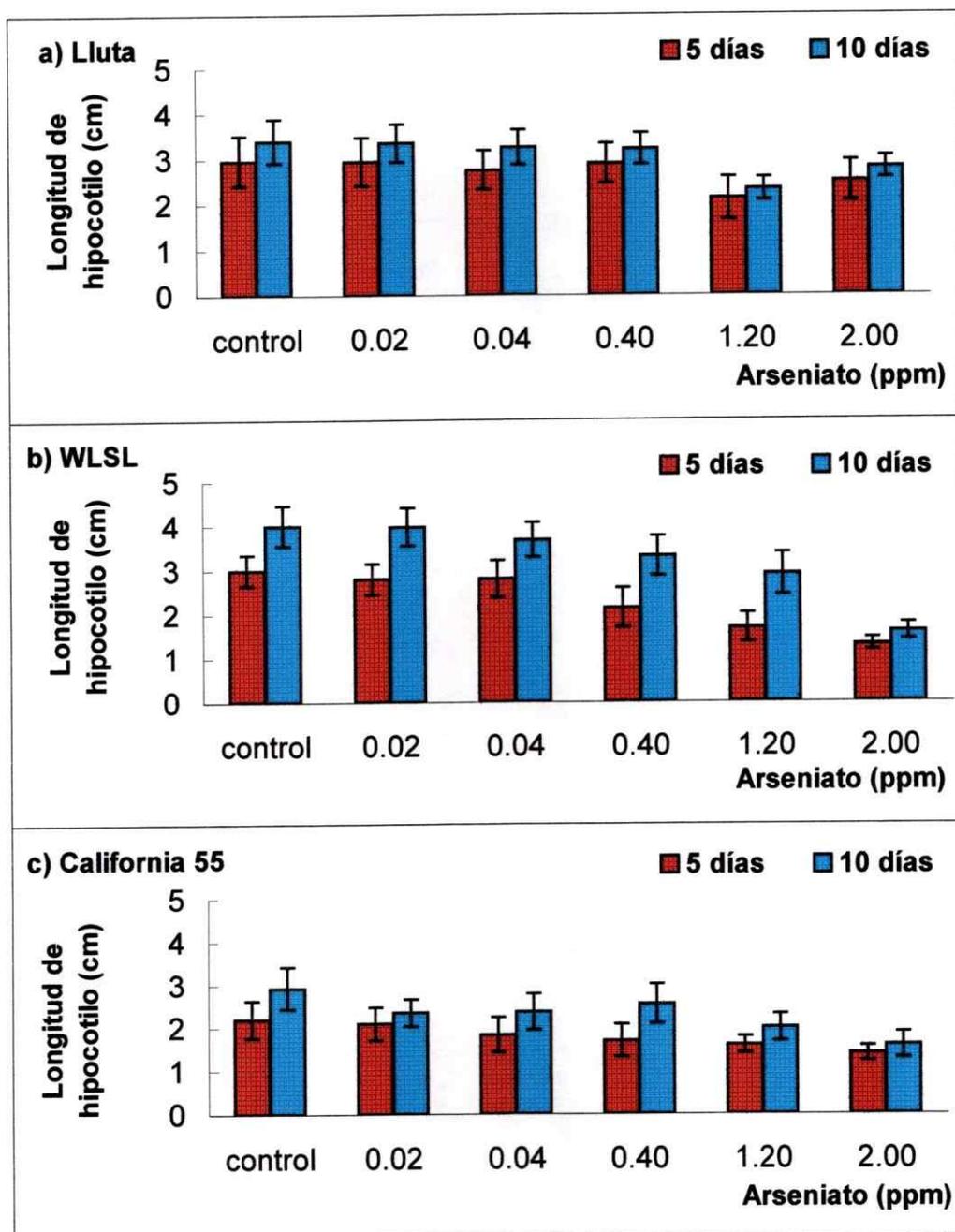


Figura 5. Efecto de arseniato sobre el desarrollo de hipocotilo de plántulas de alfalfa. Las longitudes de hipocotilo de las plántulas controles y tratadas, de las tres variedades de alfalfa, se midieron a los 5 y 10 días de tratamiento. Las BE son SD de las mediciones realizadas en 3 cajas de cultivo con 50 plántulas cada una, para cada variedad y tratamiento.

El crecimiento del hipocotilo en plántulas de alfalfa de la variedad California 55 (Figura 5c) fue menor que el de los controles al quinto día de tratamiento con las diferentes concentraciones de arseniato. Al décimo día, el efecto inhibitorio se observó, principalmente, en el rango de concentraciones entre 0,4 ppm y 2 ppm de arseniato (Figura 5c), inhibición que resultó ser dependiente de la concentración de la especie arsenical ($R^2=0,9918$).

3.2 Índice de Tolerancia Media.

El valor de índice de tolerancia media (ITM) se determinó al realizar el cociente entre el valor medio de la longitud de la radícula o hipocotilo de plántulas tratadas y el valor encontrado para estos mismos tejidos en plántulas controles. El ITM para los hipocotilos de las tres variedades de alfalfa tratados con diferentes concentraciones de arsenito fluctuaron entre 81% y 103,7%, indicando que todas ellas presentan una alta tolerancia a arsenito en sus hipocotilos. Sin embargo, al analizar el ITM para las radículas en los mismos tratamiento se encontró que el ITM para la variedad California 55 estaba entre 45,4% y 56% en el rango de

concentraciones de 0,04 - 2 ppm de arsenito. Las variedades de alfalfa Lluta y WLSL mostraron valores de ITM de los tratamientos semejantes a los controles (Figura 6).

Los valores de ITM obtenidos del análisis realizado con respecto a los tratamientos con arseniato, mostraron valores que fluctuaban entre 82,3% y 97% para hipocotilos de la variedad Lluta (Figura 7a y 7b). Los valores de ITM para los hipocotilos de las variedades WLSL y California 55, fluctuaron entre 45,1% y 97%, y entre 55,1% y 87,5%, respectivamente (Figuras 7a y 7b), dependiendo de las concentraciones de arseniato de los tratamientos.

Los valores de ITM obtenidos para las radículas en función de las diferentes concentraciones de arseniato fluctuaron entre 52,1% y 105,8% para la variedad Lluta; entre 50% y 95% para la variedad California 55, y entre 13,5% y 89,6% para la variedad WLSL. 55 (Figuras 7c y 7d).

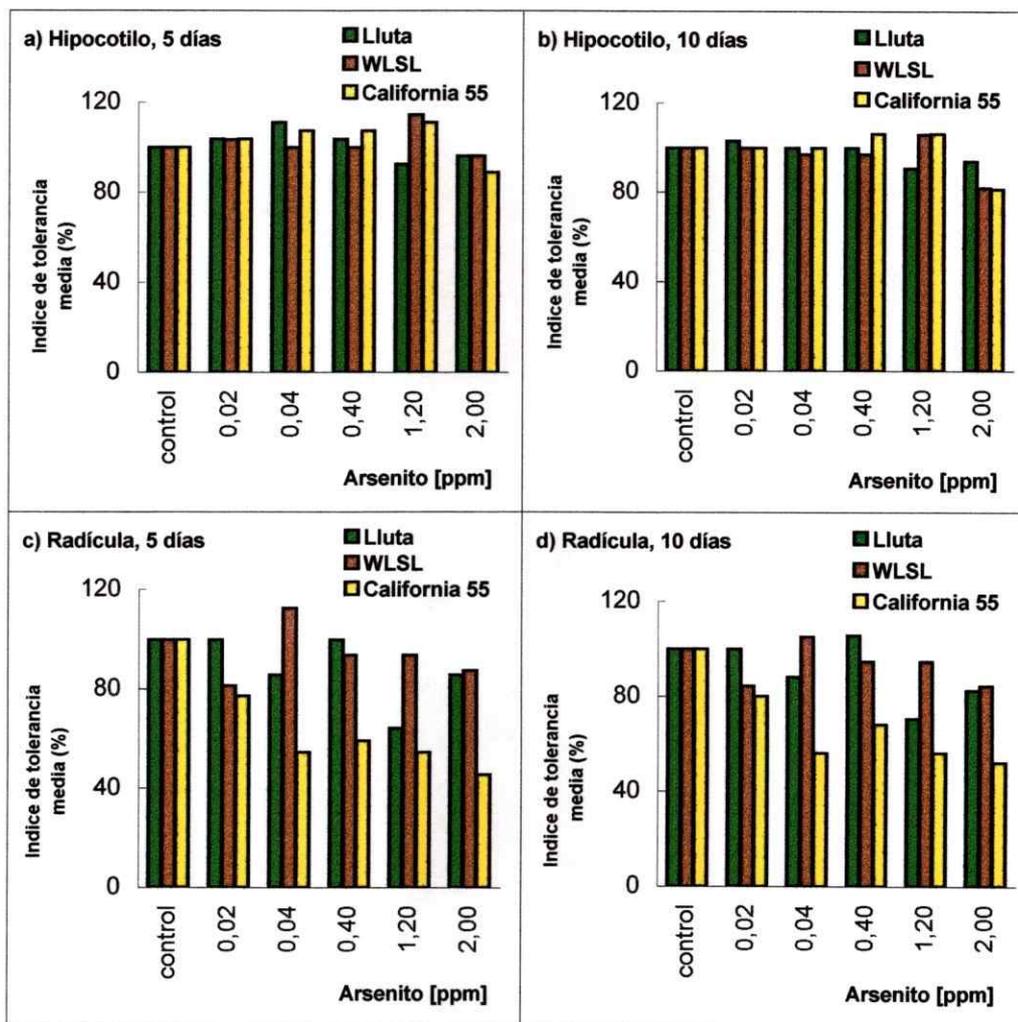


Figura 6. Índice de tolerancia media (ITM) de plántulas de alfalfa tratadas con arsenito. Los ITM se calcularon para las tres variedades de plántulas de alfalfa, respecto al desarrollo del hipocotilo (Fig. 6a y 6b) y al desarrollo de la radícula (Fig. 6c y 6d) a los 5 y 10 días.

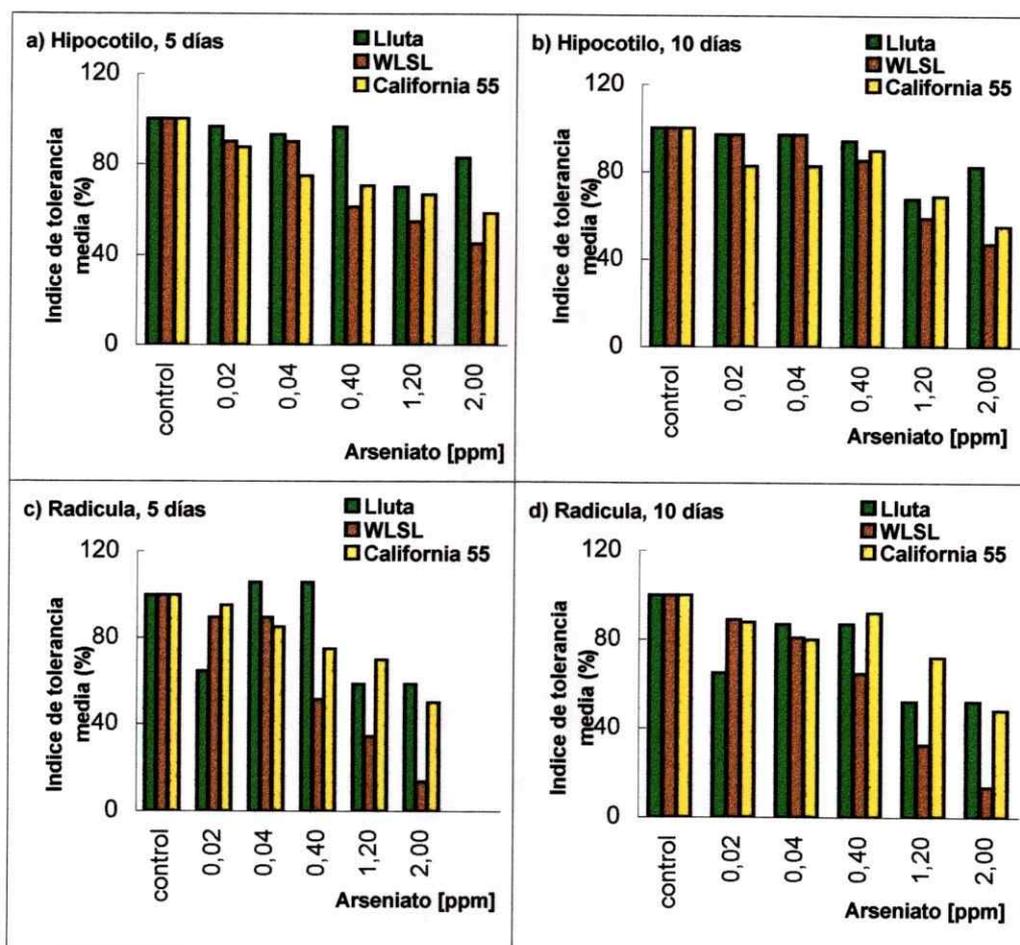


Figura 7. Índice de tolerancia media (ITM) de plántulas de alfalfa tratadas con arseniato. Los ITM se calcularon para las tres variedades de plántulas de alfalfa, respecto al desarrollo de hipocotilo (Fig 7a y 7b) y al desarrollo de la radícula (Fig 7c y 7d) a los 5 y 10 días de tratamiento.

3.3 Biomasa.

La biomasa determinada (sección 2.3.6) en plántulas de alfalfa controles fue diferente para cada variedad: la mayor se obtuvo para la variedad WLSL, y la menor para la variedad Lluta (Tabla 1). El tratamiento con 2 ppm de arsenito produjo una disminución de la biomasa entre 27 y 29% para las tres variedades de alfalfa. El tratamiento con 2 ppm de arseniato produjo una disminución de la biomasa de un 26% solo en la variedad California 55.

3.4 Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa y distribución en los tejidos.

La cuantificación de arsénico en plántulas de alfalfa permitió establecer la cantidad de arsénico acumulada en las tres variedades de alfalfa, así como también su distribución en las raíces, tallos y hojas de la plántula posterior a los tratamientos con diferentes concentraciones, tanto de arsenito como de arseniato.

Tabla 1. Efecto de arsenito y arseniato en la biomasa de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55¹.

	Lluta	WLSL	California 55
	Peso seco (mg) ± SD		
Control	36,98 ± 1,95	48,29 ± 2,12	41,95 ± 2,14
Arsenito (2 ppm)	26,48 ± 1,55	34,47 ± 1,89	30,50 ± 1,56
Arseniató (2 ppm)	36,27 ± 2,05	48,24 ± 2,13	31,23 ± 1,28

¹ Los análisis se realizaron en plántulas tratadas durante de 15 días, una vez germinadas. Las determinaciones se realizaron en triplicado y cada muestra constaba de 50 plántulas.

3.4.1 Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55.

En las muestras de plántulas controles de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55, no se detectó arsénico al realizar los análisis a través de Espectrofotometría de Absorción Atómica, AAS (sección 2.2.13.2). Sin embargo, independientemente de la especie arsenical usada en el tratamiento o de su concentración, en todas las muestras de plántulas de alfalfa tratadas se determinó presencia de arsénico en los tejidos analizados.

Las cantidades de arsénico determinadas en las plántulas de la variedad Lluta resultaron ser dependientes de la concentración de arsenito aplicada a la solución de riego. El arsénico determinado 10 días post tratamiento fluctuó entre 0,25 y 0,5 μg de arsénico por gramo de peso seco de tejido y alcanzó valores máximos de 0,65 μg de arsénico por gramo de peso seco de tejido vegetal al día 15 correspondiente a plántulas tratadas con 2 ppm de arsenito (Figura 8a).

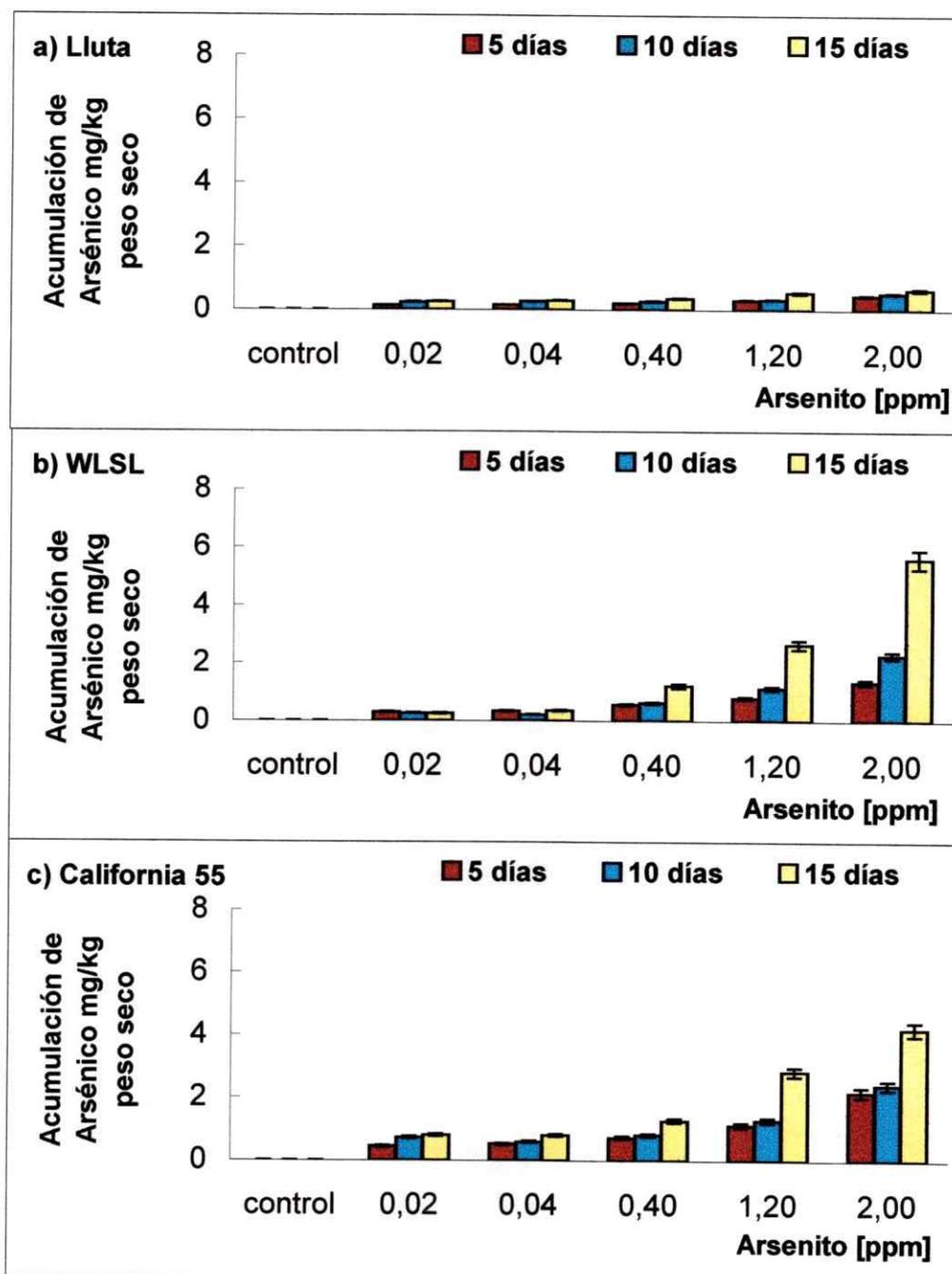


Figura 8. Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arsenito. El arsénico se determinó por AAS, en muestras de plántulas enteras controles y tratadas de las tres variedades de alfalfa, a los 5, 10 y 15 días de tratamiento. Las BE son las SD de los análisis de tres muestras de 50 plántulas, para cada variedad y tratamiento, determinadas en duplicado.

A su vez, en las plántulas de alfalfa de las variedades WLSL y California 55 tratadas con arsenito se determinaron cantidades de arsénico de 10 veces superior a la que se encontró en la variedad Lluta. En las variedades WLSL y California 55 el contenido de arsénico detectado en el material vegetal se incrementó en función de la concentración de la especie arsenical y del tiempo de tratamiento. La cantidad de arsénico, en ambas variedades, alcanzaron niveles equivalentes y no presentaron diferencias significativas después de cinco días de cada tratamiento (Figuras 8b y 8c). Las cantidades de arsénico determinadas a los diez días de tratamientos con arsenito en estas mismas dos variedades alcanzaron valores de hasta 2,4 μg de arsénico por gramo de peso seco de tejido, las que fueron hasta un 25% superiores a las determinadas al quinto día de tratamiento. Los valores absolutos dependieron de la concentración de arsenito aplicada. Al prolongar el tratamiento arsenical durante otros cinco días, se encontró que las cantidades de arsénico determinadas en estas variedades de alfalfa eran al menos un 50% superiores a las determinadas en el día 10, y se alcanzaban valores de hasta 5,6 μg de arsénico por gramo de peso seco de material vegetal.

El tratamiento con arseniato, a diferencia de lo observado con arsenito, no modificó el contenido total de arsénico en plántulas de alfalfa de la variedad Lluta. Se alcanzó un valor constante de 0,5 μg de arsénico por gramo de peso seco para las plántulas tratadas con diferentes oncentraciones de arseniato, valor que es de aproximadamente un 10% del encontrado en las variedades WLSL y California 55 (Figura 9a).

Las plántulas de las variedades WLSL y California 55 mostraron un comportamiento semejante entre ellas al ser tratadas con arseniato (Figuras 9b y 9c), y también semejante al que se había observado en respuesta a arsenito (Figuras 8b y 8c). La cantidad de arsénico detectada en las plántulas enteras dependía en forma lineal de la concentración de arseniato de los tratamientos para cada tiempo analizado. Los niveles máximos de arsénico de 6,5 y 7,1 μg de arsénico por gramo de peso seco observados para tratamientos con 2 ppm de arseniato en las variedades WLSL y California 55, respectivamente, no muestran diferencias significativamente entre sí y difieren significativamente de las encontradas en la variedad Lluta.

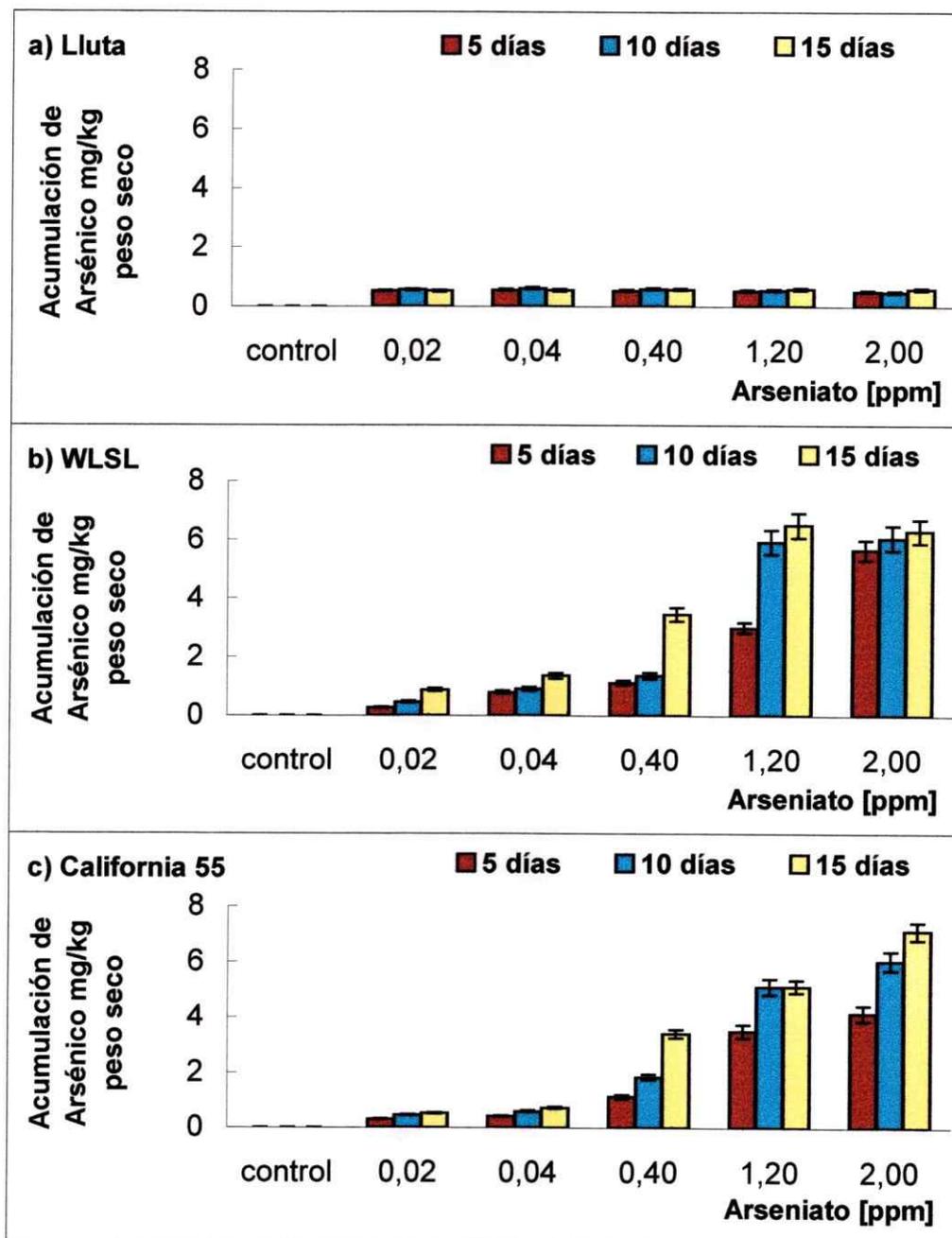


Figura 9. Acumulación de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arseniato. El arsénico se determinó por AAS, en muestras de plántulas enteras controles y tratadas de las tres variedades de alfalfa, a los 5, 10 y 15 días de tratamiento. Las BE son las SD de los análisis de tres muestras de 50 plántulas, para cada variedad y tratamiento, determinadas en duplicado.

3.4.2 Distribución de arsénico en tejidos de plántulas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55.

La distribución de arsénico en los tejidos de las plántulas de alfalfa tratadas con arsenito mostró un patrón semejante para las tres variedades de alfalfa estudiadas. El 46% del arsenito se acumuló en los tallos o pie de las plántulas, un 30% se acumuló en las raíces y el 24% restante, en las hojas (Tabla 2).

Las plántulas de alfalfa de las variedades estudiadas mostraron una acumulación de arsénico después del tratamiento con 2 ppm de arseniato semejante entre ellas: el 65% se acumuló en la radículas, el 20% en los tallos y el 15% restante, se acumuló en las hojas (Tabla 3). Este patrón de acumulación fué diferente al observado después del tratamiento con arsenito (Tabla 2).

3.5 Asimilación de CO₂ en Plántulas de Alfalfa.

La asimilación de CO₂ en plántulas de alfalfa, determinada por medio del instrumento Infra Red Gas Analyser, IRGA (sección 2.2.11), mostró que las plántulas de alfalfa controles de las tres variedades estudiadas

Tabla 2. Distribución de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arsenito¹.

	Lluta	WLSL	California 55
		% ± SD	
Radícula	28±2	32±3	30±2
Tallo	45±2	46±2	47±3
Hojas	27±1	22±1	23±1

¹ La determinación de arsénico se realizó en duplicado, a los 15 días de tratamiento con 2 ppm de arsenito en tres muestras de tejidos obtenidas de 50 plántulas cada una.

Tabla 3. Distribución de arsénico en plántulas de alfalfa tratadas con arseniato¹.

	Lluta	WLSL	California 55
		% ± SD	
Raíz	65±3	65±2	64±3
Tallo	18±1	20±1	26±2
Hojas	17±2	14±1	13±1

¹ La determinación de arsénico se realizó en duplicado, a los 15 días de tratamiento con 2 ppm de arseniato en tres muestras de tejidos obtenidas de 50 plántulas cada una.

fijaban entre 17,75 y 18,68 mg de CO₂ /dm²/hora, sin que existieran diferencias significativas entre ellas (Tabla 4).

La asimilación de dióxido de carbono, en plántulas crecidas en presencia de 2 ppm de arsenito fueron un 38%, un 43% y un 46% inferiores en las variedades Lluta, California 55 y WLSL, respectivamente, con respecto a los valores determinados en plántulas controles (Tabla 4).

El arseniato disminuyó la asimilación de CO₂ en un 18% en las plántulas de las variedades Lluta y California 55, respecto a los valores de fijación de CO₂ detectados en plántulas controles de las mismas variedades (Tabla 4) y la variedad WLSL, no modificó su fijación de CO₂ después del tratamiento con 2 ppm de arseniato.

3.6 Análisis de Fluorescencia en Plántulas de Alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55.

La cuantificación de la fluorescencia de la clorofila en tejidos vegetales puede servir como un marcador de su funcionamiento

Tabla 4. Asimilación de CO₂ en plántulas de alfalfa¹.

	Lluta	WLSL mg/dm ² /hr ± SD	California 55
Control	18,63 ± 0,20	18,68 ± 0,15	17,75 ± 0,22
Arsenito (2 ppm)	11,60 ± 0,22	10,25 ± 0,27	10,25 ± 0,25
Arseniato (2 ppm)	15,45 ± 0,45	18,70 ± 0,27	14,46 ± 0,23

¹ Las determinaciones se realizaron en triplicado de tres cajas de cultivo de 50 plántulas cada una.

fotosintético. Los parámetros medidos correspondieron a F_0 (fluorescencia basal), F_v (fluorescencia variable), F_m (fluorescencia máxima). Adicionalmente se analizó el cociente F_v/F_m que representa la eficiencia del fotosistema II.

3.6.1 Determinación del parámetro F_0 .

Los niveles basales de fluorescencia en las plántulas controles de alfalfa de la variedad WLSL fueron mayores que los detectados en las variedades Lluta y California 55 (Figura 10). El efecto de arseniato y de arsenito en una concentración de 2 ppm, sobre los niveles de fluorescencia basal en las plántulas de las variedades Lluta, WLSL y California 55 de alfalfa fue diferente para cada variedad y dependió de la especie arsenical. El arseniato indujo un aumento de los niveles basales de fluorescencia de un 47 %, de un 35 % y de un 31 % en las variedades Lluta, California 55 y WLSL, respectivamente. El arsenito indujo la fluorescencia basal en un 24%, en un 98 % y de un 190% en las variedades Lluta, WLSL y California 55 respectivamente, con respecto al control (Figura 10).

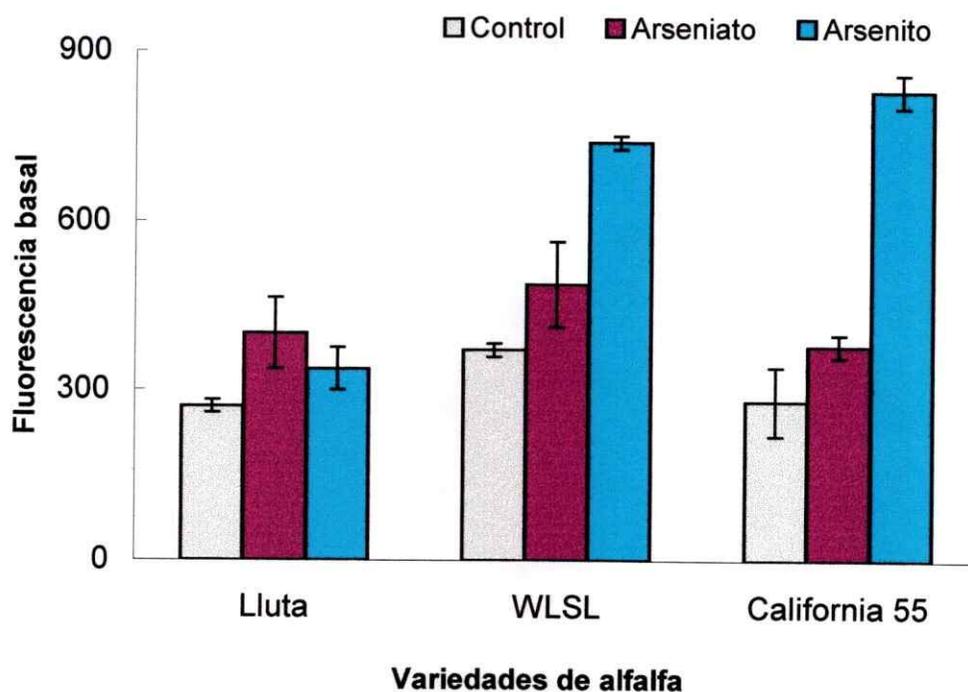


Figura 10. Efecto de arsénico sobre los niveles de fluorescencia basal en plántulas de alfalfa. La fluorescencia basal fue determinada por medio de PEA. Las BE son las SD de las determinaciones realizadas en la primera y segunda hoja de 5 plántulas controles y tratadas con 2 ppm de arsenito o arseniato durante 15 días.

3.6.2 Determinación de la eficiencia del fotosistema II: F_v/F_m .

Los valores de la eficiencia del fotosistema II determinada en las plántulas controles de las tres variedades de alfalfa en estudio, fueron muy similares entre ellas. Los valores de eficiencia del fotosistema II determinadas en plántulas tratadas con arsenito y arseniato, resultaron ser diferentes entre las variedad de alfalfa y dependieron de la especie arsenical suministrada en el tratamiento.

El arseniato, usado en concentraciones de 2 ppm, no modificó la eficiencia del fotosistema II en ninguna de la variedades de alfalfa. A su vez, el arsenito tampoco afectó esta eficiencia en la variedad Lluta; sin embargo, disminuyó en un 38 % y en un 42% la eficiencia del fotosistema II en la variedades California 55 y WLSL, respectivamente (Figura 11).

3.6.3 Determinación del parámetro F_v .

El tratamiento con 2 ppm de arseniato aumentó el valor de fluorescencia variable en las variedades de alfalfa estudiadas(Figura 12). El efecto del tratamiento con 2 ppm de arsenito disminuyó el valor de F_v , en un

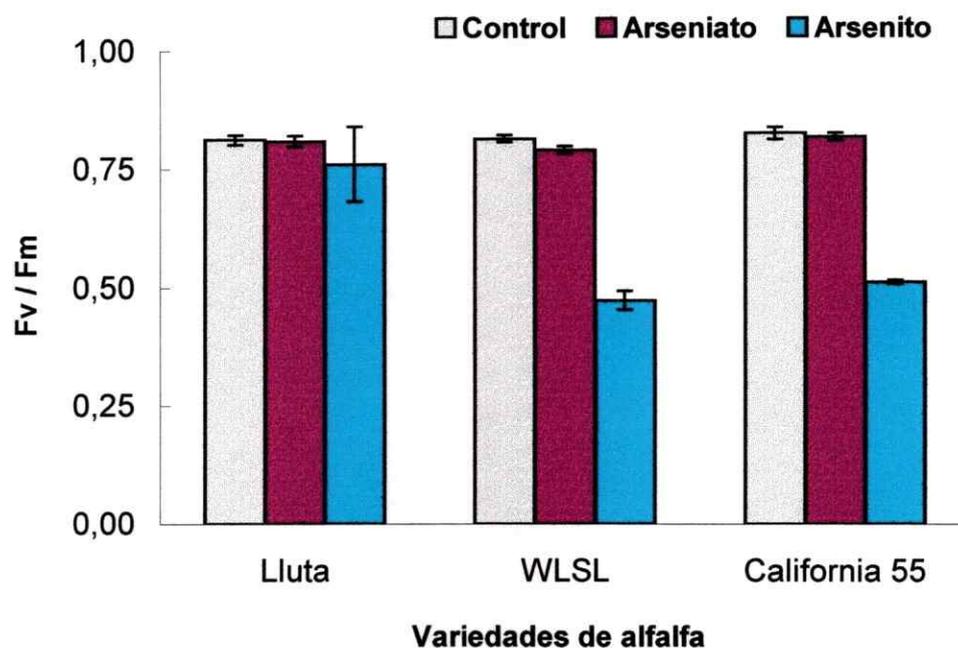


Figura 11. Efecto de arsénico sobre la eficiencia fotosintética en plántulas de alfalfa. La eficiencia fotosintética se calculó en base a los parámetros de fluorescencia variable y fluorescencia máxima determinados por PEA. Las BE son las SD de los parámetros de fluorescencia determinados en la primera y segunda hoja de 5 plántulas controles y tratadas con 2 ppm de arsenito o arseniato durante 15 días.

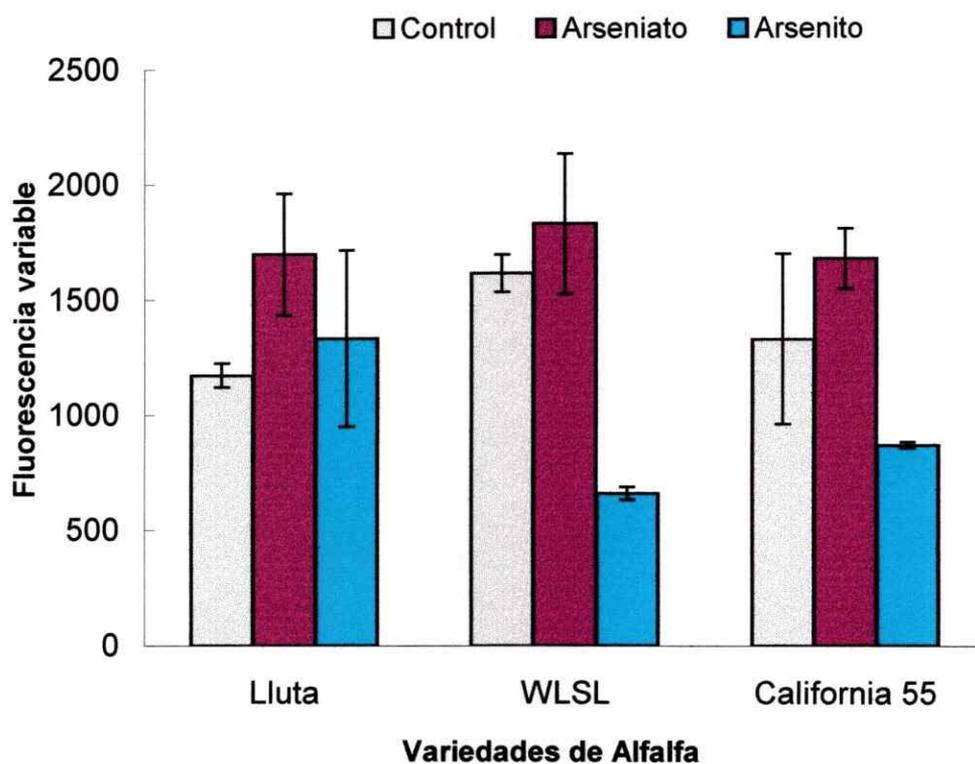


Figura 12. Efecto de arsénico sobre los niveles de fluorescencia variable en plántulas de alfalfa. La fluorescencia variable se determinó por PEA. Las BE son las SD de la fluorescencia variable determinada en la primera y segunda hojas en 5 plántulas controles y tratadas con 2 ppm de arsenito o arseniato durante 15 días.

50% y en un 60% en las variedades California 55 y WLSL, respectivamente; y no modificó esta fluorescencia en la variedad Lluta (Figura 12).

3.7 Morfología de cloroplastos en hojas de plántulas de Alfalfa.

Dado que bajos valores de fluorescencia variable se han relacionado con estrés ambiental que causan daño a nivel de la estructura de tilacoides, los cambios observados en la fluorescencia variable de las plántulas de alfalfa de las variedades California 55 y WLSL sugerían que arsenito podría estar alterando la estructura de las membranas tilacoides. Se decidió entonces, realizar estudios de microscopía electrónica en muestras de hojas de plántulas de las tres variedades de alfalfa en estudio, tratadas tanto con 2 ppm de arseniato como con 2 ppm de arsenito y compararlas con hojas de plantas control.

3.7.1 Morfología de organelos en hojas de plántulas controles.

La morfología de diversos organelos presentes en hojas de plántulas controles de alfalfa, equivalente para las tres variedades estudiadas, se muestra en la Figura 13. Se pudo observar que mitocondrias, núcleos,

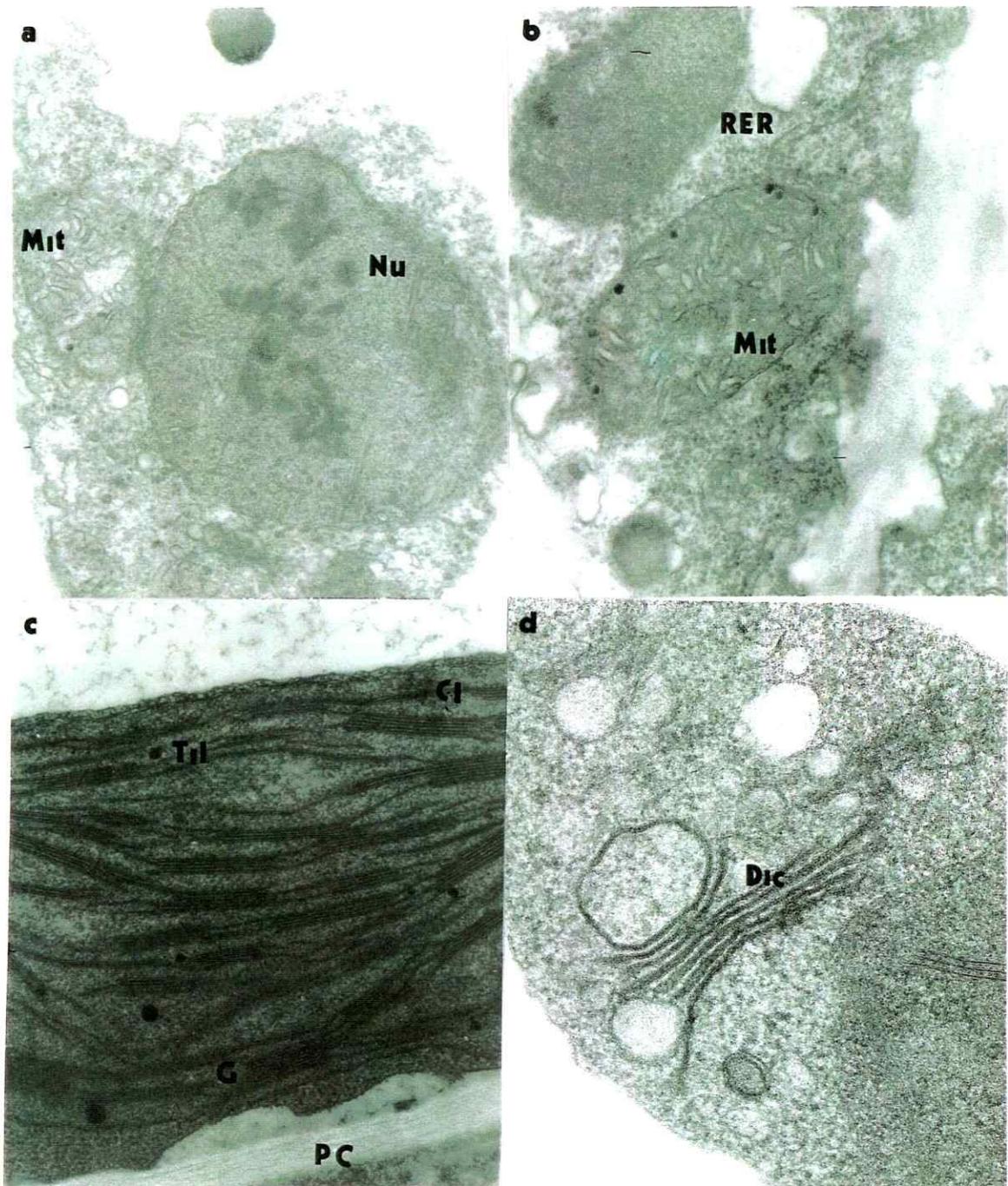


Figura 13. Morfología de organelos en células de hojas de plántulas de alfalfa. Aumentos de 20K (a, b y c) y 60K (d). Núcleo (Nu), Mitocondria (Mit), Pared Celular (PC), Cloroplasto (Cl), Grana (G), Tilacoides (Til) Dictiosomas (Dic), Retículo endoplásmico rugoso (RER).

dictiosomas, retículo endoplásmico rugoso y cloroplastos muestran una morfología normal. En particular, los cloroplastos se visualizan con abundantes tilacoides y grana (Tabla 5)

3.7.2 Efecto de arsenito y arseniato sobre la variedad de alfalfa Luta.

El tratamiento de plántulas de la variedad Luta con 2 ppm de arseniato, no modificó la integridad y forma de los cloroplastos, pero alteró a las granas (Figura 14). El tratamiento con 2 ppm de arsenito alteró la morfología interna de los cloroplastos. Se observaron: formación de vesículas, distanciamiento entre las granas y menor número de tilacoides por grana (Tabla 5). Las vesículas se encontraban cercanas a los tilacoides, y aparecen como membranas tilacoides distanciándose y dejando un lumen entre ellas (Figura 14).

3.7.3 Efecto de arseniato y arsenito sobre la variedad de alfalfa WLSL.

Los cloroplastos de hojas de plántulas de la variedad WLSL tratadas con 2 ppm de arseniato mostraron granas con escasos tilacoides

Tabla 5. Recuento de grana y de tilacoides en cloroplastos de plántulas de alfalfa¹.

	Lluta		WLSL		California 55	
	Nº granas	Tilacoides/ granas	Nº granas	Tilacoides/ granas	Nº granas	Tilacoides/ granas
Control	16 ± 3	9 ± 1	19 ± 1	8 ± 2	23 ± 2	6 ± 2
Arsenito	25* ± 3	5 ± 2	28* ± 3	4 ± 1	34 ± 2	5 ± 2
Arseniato	**	**	18 ± 2	45 ± 2	26 ± 3	5 ± 3

¹ Los valores son el promedio de determinaciones realizadas en al menos 10 cloroplastos para cada tratamiento y variedad de plántulas de alfalfa, tratadas con 2 ppm de arsenito o arseniato durante 15 días; * presencia de vesículas; ** no se observan granas.

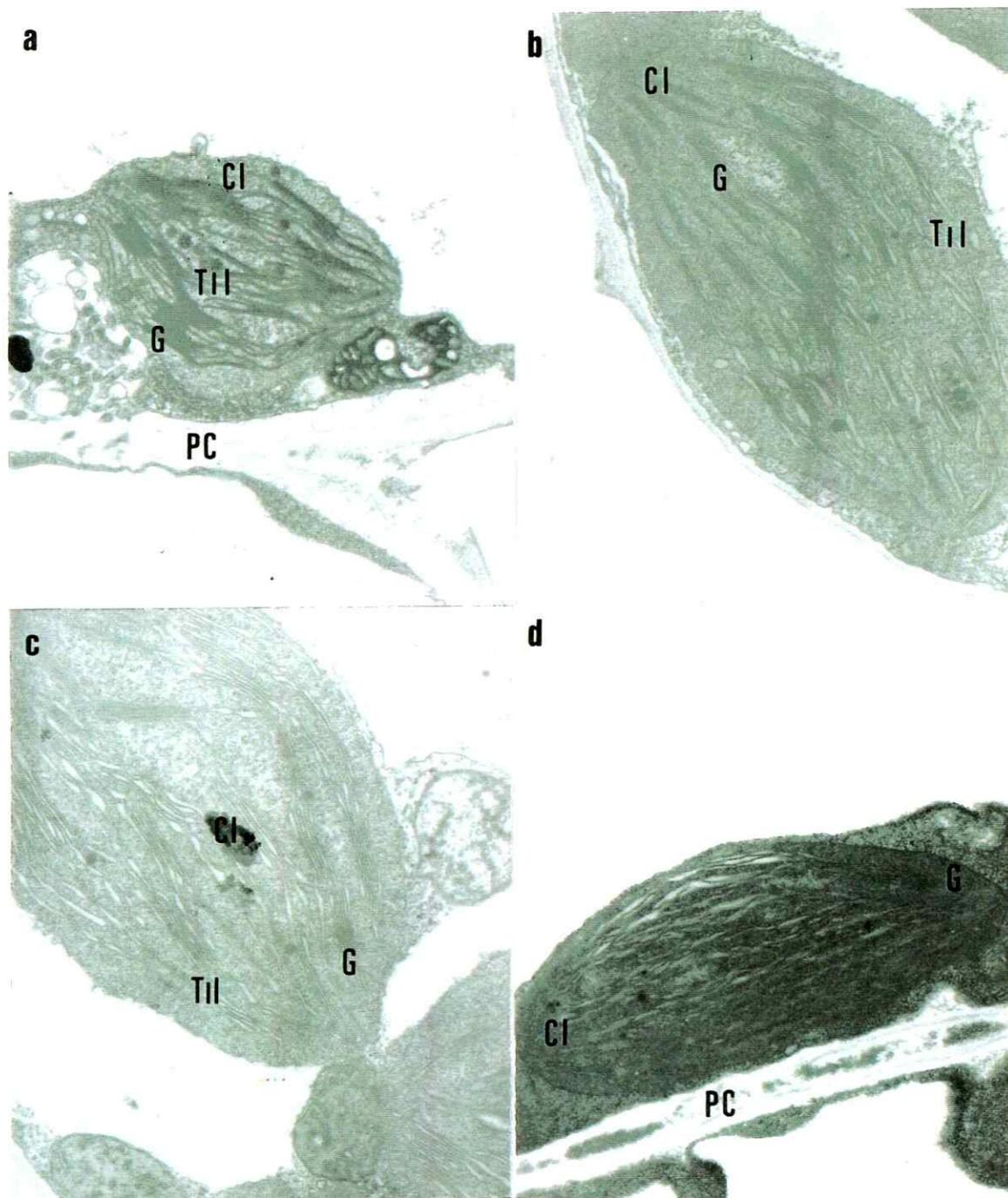


Figura 14. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad Lluta. Control (a), tratadas con 2 ppm de arsenito (b y c) o con 2 ppm de arseniato (d). Aumento de a, b, c y d, 10 K. Abreviaturas igual que en la figura 13.

(Tabla 5), los que se visualizaban anormalmente delgados y con una gran cantidad de granulos adyacentes (Figura 15). El tratamiento con 2 ppm de arsenito produjo un cambio diferente al de la variedad Lluta. Los cloroplastos, los que aparecían con granas más separadas y con zonas menos densas a los electrones en comparación con los cloroplastos de plantas controles (Figura 15).

3.7.4 Efecto de arseniato y arsenito sobre la variedad de alfalfa California 55.

El tratamiento con 2 ppm de arseniato de plántulas de alfalfa de la variedad California 55, disminuyó el número de tilacoides por grana (Tabla 5)(Figura 16). El tratamiento con 2 ppm de arsenito producía un efecto semejante al de arseniato, ya que se observó también una disminución en la cantidad de tilacoides por granas (Figura 16).

3.8 Determinación de Actividades Enzimáticas en Plántulas de Alfalfa

Se decidió estudiar el efecto de arsenito y de arseniato sobre la actividad de las enzimas: a) Fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima

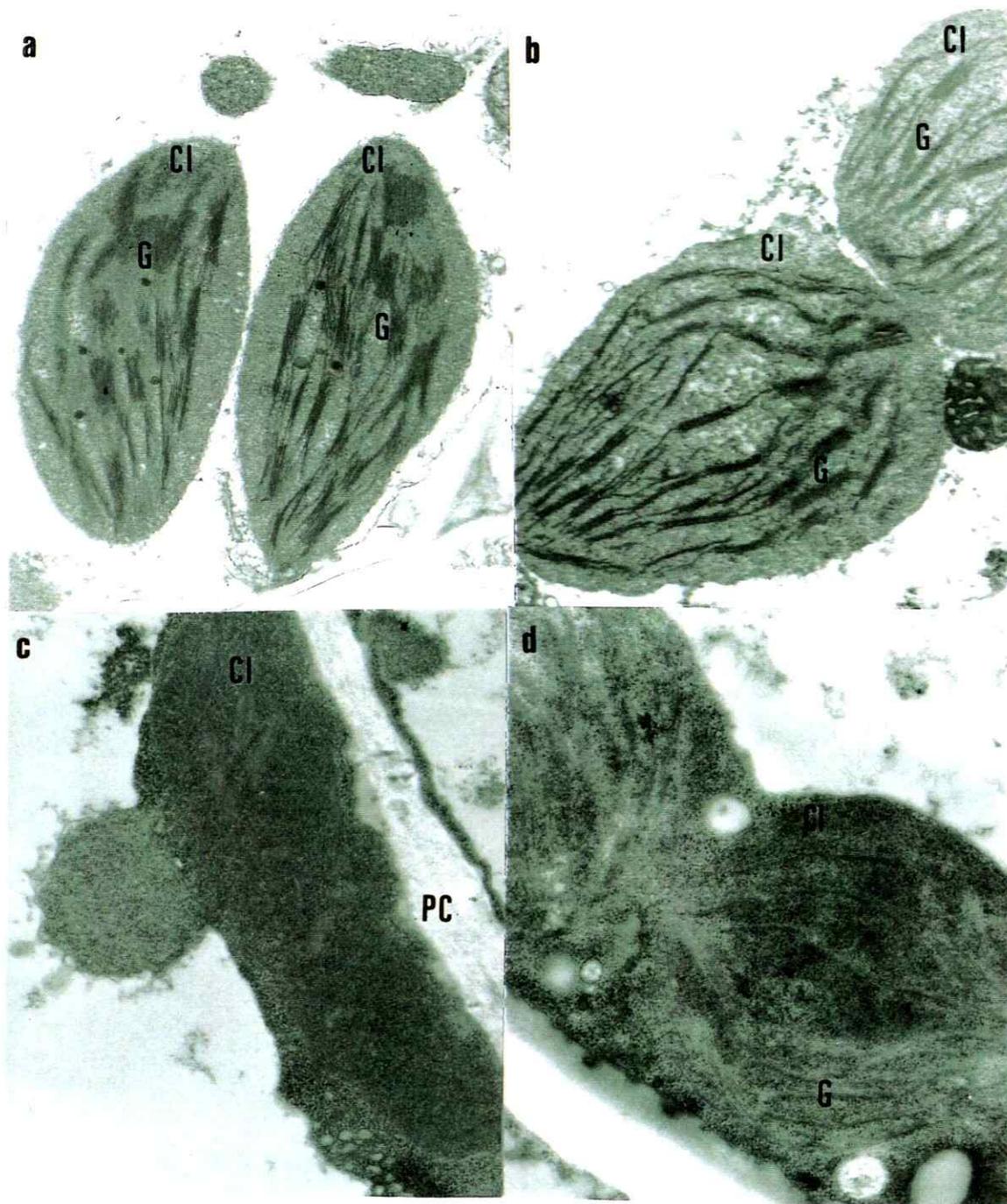


Figura 15. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad WLSL. Control (a), tratadas con 2 ppm de arsenito (b y c) o con 2 ppm de arseniato (d). Aumento de a,b,c y d, 10K. Abreviaturas igual que en la figura 13.

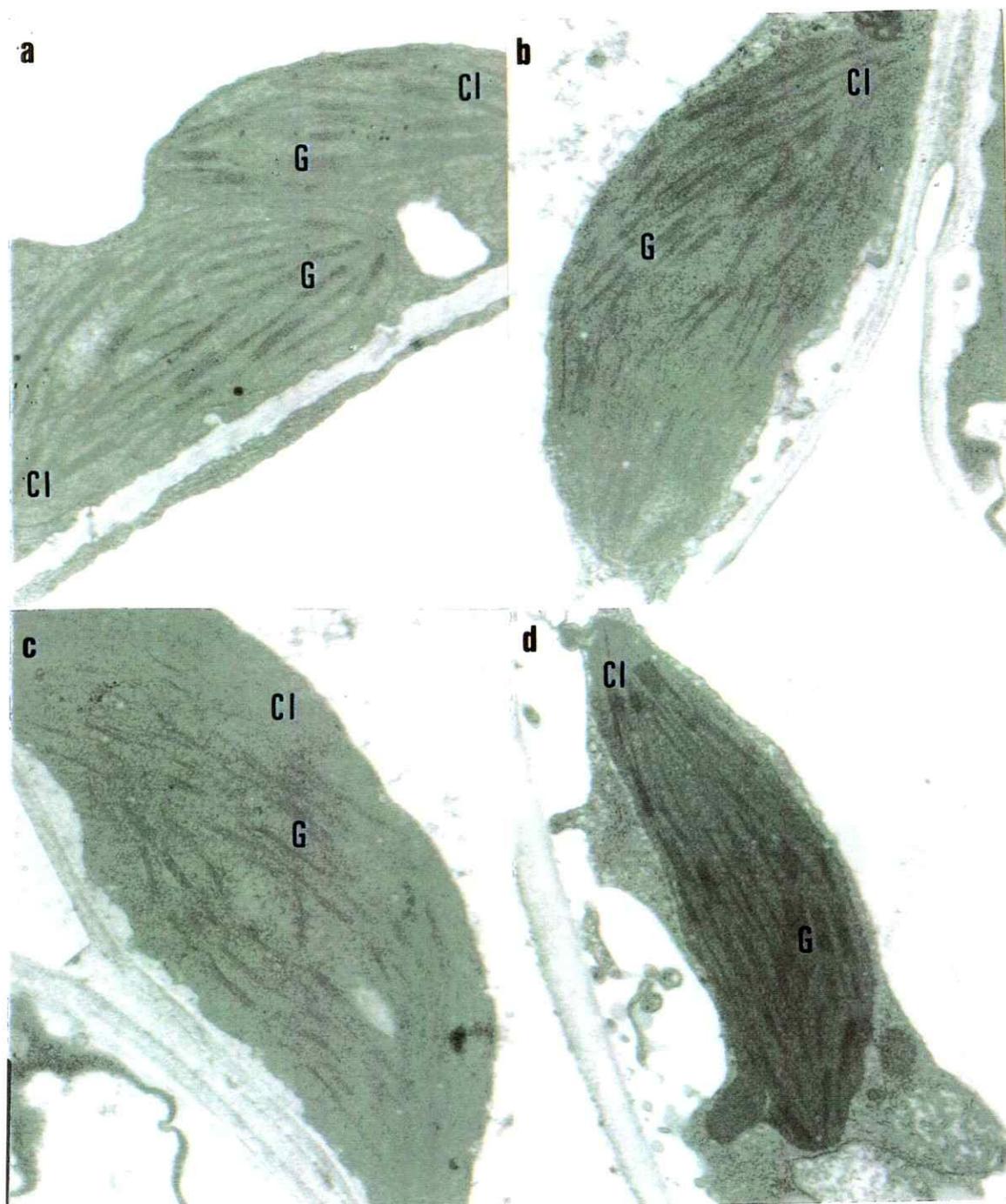


Figura 16. Morfología de cloroplastos de hojas de alfalfa, variedad California 55. Control (a), tratadas con 2 ppm de arsenito (b y c) o con 2 ppm de arseniato (d). Aumento de a, b, c y d, 10K. Abreviaturas igual que en la figura 13.

marcadora de la vía fenilpropanoide y descrita como inducible por diferentes tipos de estrés; b) NAD^+ -Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), enzima de la vía glicolítica que usa ortofosfato como sustrato y que tiene grupos -SH en su sitio activo; y c) ATPasa, enzima ampliamente distribuída en la célula vegetal y que cataliza la reacción inversa de la síntesis de ATP; como una forma de estimar cambios bioquímicos en las plántulas de alfalfa, variedades Lluta, WLSL y California 55 sometidas a estrés arsenical.

3.8.1 Fenilalanina amonio liasa (PAL).

La enzima Fenilalanina amonio liasa (E.C. 4.3.1.5), PAL, es una enzima marcadora de la vía fenilpropanoide, ruta metabólica que participa en la biosíntesis de compuestos que comparten un esqueleto fenilpropano. La inducción de esta vía metabólica tiene activa participación en mecanismos de respuesta que desarrollan los vegetales frente a diversos tipos de estrés ambiental, entre los que se encuentra el estrés arsenical (Gowri y col.,1991). Por lo tanto, la cuantificación de la PAL en plántulas de las diferentes variedades de alfalfa puede contribuir a explicar, desde el punto de visto

bioquímico, su capacidad o incapacidad para adaptarse a condiciones de estrés arsenical.

La actividad de la PAL, en las plántulas controles de la variedad Lluta, fue de 11 pkat/mg, y en las variedades WLSL y California 55, de 10 pkat/mg. Actividades que se mantuvieron durante el transcurso de los experimentos (Figura 17).

El tratamiento con diferentes concentraciones de arseniato no modificó la actividad de la PAL en las plántulas de la variedad Lluta (Figura 17a). La variedad WLSL incrementó en 2,5 veces la actividad de la PAL al quinto día de tratamiento con respecto al control al usar una concentración de arseniato de 0,4 ppm. La variedad California 55 no modificó la actividad de la PAL después del tratamiento con hasta 0,4 ppm de arseniato. Sin embargo, concentraciones superiores de esta especie arsenical eliminaron completamente su actividad.

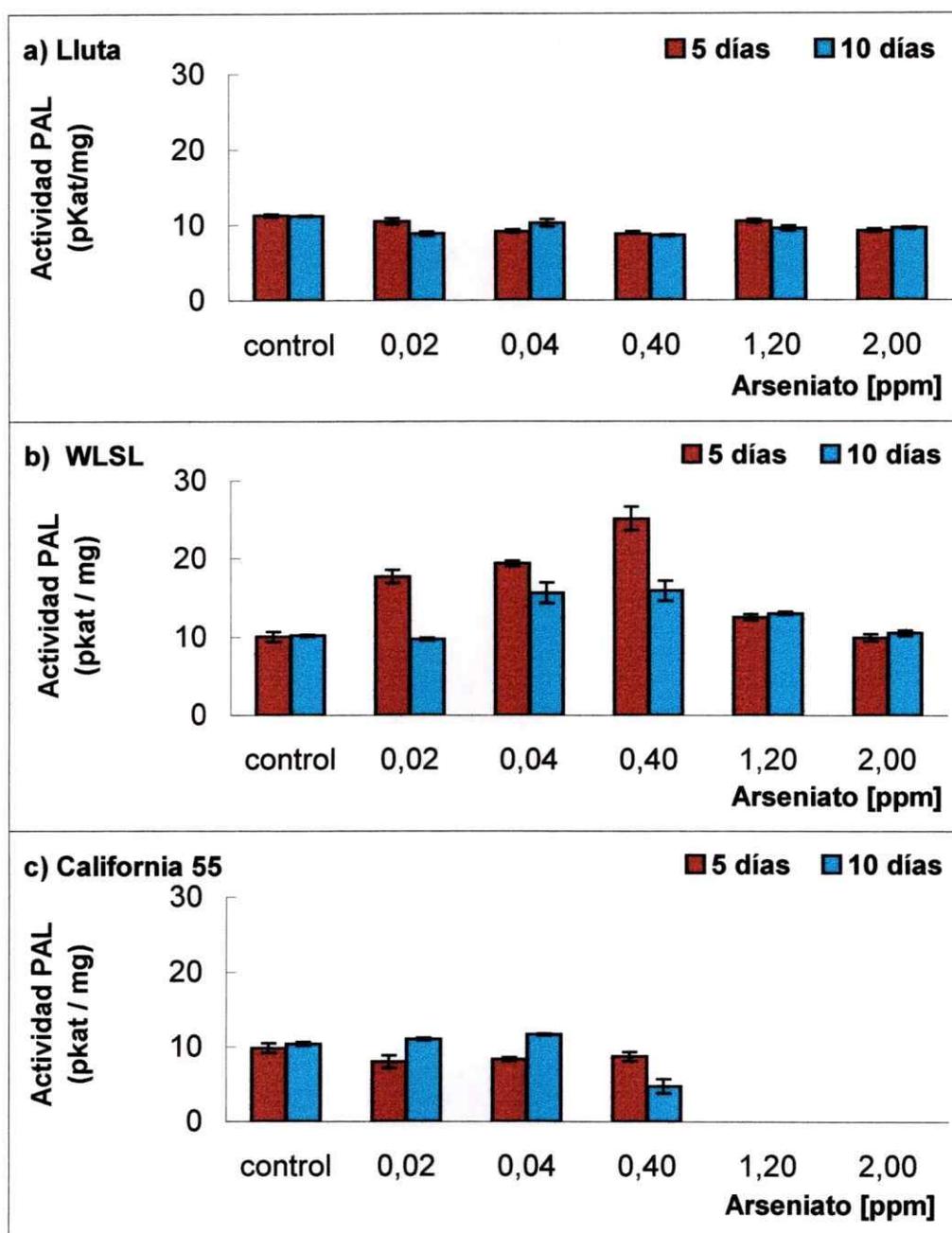


Figura 17. Efecto de arseniato sobre la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima, para cada variedad y tratamiento, se determinó en 5 homogeneizados, obtenido de 50 plántulas cada uno, a los 5 y 10 días de tratamiento arsenical. Las BE son la SD de los valores de actividad obtenidos.

El tratamiento con diferentes concentraciones de arsenito inhibió la actividad de la PAL, en las plántulas de las tres variedades de alfalfa estudiadas (Figura 18).

La variedad Lluta mostró actividad de PAL en los primeros cinco días de tratamiento, hasta concentraciones de arsenito de 0,4 ppm. Sin embargo, esta actividad enzimática pudo ser detectada solo hasta concentraciones de 0,02 ppm al décimo día. En estas condiciones se puede estimar una IC_{50} de 0,21 ppm de arsenito para los cinco días de tratamiento, y una IC_{50} de 0,0275 ppm para los diez días de tratamiento (Figura 18a).

La actividad de PAL también fue inhibida en plántulas de alfalfa de la variedad WLSL, en todo el rango de concentración aplicado, en la misma magnitud, con excepción de la mayor concentración de arsenito. Concentraciones entre 0,02 y 1,2 ppm de la especie arsenical redujeron en un 50% la actividad de PAL en los primeros cinco días y en un 60% al décimo día. El arsenito usado en concentraciones de 2 ppm eliminó

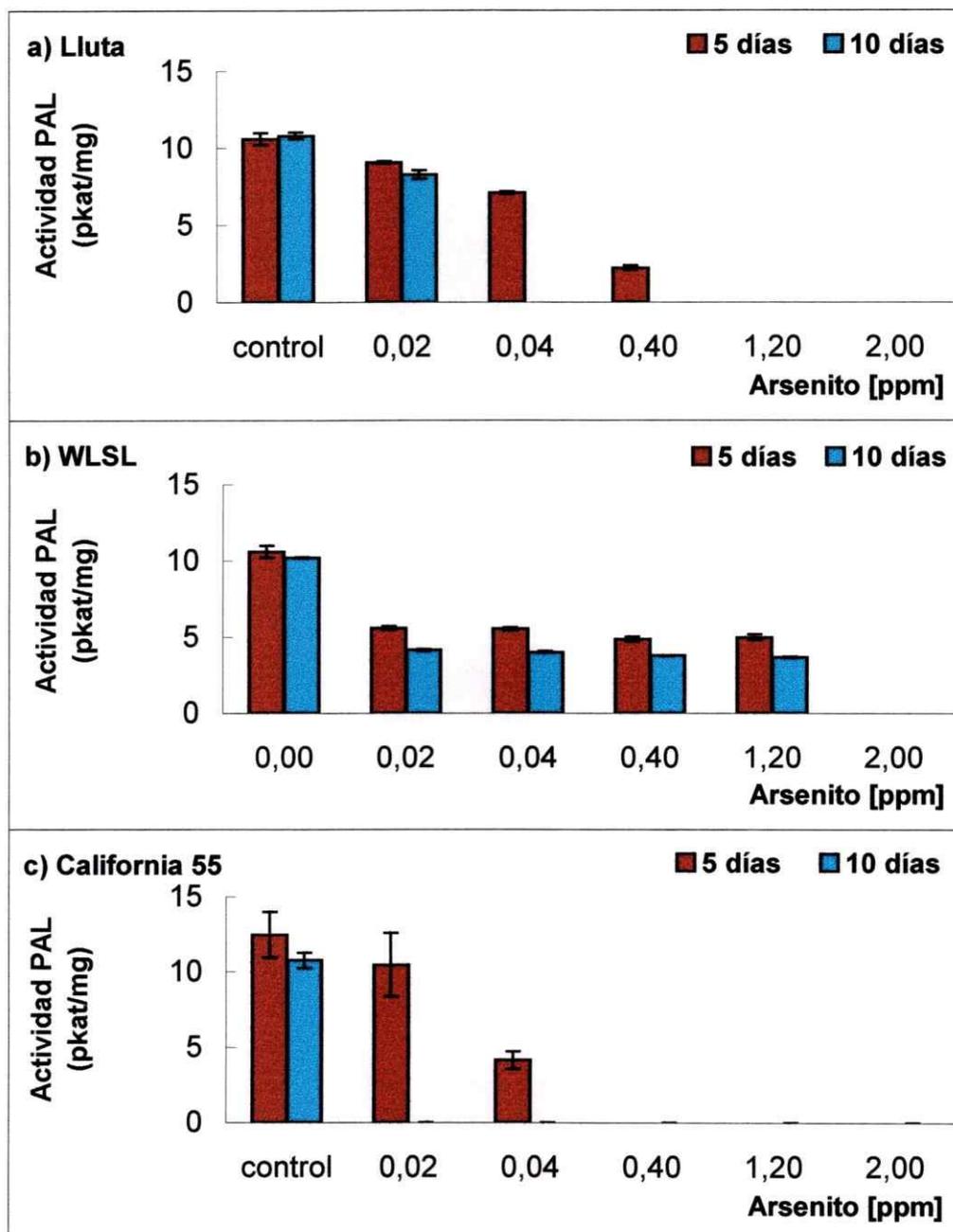


Figura 18. Efecto de arsenito sobre la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima, para cada variedad y tratamiento, se determinó en 5 homogeneizados, obtenido de 50 plántulas cada uno, a los 5 y 10 días de tratamiento arsenical. Las BE son la SD de los valores de actividad obtenidos.

completamente la actividad enzimática a los tiempos analizados (Figura 18b).

El efecto de arsenito en la actividad de PAL en plántulas de alfalfa de la variedad California 55, fue muy similar al observado en plántulas de la variedad Lluta, aunque las IC_{50} fueron de 0,033 ppm para los cinco días y menor que 0,02 ppm para el décimo día (Figura 18c).

3.8.2 NAD^+ - Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

Se ha determinado que existen tres formas de la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa en tejidos vegetales (Axelrod y Beevers, 1956). Esta enzima cataliza la reacción de fosforilación y oxidación reversible del gliceraldehido-3-fosfato a ácido 1,3-bisfosfoglicérico usando para ello ortofosfato y NAD^+ . Participa en la vía glicolítica y se sabe que tiene grupos tioles en su sitio catalítico. Por lo tanto, al cuantificar su actividad se podría estimar la competencia entre arseniato y fosfato y el efecto de arsenito sobre grupos tioles de la enzima, en las tres variedades de alfalfa.

La actividad basal determinada para la G3PDH fue de 140 pkat/mg en la variedad Lluta, de 25 pkat/mg en la WLSL y de 35 en la variedad California 55 (Figura 19).

El arseniato no modificó la actividad de G3PDH a ninguna de las concentraciones utilizadas durante los tres primeros días de tratamiento de las plántulas de la variedad Lluta. A los cinco días de tratamiento en la variedad Lluta se pudo estimar una IC_{50} de 1,8 ppm, y a los diez días de 0,04 ppm (Figura 19a).

Durante los primeros cinco días de tratamiento en la variedad WLSL se pudo estimar una IC_{50} de 1,75 ppm. Sin embargo, el tratamiento por diez días con diferentes concentraciones de arseniato eliminó completamente la actividad de la G3PDH (Figura 19b).

La actividad de la G3PDH en la variedad California 55 se mantuvo también a los niveles del control a los cinco días pero solo hasta concentraciones de 0,4 ppm de arseniato. Concentraciones superiores de la

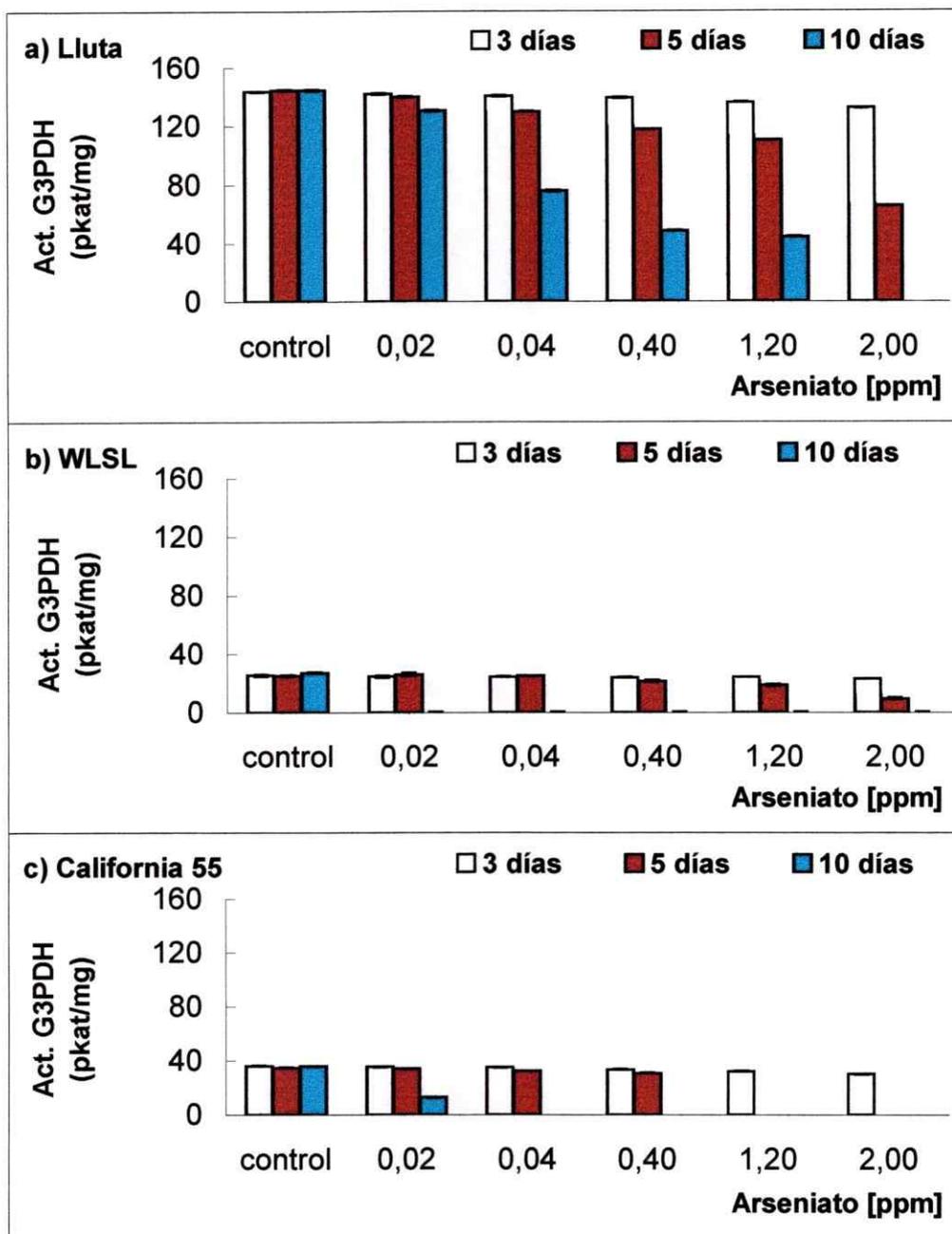


Figura 19. Efecto de arseniato sobre la actividad de NAD^+ Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima se determinó en 5 homogeneizados, cada uno obtenido de 50 plántulas, de las tres variedades para cada tratamiento arsenical a los 5 y 10 días. Las BE son las SD de los valores de actividad determinados.

especie arsenical eliminaron completamente su actividad a esta temporalidad. Finalmente, para los diez días de tratamiento se pudo establecer una IC_{50} de 0,005 ppm (Figura 19c).

La actividad de la G3PDH en plántulas de alfalfa de la variedad Lluta tratadas con diferentes concentraciones de arsenito fue inhibida por esta especie arsenical. El grado de inhibición fue directamente proporcional a la concentración de arsenito aplicado a las plántulas, cuando se analizaron a los tres días de tratamiento. Para esta temporalidad el IC_{50} resultó ser de 1,2 ppm. Después de cinco días de tratamiento, se observó una inhibición de un 79 % en tratamientos con 0,4 ppm de arsenito, y se determinó un IC_{50} de 0,03 ppm. Las plántulas tratadas durante diez días con esta especie arsenical, no mostraron actividad de G3PDH (Figura 20a).

Las plántulas de la variedad WLSL, mostraron una inhibición de la G3PDH semejante a la variedad Lluta. Los valores de IC_{50} calculados para los tres y cinco días de tratamiento, resultaron ser de 2 y 0,02 ppm, respectivamente, y al igual que la variedad Lluta, los análisis efectuados al

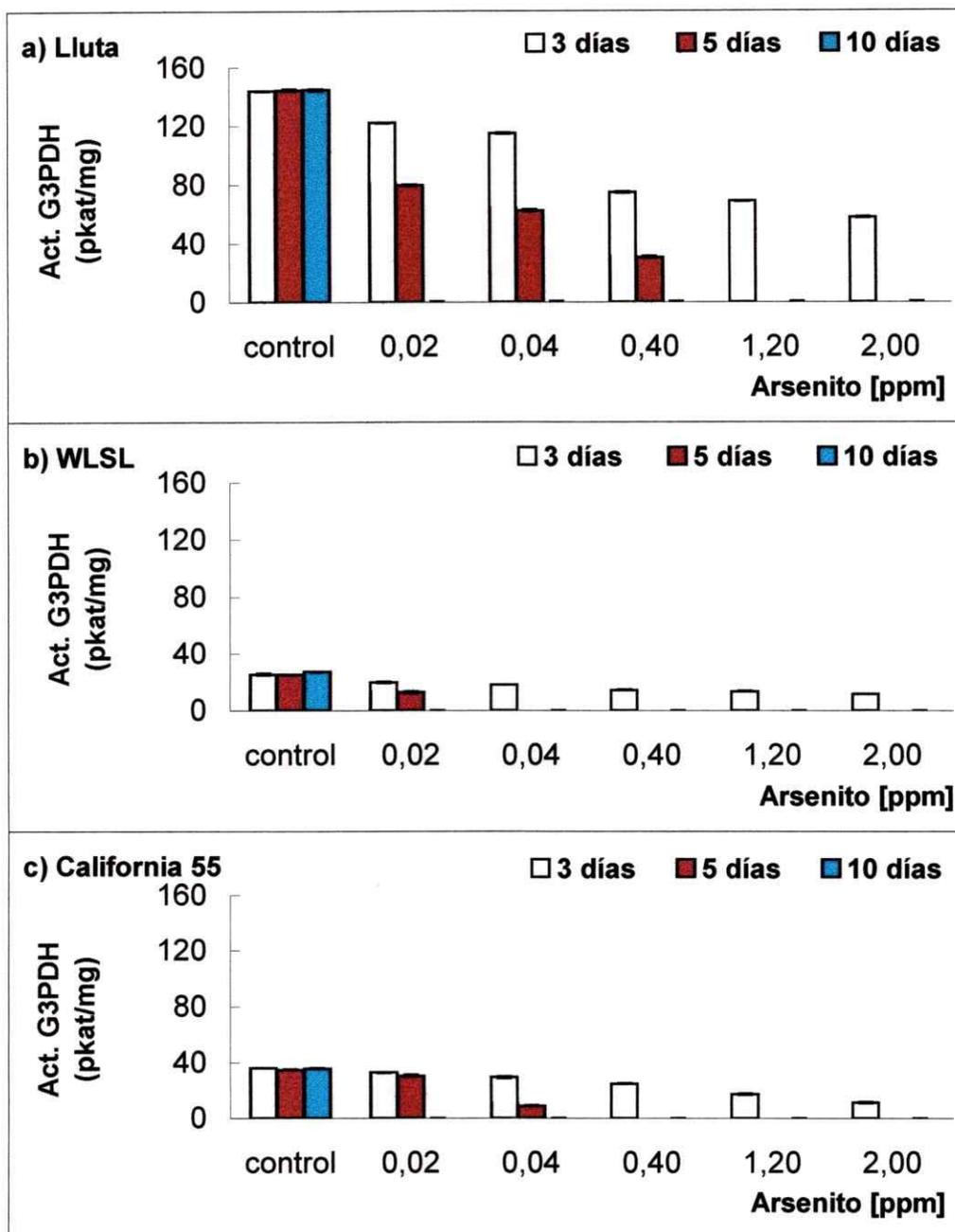


Figura 20. Efecto de arsenito sobre la actividad de NAD^+ Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima se determinó en 5 homogeneizados, cada uno obtenido de 50 plántulas, de las tres variedades para cada tratamiento arsenical a los 5 y 10 días. Las BE son las SD de los valores de actividad determinados.

décimo día mostraron que la actividad de esta enzima había sido eliminada por completo (Figura 20b).

Las plántulas de la variedad California 55, mostraron una mayor inhibición de la G3PDH que las plántulas de las otras dos variedades, lo que se reflejó en los valores de IC_{50} para los tres y cinco días de tratamiento: 1,2 y 0,03 ppm, respectivamente. El tratamiento durante diez días con las diferentes concentraciones de arsenito, eliminó totalmente la actividad de la enzima (Figura 20c).

3.8.3 Adenosín trifosfatasa (ATPasa).

La ATPasa (EC 3.6.1.3) cataliza la hidrólisis de ATP generando como productos ADP y fósforo inorgánico, Pi. Esta actividad enzimática se encuentra generalmente acoplada a otros procesos celulares y está representada por numerosas moléculas, cada una de ellas asociada a una función celular diferente. Por lo tanto, la cuantificación de la actividad de ATPasa puede proporcionar una idea sobre si el arsénico está afectando o no en forma general el metabolismo celular.

Los valores de actividad basal total de ATPasa, en las tres variedades de alfalfa fueron de 0,9 kat/mg para las variedades Lluta y WLSL, y de 0,68 kat/mg para la variedad California 55 (Figura 21).

El arseniato, a concentraciones superiores a 0,4 ppm, incrementó la actividad ATPásica total en plántulas de alfalfa de la variedad Lluta. Este aumento fue de un 38 % a los cinco días de tratamiento y de un 44 %, en el décimo día para una concentraciones de 2 ppm de arseniato (Figura 21). La variedad WLSL se comportó de igual forma dentro del mismo rango de concentraciones de arseniato, con aumentos de actividad ATPasa total de 27% y 33%, a los cinco y diez días, respectivamente. Las plántulas de alfalfa de la variedad California 55, aumentaron su actividad de ATPasa total, en un 10 % y en un 14 % al quinto y décimo día de tratamiento arsenical a una concentraciones de 2 ppm (Figura 21).

El arsenito también incrementó la actividad de ATPasa total en las plántulas de alfalfa de la variedad Lluta, cuando los tratamientos se realizaron con concentraciones superiores a 0,4 ppm, aunque los porcentajes de incremento de la actividad son levemente menores a los observados en

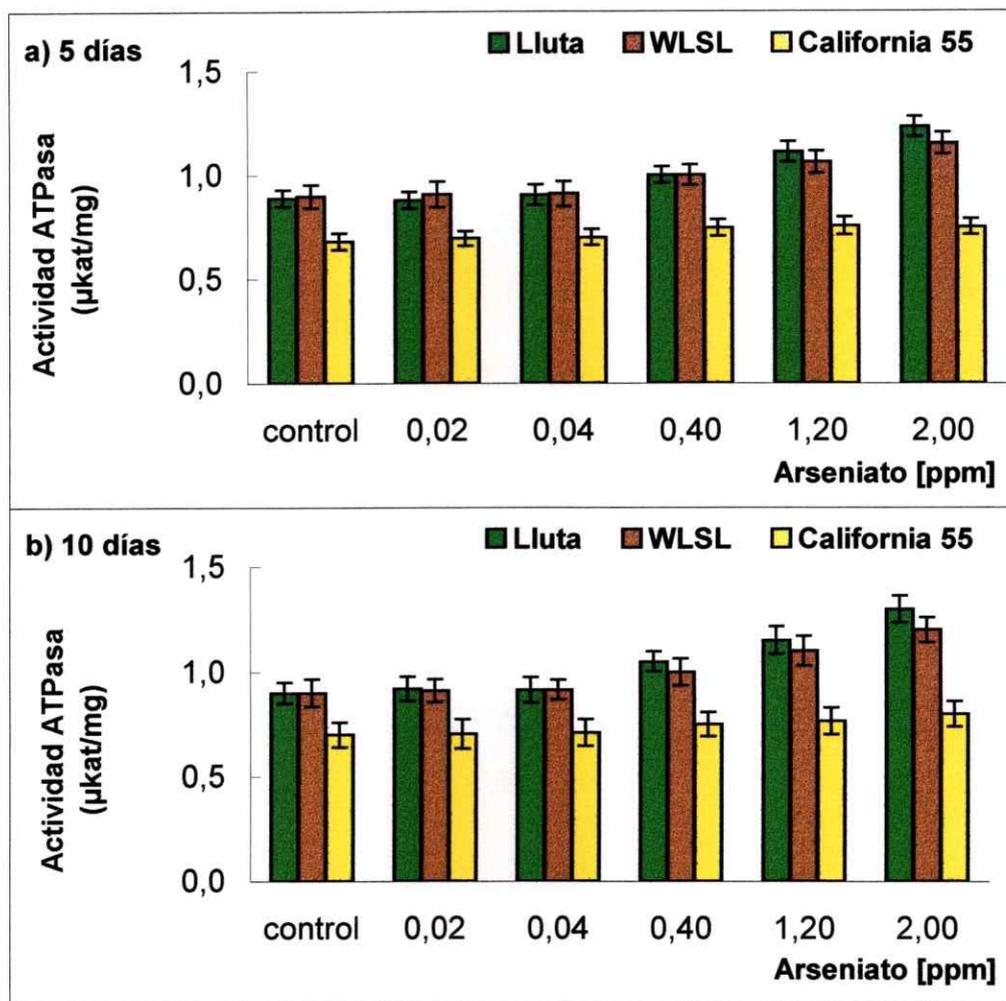


Figura 21. Efecto de arseniato sobre la actividad de ATPasa total en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima, para cada variedad y tratamiento, se determinó en 5 homogeneizados, obtenido de 50 plántulas cada uno, a los 5 y 10 días. Las BE son la SD de los valores de actividad obtenidos.

presencia de arseniato (Figura 22). Las plántulas de alfalfa de la variedad WLSL no mostraron diferencias significativas en su actividad de ATPasa al igual que lo que ocurrió con la variedad California 55 (Figura 22).

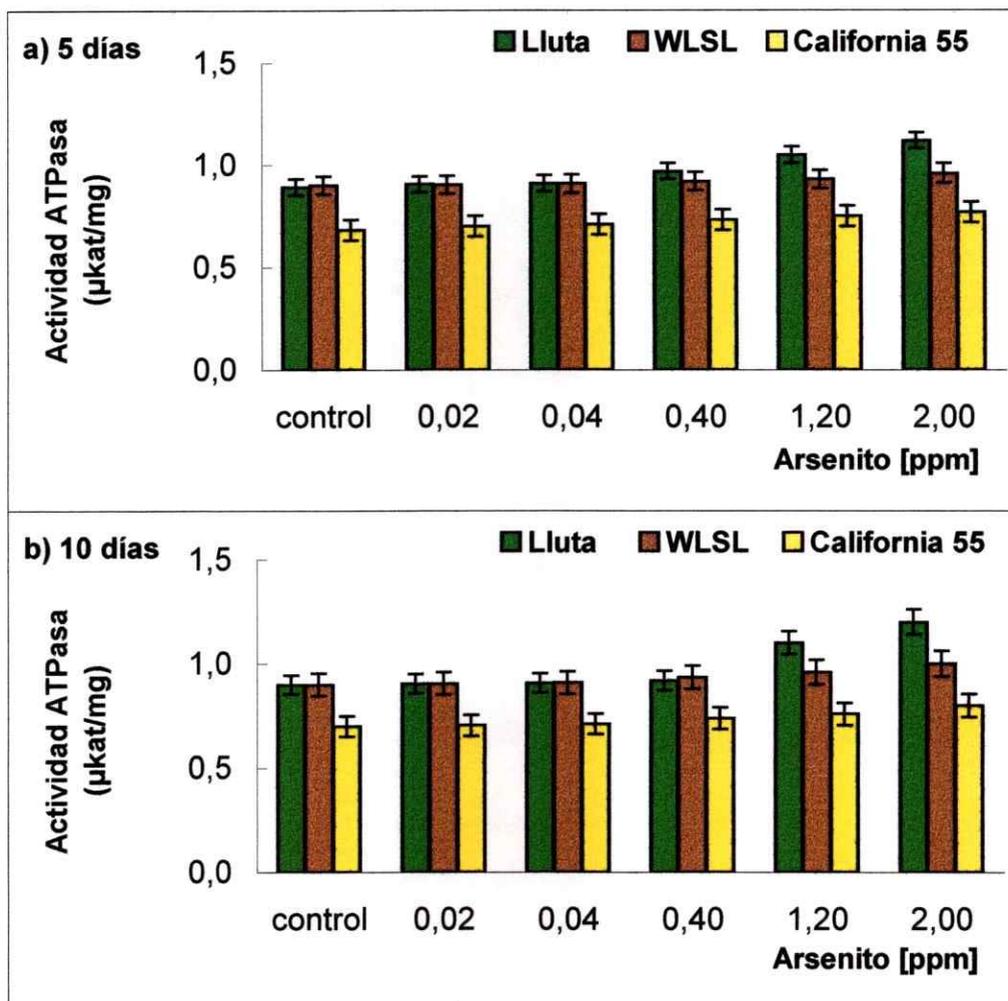


Figura 22. Efecto de arsenito sobre la actividad de ATPasa total en plántulas de alfalfa. La actividad de la enzima, para cada variedad y tratamiento, se determinó en 5 homogeneizados, obtenido de 50 plántulas cada uno, a los 5 y 10 días de tratamiento arsenical. Las BE son la SD de los valores de actividad obtenidos.

4 DISCUSION

4.1 Germinación y Desarrollo.

Los suelos contaminados por metales pesados se caracterizan por tener escasa vegetación y las plantas que crecen en estos suelos poseen mecanismos de tolerancia y/o resistencia que les permiten adaptarse y desarrollarse en presencia de estos contaminantes (Baker, 1987).

Las regiones I y II de Chile, se caracterizan por tener suelos y aguas con altos niveles de arsénico, los que pueden afectar tanto la germinación como el desarrollo y rendimiento de diferentes cultivos vegetales (Escobar, 1984). La existencia de cultivos de alfalfa en estas regiones (Figueroa y col., 1988), aún cuando muestran rendimientos menores a los obtenidos en la zona central del país, sugieren que la alfalfa tiene la capacidad de adaptarse a dicha condición ambiental.

La germinación de semillas requiere de determinadas condiciones de temperatura, porcentaje de humedad y cantidad de oxígeno

presente. La humedad y el oxígeno que se aporta al embrión activan el proceso de germinación, el que se caracteriza por un activo metabolismo a nivel del embrión y de las células del endosperma. El agua es absorbida en grandes cantidades, por lo que al dilatarse los embriones, se produce el rompimiento de la cubierta de la semilla con la consiguiente emergencia de sus raíces y tallos al aire. El material de reserva que contiene la semilla, almacenado en el endosperma o cotiledones, es digerido y transferido a sitios en los cuales se utilizará para la respiración celular y el desarrollo de nuevos órganos. La cantidad del material de reserva que contienen las semillas (proteínas, carbohidratos y lípidos), es suficiente para que se desarrollen los eventos metabólicos y energéticos involucrados en la germinación y en las primeras etapas del desarrollo de una plántula entera, hasta que ésta por sí sola obtenga los nutrientes necesarios para crecer y desarrollarse (Sinnott y Wilson, 1955).

En las tres variedades de alfalfa estudiadas, el porcentaje de semillas germinadas y los tiempos que requirieron para su germinación, no experimentaron variaciones en presencia de arsenito y arseniato (Figura 1),

en comparación con las semillas controles germinadas en ausencia de estos compuestos (sección 3.1.1). Esto indica que ambas especies arsenicales no estarían interfiriendo en los procesos metabólicos involucrados en el proceso de germinación de semillas.

Los efectos descritos a nivel bioquímico que producen arsenito y arseniato (Knowles y Benson, 1983), debieran haber afectado la germinación de semillas de alfalfa, dada la alta actividad metabólica que se produce en el proceso germinativo. Los resultados obtenidos (Figura 1) sugieren que los compuestos arsenicales no son absorbidos a través de la cubierta de la semilla. Por otra parte, su eventual depósito sobre la cubierta de las mismas tampoco afectaría la germinación de las semillas en las tres variedades estudiadas.

Las diferencias observadas en las semillas de la variedad California 55 con respecto a las variedades Lluta y WLSL, en cuanto al bajo porcentaje de semillas aparentemente viables y el mayor tiempo requerido para su germinación, puede deberse a una condición de tipo genético de la

variedad como también a condiciones de almacenamiento, fecha de cosecha y/o estado sanitario de las semillas (sección 3.1.1).

Los resultados de germinación obtenidos en presencia de arsenito y arseniato para las tres variedades de alfalfa, son comparables con aquellos publicados para la especie *Silene vulgaris*, (Paliouris and Hutchinson, 1991). En esta última se realizaron estudios sobre germinación, analizando los efectos de arseniato y de metales pesados como cobalto y níquel, demostrándose que ésta no fue afectada por el tratamiento con las diferentes especies químicas, al menos en un rango de concentración entre 0 y 20 ppm, coincidiendo con lo observado para la germinación de las variedades de alfalfa Lluta, WLSL y California 55.

Una situación diferente se observó al analizar el efecto de arsenito y arseniato sobre el desarrollo de las plántulas de alfalfa. El desarrollo de ambos tejidos, en las plántulas de las tres variedades de alfalfa en estudio, no experimentó alteraciones respecto al control al ser tratadas con arsenito (Figura 2 y Figura 4); mientras que los tratamientos con arseniato sí

produjeron una inhibición del desarrollo de radículas e hipocotilos en las tres variedades de alfalfa estudiadas, cuya magnitud fue diferente para cada variedad (Figura 3 y Figura 5), lo que sugiere que arsenito no estaría afectando los procesos metabólicos involucrados en la proliferación celular, como se ha descrito para el arseniato (Pepper y col., 1988).

Entre los efectos que produce arseniato a nivel metabólico relacionado con la proliferación celular, se ha establecido su participación en los procesos de fosforilación que ocurren al interior de la célula por competencia con el ortofosfato (Kaur y Rosen, 1992), disminuyendo de esta forma el aporte de ATP requerido en los procesos de proliferación, de elongación o de ambos, lo que se traduce en una disminución de la frecuencia de células en mitosis (Pepper y col., 1988), y por consiguiente, un menor desarrollo en la elongación de radículas e hipocotilos.

Al comparar el efecto de arseniato sobre las tres variedades de alfalfa, se observó que la variedad Lluta experimentó una menor inhibición que las otras variedades en el desarrollo de sus radículas e hipocotilos. Este

menor efecto inhibitorio correlaciona con cantidades de arsénico acumuladas en plántula entera, radícula e hipocotilo, las que son de 10, 12 y 13 veces menores con respecto a las determinadas en las variedades WLSL y California 55 (Figura 9 y Tablas 2 y 3). En plántulas de la variedad Lluta, el desarrollo de radícula e hipocotilo fue inhibido en un 42 % y en un 14 %, respectivamente, a la máxima concentración de arseniato utilizada (Figura 3a y Figura 5a), mientras que los porcentajes de inhibición determinados en la variedad WLSL fueron de un 92 % y de 60 % (Figura 3b y Figura 5b), y en la variedad California 55 de 46 % y de 54 % (Figura 3c y Figura 5c), para radículas e hipocotilos, respectivamente. Además, estas diferencias podrían estar relacionadas con los posibles mecanismos de tolerancia que dispusieran las variedades de alfalfa en estudio a arseniato, como la actividad del transportador de ortofosfato a nivel de las raíces (Meharg y Macnair, 1990), la acumulación de arsénico en cada variedad de alfalfa (Figura 9) y la distribución en sus diferentes tejidos (Tabla 3), junto al efecto del mismo sobre los procesos de proliferación celular. La distribución de arsénico en los diferentes tejidos de plántulas tratadas con arseniato (Tabla 3), coincide con el mayor efecto inhibitorio observado a nivel de radículas. Los efectos

inhibitorios específicos dependerían de las características genéticas de cada variedad.

La absorción de arseniato a través de las raíces de las plántulas de alfalfa, y su posterior efecto sobre el desarrollo de radículas e hipocotilos se puede correlacionar con el contenido de arsénico en plantas enteras y con su distribución en los diferentes órganos (Figura 23). Los contenidos de arsénico en radícula e hipocotilo (Figuras 23), muestran que arseniato es absorbido en mayor cantidad que arsenito en ambos tejidos de las tres variedades de alfalfa. Estas diferencias en las cantidades de arsénico acumuladas en los tejidos de las plántulas de alfalfa, se explican en función de que arseniato puede ser absorbido por la planta a través del sistema transportador de ortofosfato que poseen las raíces (Ullrich-Eberius y col., 1989) y la mayor solubilidad de este compuesto con respecto a arsenito.

Mientras las cantidades de arsénico acumuladas en radícula e hipocotilo de las plántulas tratadas con arsenito no alteraron el desarrollo de estos tejidos, las longitudes de las radículas e hipocotilos de las plántulas

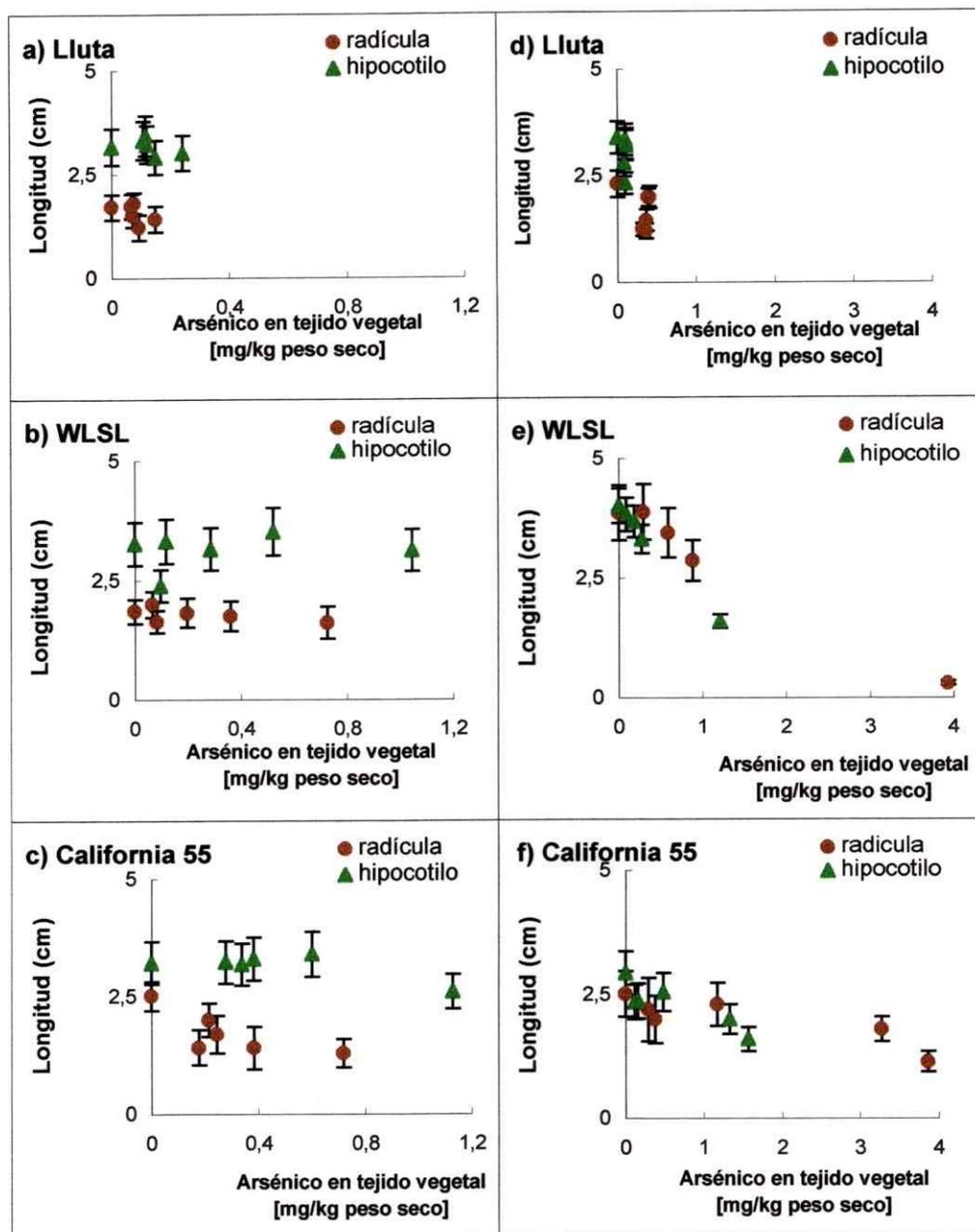


Figura 23. Longitudes de radícula e hipocotilo de plántulas de alfalfa y acumulación de arsénico en el tejido vegetal. Las determinaciones en ambos tejidos de las tres variedades de plántulas de alfalfa se realizaron a los 10 días de tratamiento con arsenito (a, b y c) o arseniato (d, e y f). La determinación de arsénico para cada tratamiento se realizó en duplicado, analizándose tres muestras provenientes de 50 plántulas cada una.

tratadas con arseniato disminuyeron en proporción inversa a las cantidades de arsénico detectadas en dichos tejidos de las variedades WLSL y California 55 (Figura 23).

Los estudios publicados respecto a la acumulación de arsénico en tejidos no muestran un patrón determinado. Así, se ha determinado que el arsénico se acumula casi completamente en las raíces de las plantas de algodón tratadas con arsenito; mientras que el arsénico detectado en las mismas plantas de algodón tratadas con ácido cacodílico no sólo se acumula a nivel de las raíces si no que también en los tallos (Marcus y Rains, 1982); en tomate, arsenito se acumula en las raíces; mientras que en poroto, se acumula en las hojas (Carbonell-Barrachina y col., 1997); en *Spartina patens* y *Spartina alterniflora*, ambos tipos de compuestos arsenicales se acumulan en las raíces (Carbonell-Barrachina y col., 1998). Estos antecedentes y el aportado en esta tesis (Tabla 3) sugieren que la acumulación de arsénico en los diferentes tejidos de la planta depende de la especie o compuesto arsenical con que es tratada o al cual es expuesta.

Si bien se ha establecido el efecto inhibitorio de arseniato en el desarrollo de tejidos de otras especies vegetales como la cebolla (Pepper y col., 1988), que coincide con los resultados obtenidos en alfalfa, no se tienen antecedentes tan claros en relación al efecto de arsenito. Se ha descrito que éste produce una disminución de biomasa, achaparramiento, descolorización de raíces y disminución del desarrollo de hojas con cambios en su orientación (más verticalmente que las hojas de plantas controles) en cultivos de arroz tratados con concentraciones de 0,8 ppm de arsenito (Marin y col, 1992), y de poroto de soya tratados con concentraciones de 1 ppm de esta sal arsenical (Milton y col, 1989). En términos generales, los efectos inhibitorios observados en plántulas de alfalfa tratadas con arsenito son semejantes a los descritos en estas especies vegetales, y sugieren nuevamente que la variedad Lluta es la más tolerante al estrés arsenical.

El mayor crecimiento de la variedad Lluta con respecto a las otras dos variedades de alfalfa, se correlaciona con una menor absorción de arseniato, y sugiere que esta variedad posee mecanismos de tolerancia al estrés arsenical, lo que se correlaciona con su capacidad de crecer y

desarrollarse en suelos arsenicales como son los del valle de Lluta, en la provincia de Arica.

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de tolerancia a los metales pesados (Baker, 1987). Específicamente, con respecto a arsénico, se han descrito como mecanismos de tolerancia: i) la modulación de la actividad del transportador de ortofosfato que poseen las raíces de las plantas, para arseniato (Meharg y Macnair, 1990; 1991; 1992); ii) la compartimentalización de arsenito y arseniato, de manera de minimizar su efecto tóxico en el crecimiento y en el metabolismo de la planta (Carbonell-Barrachina y col., 1997); y iii) la síntesis de fitoquelatinas inducidas por arseniato (Grill, 1987).

El Índice de Tolerancia Media (ITM) es uno de los indicadores utilizados para determinar el grado de tolerancia de la planta a la toxicidad ejercida por un contaminante determinado (Baker, 1987). Su cálculo se basa en establecer el % de desarrollo bajo una determinada condición en función del desarrollo de la situación control. De esta forma, los valores que se

acercan a un 100 % indican una mayor tolerancia; sin embargo estos valores son sólo un índice y no permiten clasificar a las plantas en más o menos tolerantes (Baker, 1987). Los valores de ITM, cuyo cálculo se obtuvo de las mediciones de las longitudes de radícula y de hipocotilo determinadas en las plántulas de alfalfa de las variedades estudiadas, tratadas con arsenito o arseniato, permitieron establecer que en respuesta a arsenito la variedad Lluta y la WLSL tenían ITM semejantes, y a su vez mayores que la variedad California 55, la que tenía un valor de ITM un 47 % menor que las otras dos variedades, al calcularlo en base al desarrollo radicular (Figura 6c y Figura 6d). Estos valores coinciden con las características que poseen dichas variedades: Lluta se puede cultivar en suelos con alto contenido arsenical, WLSL se ha producido para crecer bajo diferentes condiciones ambientales, y California 55, variedad que tiene la menor tolerancia, se cultiva en suelos de la zona central de Chile, que tienen un bajo contenido en arsénico. Los valores de ITM, respecto al desarrollo de los hipocotilos, son semejantes para las tres variedades y cercanos al 90 %, aún cuando la variedad California 55 presentó el valor mínimo (Figura 6a y Figura 6b), lo que sugiere que el comportamiento de los hipocotilos no presenta diferencias en

relación a la presencia de arsenito que está en contacto con las raíces. El hecho de que arsenito, en las tres variedades de alfalfa, se distribuye principalmente a nivel de los hipocotilos y no afecta su desarrollo podría sugerir que en células de este tejido existe algún mecanismo detoxificador (Steffens, 1990) o bien su acción tóxica no involucra los procesos de proliferación celular.

Una situación diferente se observó al analizar los ITM de las tres variedades de alfalfa tratadas con arseniato. En las tres variedades se observó un efecto inhibitorio de esta especie arsenical sobre el crecimiento de las raíces de las plántulas, lo que también se reflejó en los valores de ITM que estuvieron alrededor del 50 % para las variedades Lluta y California 55, y en un 13,5 % para la variedad WLSL (Figura 7c y Figura 7d). Desde esta perspectiva, la variedad WLSL sería la que mostraría la menor capacidad para tolerar altas concentraciones de arseniato. Este valor de 13,5 % para el ITM de la variedad WLSL también coincide con el alto contenido de arsénico encontrado en esta variedad lo que podría explicarse por una alta actividad del sistema transportador de fosfato en sus raíces y la consiguiente

entrada de arseniato. En la variedad California 55 se encontraron niveles similares de arsénico a los de la variedad WLSL (Figura 9b y Figura 9c), sugiriendo que en este caso también habría una alta actividad del transportador de fosfato. Adicionalmente, este sistema transportador de fosfato no tendría la capacidad de discriminar eficientemente entre fosfato y arseniato. Los altos contenidos de arsénico en la variedad California 55 parecerían alterar en menor grado el metabolismo relacionado con la elongación de la radícula. Finalmente, la variedad Lluta cuyo contenido de arsénico en sus radículas es mucho menor que el encontrado en las otras dos variedades (Figura 9a y Tabla 3), sugiere que esta variedad es la que tendría mayor capacidad para discriminar entre fosfato y arseniato; sin embargo, el efecto inhibitorio de esta especie arsenical es semejante al de la variedad California 55, sugiriendo que su sistema metabólico es sensible a menores concentraciones de arsénico.

A diferencia de los ITM calculados para las radículas en respuesta a arseniato, los ITM calculados en relación al desarrollo de los hipocotilos, mostraron que las variedades WLSL y California 55 presentaban

un bajo ITM en comparación con el de la variedad Lluta que era de un 82% (Figura 7a y Figura 7b). Este valor de ITM concuerda con el hecho de que esta variedad sea cultivada en suelos arsenicales y por lo tanto ya se haya adaptado a estas condiciones de estrés. Las tres variedades de alfalfa al ser tratadas con arsenito presentaron ITM superiores al 81 %, lo que era predecible dado que esta especie arsenical no afectó el crecimiento de sus tejidos aún cuando el contenido en los hipocotilos fue de tres veces al encontrado en las radículas (Tabla 2).

El arseniato es la especie arsenical más abundante en los suelos cultivables y aguas superficiales de regadío, por esto las plantas que crecen en suelos contaminados se encuentran expuestas principalmente a arseniato. El hecho de que esta sal arsenical resultara ser la que más afectó el desarrollo de las plántulas de las tres variedades de alfalfa, sugiere que los vegetales que han estado expuestos a arseniato durante tiempos prolongados (generaciones de individuos) debieran haber desarrollado algún tipo de adaptación a este contaminante. Así, la variedad Lluta que se ha cultivado durante generaciones en el valle del mismo nombre, es la que presenta menor

efecto inhibitorio de su desarrollo y mayor ITM relativo de las tres variedades estudiadas.

Por otra parte, ya que el arsenito se encuentra en suelos y aguas profundas, y es oxidado a arseniato al ponerse en contacto con el aire en condiciones de campo, no debiera representar un problema como contaminante, y por lo tanto no sería esperable que alguna de las variedades de alfalfa hubiera desarrollado tolerancia frente a su presencia. Se ha descrito que intracelularmente, algunas plantas y bacterias pueden reducir el arseniato a arsenito, y en este estado de oxidación, modificar grupos -SH (Knowles y Benson, 1983). Este efecto no puede ser descartado en el sistema de alfalfa. Sin embargo sería necesario determinar a futuro si el arsenito es absorbido como tal, o bien si se oxida a arseniato antes de ser transportado al interior de la plántula para ser posteriormente reducido.

También debe mencionarse que la cantidad de arsénico presente en las tres variedades de plántulas de alfalfa (sección 3.4) tratadas con arseniato o arsenito es equivalente para las tres variedades de alfalfa

sugiriendo que durante el transporte no estarían discriminando entre una u otra especie química. Sin embargo, la variedad Lluta absorbió 10 veces menos arsénico (Figura 8 y Figura 9) indicando que esta variedad sería más “excluyente”, lo que concuerda con la ausencia de cambios en el contenido de arsénico a medida que se incrementa la concentración externa. Las variedades WLSL y California 55 estarían dentro de la categoría de plantas “acumuladoras” dado que el contenido de arsénico aumenta en forma lineal al incrementar la concentración externa. Estas categorías se han aplicado a las plantas de alfalfa de las variedades estudiadas basándose en que las especies vegetales en respuesta a la exposición de metales pesados pueden presentar tres tipos de comportamiento: i) asimilación sin restricción del metal pesado, por lo que se denominan plantas hiperacumuladoras; ii) asimilación del metal pesado en forma proporcional a la concentración de éste en el suelo y agua de regadío, denominándose plantas acumuladoras; y iii) baja, mantenida, o nula asimilación del metal pesado en sus tejidos, denominándose plantas excluyentes (Baker, 1987).

4.2 Actividad fotosintética.

La actividad fotosintética de una planta puede ser cuantificada a través del consumo de CO_2 , de la evolución de oxígeno y de parámetros de fluorescencia (directamente relacionados con las clorofilas y el fotosistema II) los que deben relacionarse con el desarrollo normal del tejido vegetal y con la síntesis de fotosintatos, los que en forma general pueden cuantificarse a través de los cambios en la biomasa.

Las especies vegetales, en las cuales la incorporación de CO_2 se produce a través del ciclo de Calvin, para formar como primer producto el ácido 3-fosfoglicérico en la reacción entre ribulosa-1,5-bifosfato con CO_2 , catalizada por la RUBISCO, son denominadas especies o plantas C-3, entre las que se encuentra la especie *Medicago sativa*, alfalfa. La cantidad de CO_2 asimilada por las plántulas es una medida de la actividad del proceso fotosintético, la cual puede variar entre las distintas especies vegetales o por efectos del medio ambiente.

Las dicotildoneas que asimilan CO_2 a través del ciclo del mecanismo C-3, se caracterizan por presentar rangos de fijación de CO_2 entre 18 y 23 $\text{mg}/\text{dm}^2/\text{hora}$ (Salisbury y Ross, 1978). Dado que la alfalfa es una planta C-3 y dicotiledonea, debería presentar valores de fijación CO_2 dentro de estos rangos, lo que fue observado en las plantas controles de las tres variedades de alfalfa estudiadas.

Otro marcador del funcionamiento fotosintético de una planta es la fluorescencia de la clorofila. La emisión de fluorescencia del fotosistema II (PSII) ocurre dentro del espectro electromagnético en la zona del rojo/rojo lejano y la medición de fluorescencia consiste, esencialmente, en separar las longitudes de onda de emisión de fluorescencia (685 nm) de la correspondiente de la luz de excitación (650 nm), por medio de un filtro de interferencia.

Las curvas de fluorescencia emitidas por hojas previamente adaptadas a la oscuridad fueron descritas por primera vez en los años treinta por Kautsky y Hirsch (1934). Estas curvas demuestran que la emisión de

fluorescencia varía en función del tiempo de manera bastante compleja. En el instante que se produce la iluminación, la fluorescencia aumenta casi instantáneamente hasta un nivel inicial o basal, denominado F_0 , luego aumenta rápidamente hasta un nivel máximo, F_m . Finalmente, la emisión de fluorescencia disminuye lentamente hasta un estado estacionario, T , después de haber pasado por un segundo máximo, M .

Estos cambios transitorios de la intensidad de la fluorescencia observados durante la transición oscuridad/luz se producen en función de la activación de una serie de procesos fotosintéticos.

La fluorescencia es inversamente proporcional al proceso de fotosíntesis, debido a que la fluorescencia es la forma de disipación de energía no utilizada por el aparato fotosintético. La fluorescencia basal de las plántulas controles de las tres variedades de alfalfa analizadas resultó ser baja; aumentó en forma casi instantánea al ser excitado el sistema y decayó en 15-20 segundos a los valores basales, comprobándose el correcto funcionamiento del fotosistema II.

El arsenito no afectó la biomasa producida durante los primeros días de tratamiento en las tres variedades de alfalfa, lo que se correlacionó con un desarrollo normal de las plántulas. A los quince días de tratamiento se observó una disminución en la biomasa la que coincidía con un menor desarrollo de las plantas, con una disminución en la asimilación de CO_2 (sección 3.5.) y en la eficiencia del fotosistema II cuantificada como F_v / F_m (sección 3.6.), y con alteraciones a nivel de las membranas tilacoides de los cloroplastos (sección 3.7). En las variedades de alfalfa estudiadas se observó un aumento en la fluorescencia basal como consecuencia de los tratamientos con ambas especies arsenicales (Figura 10) y una disminución en la fluorescencia variable, en las variedades WLSL y California 55 en las plántulas tratadas con arsenito (Figura 12). Dado que se ha descrito que el arsenito puede modificar grupos -SH de proteínas (Readdy y col., 1981) y a que la ATPasa de cloroplastos (ATP sintetasa) tiene grupos -SH en su sitio activo (Lohse y col., 1989) se puede especular que dicha enzima está siendo modificada químicamente y por lo tanto, los resultados obtenidos a tiempos largos de tratamiento con arsenito son los esperables para este tipo de modificación covalente.

El arseniato no alteró significativamente la biomasa de las variedades de alfalfa Lluta y WLSL, y disminuyó en un 25% la de la variedad California 55 (Tabla 1), lo que coincide con el hecho que este compuesto arsenical no alteró significativamente ni la eficiencia del fotosistema II (sección 3.6), ni la asimilación de CO₂ (sección 3.5), ni la estructura de los cloroplastos (sección 3.7) en las plántulas de las variedades Lluta y WLSL, mientras que disminuyó estos parámetros y modificó la estructura de los cloroplastos de plántulas de la variedad California 55. Es importante mencionar que en todas las variedades de alfalfa se observó un aumento en los niveles basales de fluorescencia (Figura 10). Se sabe que el arseniato compite con el fosfato en diversas reacciones metabólicas, entre la que se incluye la reacción catalizada por la ATP sintetasa cloroplástica. Sin embargo, esta competencia no altera estructuralmente a la enzima y por lo tanto, no debieran observarse alteraciones estructurales de los cloroplastos. A largo plazo, debiera comenzar a observarse un efecto inhibitorio generalizado por la falta de ATP, proveniente no solo de la fotosíntesis sino también de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial.

Por otra parte, el incremento en los niveles basales de fluorescencia por efecto de los tratamientos arsenicales, está demostrando que tanto arseniato como arsenito, afectan el proceso fotosintético a través de una pérdida de la energía luminosa que no es capaz de aprovechar el fotosistema II de los cloroplastos de las hojas de plántulas tratadas. La no utilización de la energía liberada por los cambios en los niveles energéticos de los electrones de las moléculas se traduce en un aumento de los niveles de fluorescencia basal.

Es interesante resaltar que en plántulas de alfalfa variedad Lluta, tratadas con arseniato o arsenito, no se producen cambios en los parámetros relacionados con la eficiencia del fotosistema II y daño a nivel tilacoidal (Figura 11 y Figura 12), y si bien se producen pequeñas variaciones en los niveles de fluorescencia basal, estos no son suficientes para dar cuenta de una deficiencia en la funcionalidad del fotosistema II. Estos resultados se pueden correlacionar con el grado de adaptabilidad de esta variedad a la contaminación arsenical de los suelos en que se cultiva y de las aguas que las riegan.

4.3 Actividades Enzimáticas.

Las enzimas como toda proteína están constituidas por residuos de aminoácidos, y en las enzimas algunos de estos residuos o cadenas laterales tienen directa participación en el proceso de catálisis de una reacción enzimática. La unión a estos residuos de aminoácidos de iones u otras moléculas que no correspondan a los sustratos naturales, puede producir la inhibición de la función catalítica de la enzima. La especie arsenito, es capaz de unirse a los grupos sulfhidrilos de los residuos de aminoácidos de cisteína de las proteínas. Por lo tanto, la actividad de las enzimas en las cuales los grupos sulfhidrilos de los residuos de aminoácidos de cisteína participan activamente en la catálisis es inhibida. La unión de arsenito a los grupos sulfhidrilos es revertida por competencia al usar reactivos ditiólicos como el DTT o reductores de grupos -SH.

También se ha propuesto que el arsénico inorgánico ejerce su efecto tóxico a través de la reacción de ácido arsonio (+1) con grupos sulfhidrilos de las enzimas. Cuando la actividad de la enzima depende de un sólo grupo -SH, no existe la posibilidad de que la proteína forme un

ditioéster de ácido arsonio. Cuando la proteína tiene más de un grupo -SH reactivo se pueden formar complejos binarios entre estos grupos -SH y el ácido arsonio. La formación de un primer complejo entre un grupo -SH y el ácido arsonio, genera un modificador de grupos -SH (reactivo monotiólico) más reactivo que el mismo ácido arsonio. Esta última reacción satisface la capacidad de unión del arsénico a azufre y produce un complejo ternario estable y no reactivo. Este complejo ternario no puede ser revertido por la adición de compuestos como el DTT u otros reductores de grupos -SH. Sin embargo, la reacción de un complejo binario - como aquel que se formaría en una enzima con un solo grupo -SH - con un grupo -SH de un ditiol como el DTT también satisface la capacidad del arsénico de unirse al azufre, pero en este caso el grupo -SH contiguo del DTT puede atacar al átomo de arsénico y desplazarlo de su unión al -SH proteico (Knowles y Benson, 1983).

La especie arseniato tiene una gran similitud con el ortofosfato (P_i), no sólo estructural sino también en sus propiedades físico-químicas, por lo que compite con este anión en las diferentes y variadas reacciones que

utilizan Pi como sustrato o lo liberan como producto. La inhibición que muestran las enzimas donde uno de sus sustratos es el fosfato inorgánico, es de carácter competitiva. La unión de arseniato a estas enzimas puede ser desplazada aumentando la concentración de Pi (Voet y Voet, 1995).

Las tres enzimas estudiadas en plántulas de alfalfa sometidas a tratamientos con arsenito y arseniato fueron la fenilalanina amonio-liasa (PAL), NAD⁺-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y adenosín trifosfatasa (ATPasa), en las que se observaron diferentes efectos que resultaron ser dependientes de la especie arsenical y de la variedad de alfalfa.

El arsenito inhibió las actividades de la PAL y de la G3PDH en las tres variedades de alfalfa (Figura 18 y Figura 20), a diferencia de lo que ocurrió con la ATPasa que incrementó su actividad en las plántulas de alfalfa de las variedades Lluta y WLSL y mantuvo la actividad basal en la variedad California 55 (Figura 22).

La inhibición producida por arsenito en las actividades de la PAL y de la G3PDH, puede ser explicada por la presencia de grupos -SH en su estructura (Scott and Eagleson, 1988). Para el caso de la ATPasa, la situación es más compleja ya que no todas las ATPasas descritas tienen grupos -SH necesarios para la catálisis, y por lo tanto, el arsenito aun cuando pudiera unirse a este tipo de grupos en estas enzimas no estaría afectando la catálisis sino más bien produciendo un cambio conformacional que las podría activar. Se ha descrito una ATPasa bacteriana (Silver y col., 1989), cuya función es bombear al medio exterior las especies arsenicales que ingresan a ellas, lo que explicaría una activación de enzimas que cumplieran una función semejante en las variedades Lluta y WLSL. Es importante mencionar que estas variedades de alfalfa, además, presentaron actividades basales de ATPasa más altas que la variedad California 55, lo que coincide con el hecho de ser las variedades que fueron menos afectadas por esta especie arsenical. No puede descartarse, sin embargo, que en respuesta a la presencia de estos contaminantes respondan induciendo una mayor síntesis de la enzima.

La actividad de PAL encontrada en plántulas de alfalfa de las tres variedades analizadas fue característica de cada variedad. Dado que la reacción catalizada por la PAL no incluye Pi ni como sustrato ni como producto, entonces, los cambios en los niveles de actividad de la enzima pueden atribuirse sólo en forma indirecta a los efectos que arseniato produce en la célula. Esto porque la PAL es una enzima marcapasos del metabolismo del ácido chiquímico, involucrado en la síntesis de metabolitos de defensa de los vegetales, por lo que se considera como una enzima marcadora de situaciones de estrés. Desde esta perspectiva, la presencia de arseniato no debiera significar una situación de estrés para la variedad Lluta que no indujo a la PAL (Figura 17a). La variedad WLSL estaría "sensando" la situación estresante induciendo a la PAL (Figura 17b) lo que coincidiría con el hecho de que esta variedad se ha obtenido precisamente para cultivarse bajo diversas condiciones climáticas, y por lo tanto, estar expuesta a tolerar diferentes situaciones de estrés ambiental. Por su parte, la variedad California 55, al mostrar una menor actividad de PAL que los controles no tratados con arseniato (Figura 17c), no solo sería incapaz de responder al estrés arsenical sino que probablemente estaría perdiendo su capacidad de

recambio de proteínas debido a una disminución mayor de las concentraciones de ATP intracelulares por efecto del arseniato, tal como se discute a continuación en el contexto de la G3PDH.

Las tres variedades de alfalfa en estudio no mostraron actividad de G3PDH al décimo día de tratamiento, en comparación con los controles no tratados con arseniato (Figura 19). Si bien, la actividad de la G3PDH se ensaya reemplazando el Pi por arseniato, el efecto del tratamiento con este anión durante tiempos prolongados más que afectar directamente a la actividad enzimática debiera estar afectando a todo el metabolismo relacionado con el Pi. Se sabe que: a) existe una competencia entre el arseniato y el fosfato inorgánico, sustrato de esta reacción y que el producto de la misma contiene arseniato, y b) que dicho producto no es estable y elimina rápidamente al arseniato incorporado. Por lo tanto, el efecto de arseniato se traduce en un desacoplamiento de la fosforilación a nivel de sustrato que se produce en la reacción posterior de la glicólisis, catalizada por la quinasa 1,3-difosfoglicérico (Voet y Voet, 1995). En esta situación, todas las reacciones que permiten obtener ATP o GTP a nivel de sustrato no

ocurrirían en la célula contribuyendo a una depleción paulatina de los nucleotidos trifosfatos. La ausencia de actividad de G3PDH puede deberse entonces a una ausencia de la enzima, más que a una inhibición de su actividad.

La actividad de la ATPasa aumentó en las variedades de alfalfa Lluta y WLSL, y se mantuvo en la variedad California 55, en forma semejante a la descrita en el tratamiento con arsenito (Figura 21).

El incremento de la actividad ATPasa podría estar relacionado con una mayor demanda de fosfato inorgánico, el que se obtendría de compuestos fosforilados que se encuentran normalmente en la célula, el que se requeriría para desplazar a la especie arseniato y minimizar los efectos que esta especie arsenical pudiera tener a nivel metabólico. Tampoco puede descartarse en este caso, que existan ATPasas semejantes a las descritas en bacterias (Silver y col., 1989), cuya función sea bombear al medio externo el arseniato absorbido.

El hecho que sólo en plántulas de la variedad Lluta se observe un incremento importante en la actividad de ATPasa en comparación con las variedades WLSL y California 55 (Figura 21), puede estar relacionado con que dichas plántulas se obtuvieron a partir de semillas de plantas de alfalfa crecidas en suelos contaminados con arsénico, y podrían reflejar a nivel molecular la adaptación producida en esta variedad como consecuencia del estrés arsenical. Esta situación podría compararse a la de plantas que se desarrollan en suelos con alto contenido de metales pesados, en cuyas raíces se ha detectado la presencia de múltiples isoenzimas de fosfatasa cuya función sería la de mantener el transporte adecuado de nutrientes sin que se produzca inhibición de las mismas por dichos metales (Harborne, 1988).

Los resultados relacionados con las actividades de las enzimas PAL, G3PDH y ATPasa sugieren que los estudios a nivel molecular pueden aportar mayores antecedentes en cuanto a las características de tolerancia de las variedades de alfalfa analizadas, y parecieran ser más concluyentes que los de índole fisiológica por si solos. De esta manera, y realizando ambos tipos de estudio en paralelo, se podrá definir en forma más precisa las

características que hacen más tolerante a una planta al estrés causado por su entorno.

Además, los resultados obtenidos en los diferentes estudios fisiológicos y bioquímicos realizados en esta tesis, muestran que de las tres variedades de alfalfa analizadas, la variedad de alfalfa denominada Lluta presentó menores alteraciones a los tratamientos arsenicales, lo que indica a su vez, que fue la más tolerante de las tres variedades y por lo tanto debe poseer mecanismos de tolerancia al estrés arsenical. Si bien el estudio de los mecanismos de tolerancia al arsénico, en las plántulas de alfalfa no fue parte del trabajo de esta tesis, los resultados aquí aportados son un avance para futuros estudios de interacción arsénico -planta.

5 CONCLUSIONES

El desarrollo experimental de esta tesis comprendió el estudio de diferentes procesos de carácter bioquímico y fisiológico: germinación de semillas y desarrollo de las plántulas, acumulación de arsénico en plántula entera y en diferentes tejidos, funcionalidad del fotosistema II y asimilación de CO₂, morfología de cloroplastos y actividades enzimáticas, en semillas y plántulas de alfalfa, variedades Lluta, WLSL y California 55. Los resultados obtenidos, luego de su análisis, permitieron concluir que:

- 1) La germinación de las semillas de alfalfa de las variedades Lluta, WLSL y California 55 no se inhibe por la presencia de arsenito y arseniato, sugiriendo que el arsénico en las formas iónicas indicadas, no es capaz de ingresar a la semilla a través de la cubierta. Su

depósito en la superficie de la cubierta de la semilla tampoco inhibe la germinación.

- 2) El desarrollo y crecimiento de raíces e hipocotilos de las plántulas de las tres variedades de alfalfa se inhibe sólo en presencia de arseniato, inhibición que es dependiente de la concentración de arseniato en los tejidos; y de acuerdo a los índices de tolerancia media calculados, la variedad alfalfa Lluta es la más tolerante tanto a arsenito como a arseniato; mientras que la variedad alfalfa California 55 es la más sensible de las tres variedades estudiadas.

- 3) El arsenito es más tóxico que el arseniato desde el punto de vista de la actividad fotosintética de las plantas, ya que produce una disminución de la biomasa, de la eficiencia fotosintética, de la asimilación de CO_2 ; y altera la morfología de los cloroplastos en las tres variedades de alfalfa.

- 4) Dados el patrón de asimilación, en las variedades de alfalfa Lluta, WLSL y California 55, de arsenito o arseniato en función de la concentración externa de éstos y que la variedad Lluta absorbe 10 veces menos arsenito y arseniato, permiten clasificar a la variedad Lluta como “excluyente”, mientras que a las otras dos variedades como plantas “acumuladoras”.

- 5) El arseniato se acumula mayoritariamente en las raíces de las plántulas de alfalfa y el arsenito, a nivel de los tallos lo que permite explicar el porqué es más tóxico para la función fotosintética.

- 6) La inducción de la PAL en las plántulas de la variedad de alfalfa WLSL, correlaciona con la capacidad de esta variedad de cultivarse bajo diferentes condiciones ambientales, ya que es capaz de responder al estrés sometido.

- 7) La mayor toxicidad de arsenito a nivel del metabolismo celular se confirma a través de su efecto inhibitorio sobre las enzimas PAL y NAD⁺-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, de las tres variedades de alfalfa.

- 8) La variedad de alfalfa Lluta poseería mecanismos más eficientes para discriminar y/o eliminar el arsénico absorbido, ya que incrementó la actividad de ATPasa, tanto en respuesta a arsenito como a arseniato.

En resumen, el conjunto de resultados y las conclusiones que se pueden sacar de los mismos permiten aseverar que las plántulas de la variedad Lluta fueron las que sufrieron menores alteraciones o, bien, debían ser expuestas mayor tiempo a arsenito y arseniato, para que la magnitud del efecto fuera similar al observado en las variedades WLSL y California 55. Por lo tanto, la variedad Lluta es la que más tolera altas concentraciones de arsénico y permite comprobar la hipótesis planteada al

inicio de esta tesis: **“las variedades de alfalfa que pueden cultivarse en suelos con alto contenido arsenical son más tolerantes que aquellas que se cultivan en suelos que no contienen arsénico”**.

6 BIBLIOGRAFIA

Allison, W.S. 1966. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-crystalline, p 210-215. In *Methods Enzymol.*, S.P. Colowick and N.O. Kaplan Ed., Vol. IX: Carbohydrate Metabolism, Willis Wood, Ed. California, USA.

Anderson, L. E. y Avron, M. 1976. Light modulation of enzyme activity in chloroplasts. *Plant Physiol.* **57**: 209-213.

Antonovics, J. 1975. Metal tolerance in plants: perfecting an evolutionary paradigm. *Proceedings of the International Conference on heavy metals in the Environment*, Toronto, Canada **2**: 169-186.

Arnon, D.I. y Hoagland, D.R. 1940. *Soil Sci.* **50**: 463-484.

Asher, C.J. y Reay, P.F. 1979. Arsenic uptake by barley seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* **6**: 459-466.

Axelrod, B. y Beevers, H. 1956. Mechanisms of carbohydrate breakdown in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **7**: 267-298.

Baker, A.J.M. 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* **106**: 93-111.

Beever, R.E. y Burns, D.W.J. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Adv. Bot. Res.* **8**: 127-219.

Bell, W. D. y col. 1962. Effects of yellow stripe mutant on the uptake and utilization of iron. *Botanical Gazette* **124**: 1-8.

Benson, A.A. (1989). Arsonium compounds in algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6131-6132.

Bolton, J.L. y col. 1972. World distribution and historical developments, Ch. 1. In *Alfalfa Science and Technology*, p. 1-34. Monograph N° 15. American Society of Agronomy. Madison, USA.

Bolt, G.H. y Bruggenwert, M.G.M. 1976. Soil chemistry A. Basic elements p 281. Elsevier Scientific Pub. Co., New York, USA.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Bradshaw, A.D. 1952. Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. *Nature* **169**: 1098.

Budd, K. y col. 1986. Arsenite toxicity and arsenite tolerance in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Can. J. Bot.* **64**: 2433-2440.

Budd, K. y Craig, S. 1981. Resistance to arsenate toxicity in the blue green alga *Synechococcus leopoliensis*. *Can. J. Bot.* **59**: 1518-1521.

Carbonell-Barrachina, A.A. y col., 1996. Strategies of tomato and bean plants tolerance to arsenic. *Fresenius Environ. Bull.* **5**: 289-294.

Carbonell-Barrachina, A.A. y col., 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Scientia Horticulturae* **71**: 167-176.

Carbonell-Barrachina, A.A. y col., 1998. The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil* **198**: 33-43.

Carrasco, M.A. 1994. Química de metales pesados en suelos de Chile pp 137-149. IV Simposio sobre contaminación ambiental: Impacto ambiental de metales pesados en Chile. Santiago, Chile. Abril, 19-20.

Cox, R. M. y Hutchinson, T. C. 1979. Metal co-tolerances in the grass *Dechampsia cespitosa*. *Nature* **297**: 231-233.

Cox, R. M. y Hutchinson, T. C. 1980a. The response of root acid phosphatase activity to heavy metal stress in tolerant and non-tolerant clones of two grass species. *New Phytol.* **86**: 359-364.

Cox, R. M. y Hutchinson, T. C. 1980b. Multiple metal tolerance in the grass *Dechampsia cespitosa* (L.) Beauv. from Sudbury smelting area. *New Phytol.* **84**: 631-647.

Cox, R. M. y Hutchinson, T. C. 1981. Multiple and co-tolerance to metals in the grass *Dechampsia cespitosa*: adaptation, preadaptation and "cost". *J. Plant Nutr.* **3**: 731-741.

Dabeka, R.W. y col. 1987. Dietary intakes of lead, cadmium, arsenic and fluoride by Canadian adults: a 24-hour duplicate diet study. *Food Additives and Contaminants.* **4**: 89-91.

EPA. (1988). Risk Assessment Forum. special Report on Ingested arsenic: Skin cancer; Nutritional essentiality (EPA/62S5/3-87/013). U.S. Environmental Protection Agency, washington, D.C., July, 1988.

Escobar, H. (1984). Investigaciones de variedad de alfalfa en zonas desérticas, I Región. Gerencia de Desarrollo CORFO.

Figuroa, L. y col. 1988. Niveles de arsénico en suelos de tres valles de Arica y su relación con el nivel y magnificación en alfalfa (*Medicago sativa* L). *Agricultura Técnica* **48**: 206-211.

Figuroa, L. y col. 1992. The phosphate effect on the arsenical activity. *Proc. Arsenic Environ. Incid. Health.* pp 71-76.

Fiske, C.H. y SubbaRow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.

Gartrell, M.J. y col. 1986. Pesticides, selected elements, and other chemicals in adult total diet samples. October 1980-March 1982. *J. Assoc. Anal. Chem.* **69**: 146.

Grill, E. y col. 1987. Phytoquelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants and functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 439-443.

Gwori, G. y col. 1991. Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XII. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor treated cell cultures and developing plant. *Plant Mol. Biol.* **17**: 415-429.

Gyorgyey, J. y col. 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant. Mol. Biol.* **16**: 999-1007.

Harborne, J. B. 1988. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, New York, USA.

Hartl, D. L. 1980. Heavy metal tolerance in plants. En: *Principles of population Genetics*. p 366. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.

Hazell, T. 1985. Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. *World Review of Nutrition and Dietetics* **46**: 1-5.

Hogan, G.D. y Rauser, W.E. 1979. Tolerance and toxicity of cobalt, copper, nickel and zinc in clones of *Agrostis gigantea*. *New Phytologist* **83**: 665-670.

Ji, G., y Silver, S. 1992. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI-258. *J. Bacteriol.* **174**: 3684-3694.

Jolliffe, D.M. 1993. A history of use of arsenicals in man. *J. Royal Soc. Med.* **86**: 287-189.

Jowett, D. 1964. Population studies on lead tolerant *Agrostis tenuis*. *Evolution* **18**: 70-73.

Jung, C. y Rothstein, A. 1965. Arsenate uptake and release in relation to the inhibition of transport and glycolysis in yeast. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1093-1112.

Kaur, P. y Rosen, B.P. 1992. Plasmid encoding resistance to arsenic and antimony. *Plasmid* **27**: 29-40.

Kautsky, H. y Hirsch, A. 1934. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlenauerassimilation. Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. *Biochemische Z.* **274**: 423-434.

Khattak, R.A. y col. 1989. Influence of binary interactions of arsenate, molybdate and selenate on yield and composition of alfalfa. *J. Environ. Qual.* **18**: 355-360.

Khattak, R.A. y col. 1991. Accumulation and interaction of arsenic, selenium, molybdenum and phosphorus in alfalfa. *J. Environ Qual.* **20**: 165-168.

Knowles, F.C. y Benson, A.A. 1983. The biochemistry of arsenic. *TIBS* **8**: 178-180.

Latzko, E. y col. 1970. Effect of photosynthesis inhibitors and oxygen on the activity of ribulose-5-phosphate kinase. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **39**: 1140-1144.

Lohse, D. y col. 1989. Activity equilibria of the thiol-modulated chloroplast H⁺ ATPase as a function of the proton gradient in the absence and presence of ADP and arsenate. *Biochim. Biophys. Acta* **976**: 85-93.

Luo, M. y col. 1991. Primary structure of an environmental stress and abscisic acid inducible alfalfa protein. *Plant Mol. Biol.* **17**: 1267-1269.

Machlis, A. 1941. Accumulation of arsenic in shoots of sudan grass and bushbean. *Plant Physiol.* **16**: 521-543.

Marcus, L. y Rains, D.W. 1982. Uptake, accumulation, and translocation of arsenical compounds by cotton. *J. Environmental Qual.* **11**: 715-719.

Marin, A.R. y col. 1992. The influence of chemical forms and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil* **139**: 175-183.

Mckenzie, J.S. y col. 1988. Cold and heat tolerance. pp 259-302. En *Alfalfa and alfalfa improvement*. Hanson, C.H., Barnes, D.K., Hill, R.R. (eds.) Agronomy Monographs N° 29. Madison, USA

Meek, M.E. y Hughes, K. 1992. Arsenic in the general environment evaluation of risk to health. Proceedings Arsenic Environmental and its Incidence in Health pp 173-181. Santiago, Chile. Mayo, 25-29.

Meharg, A.A. y Macnair, M.R. 1990. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol* **116**: 29-35.

Meharg, A.A. y Macnair, M.R. 1991. Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol* **117**: 225-231.

Meharg, A.A. y Macnair, M.R. 1992. Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. J. Exp. Botany **43**: 519-524.

Milton, N.M. y col. 1989. Arsenic and selenium induce changes in spectral reflectance and morphology of soybean plants. Remote Sense Environ. **30**: 263-269.

Moore, J.N. y Luoma, S.N. 1990. Hazardous wastes from large-scale metal extraction. Environ. Sci. Technol. **24**: 1278-1285.

Nabrzyski, M. y col. 1985. Arsenic content of daily diets of children and adults. Roczn. Panstw. Zakl. Hig., **36**: 113-115.

Pacyna, J.M. 1987. Atmospheric emissions of arsenic, cadmium, lead and mercury from high temperature process in power generation and industry. En: Hutchinson, T.C., Meema, K.M. eds. , Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment. John Willey & Sons Ltd. pp 69-85. New York, USA.

Paliouris, G. y Hutchinson, T.C. 1991. Arsenic, cobalt and nickel tolerances in two populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garke from Ontario, Canada. New Phytol. **117**: 449-459.

Pastenes, J. y col. 1983. Relaciones de contenido de arsénico en el sistema agua-suelo-planta en el valle de Chiu-Chiu. Bol. Soc. Chil. Quim. **28**: 480-482.

Pastenes, J. y col. 1984. Algunos antecedentes de biodisponibilidad de arsénico en suelos cultivados en el valle de Quillagua. Arch. Biol. Med. Exp. **17**: R-166.

Pastenes, J. y col. 1992. Arsenic incidence in the water-soils-plants system in Loa river course, Antofagasta -Chile. Proceedings Arsenic Environmental and its Incidence in Health. pp 21-27.

Pepper, Y. y col. 1988. El fosfato impide el efecto inhibitorio del arsénico pentavalente sobre el crecimiento de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.) Agricultura Técnica **48**: 325-330.

Peryea, F.J. 1991. Phosphate induced release of arsenic from soils contaminated with lead arsenate. Soils Sci. Soc. Amer. J. **55**: 1301-1306.

Pick, U. y Bassilian, S. 1982. Activation of magnesium ion specific adenosine triphosphatase in chloroplast coupling factor 1 by octylglucoside. Biochemistry **21**: 6144-6152.

Punz, W. y Sieghardt, H. 1993. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. Environ. Exp. Bot. **33**: 85-98.

Readdy, C.C. y col. 1981. Cadmium, methylmercury, mercury, and lead inhibition of calf liver glutathione S-transferase exhibiting selenium-independent glutathione peroxidase activity. Toxicol. Applied Pharmacol. **61**: 460-468.

Reay, P.F. 1972. The accumulation of arsenic from arsenic-rich natural waters by aquatic plants. *J. Appl. Ecol.* **9**: 557-565

Rosenstein, R. y col. 1992. Expression and regulation of the antimonite arsenite and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosum* plasmid pSX-267. *J. Bacteriol.* **174**: 3676-3683.

Rossman, T.G. y col. 1980. Absence of arsenate mutagenicity in *Escherichia coli* and chinese hamster ovary cell. *Environ. Mutagen* **2**: 371-379.

Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1978. *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company, Inc. Belmont, California pag 161.

Sancha, A.M. 1994. Arsénico en Chile: Contenidos naturales y contaminantes pp 150-167. IV Simposio sobre contaminación ambiental: Impacto ambiental de metales pesados en Chile. Santiago, Chile. Abril, 19-20.

Santa María, I. y col. 1986. Arsenic levels in Chilean marine species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**: 593-598

Scott, T. y Eagleson M. 1988 *Concise Encyclopedia Biochemistry*. 2° Ed. Walter de Gruyter (Berlin) 1988.

Shibata, Y. y col. 1992. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. *Adv. Biophys.* **28**: 31-80.

Sienko, M.J. y Plane, R.A. 1966. Química. pag 529. Ed. Aguilar S.A., sexta edición. Madrid, España

Silver, S. y Keach, D. 1982. Energy-dependent arsenate efflux: the mechanism of plasmid mediated resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 6114-6118.

Silver, S. y Misra, T.K. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. Annu. Rev. Microbiol. **42**: 717-743.

Silver, S. y col. 1989. Bacterial resistance ATPases: primary pump for exporting toxic cations and anions. TIBS **14**: 76-80.

Sinnott, E.W. y Wilson, K.S. 1955. Botany, Principles and Problems. McGraw-Hill Book Company, Inc.

Smith, H.A. y col. 1992. Cancer risks from arsenic in drinking water. Proceedings Arsenic Environmental and its Incidence in Health pag. 135-148.

Steffens, J.C. 1990. The heavy metal binding peptides of plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **41**: 553-575.

Tchernitchin, A. y Tchernitchin, N. 1991. Posibles efectos en la salud de la contaminación de aire, aguas y alimentos con arsénico en Chile. Rev. Chil. Nutr. **19**: 149-163.

Ullrich-Eberius, C.I. y col. 1989. Evaluation of arsenate and vanadate associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G 1. J. Exp. Botany **40**: 119-128.

Voet, D. y Voet, J. 1995. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. 2° Ed. New York, USA.

Walsch, L.M. y Keeney, D.R. 1975. Behavior and phytotoxicity of inorganic arsenicals in soil. In: Arsenicals pesticides, E. A. Woolson (ed.). Am. Chem. Soc., ACS Symposium 7, Washington, D.C. p. 35-52.

Walsh, L.M. y col. 1977. Occurrence and distribution of arsenic in soils and plant. Environ. Health Perspectives **19**: 67-71.

Wilkins, D.A. 1957. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. Nature **180**: 37-38.

Woolson, E.A. 1973. Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops. Weed Sci. **21**: 524-527.

Woolson, E.A. y Kearney, P.C. 1973. Persistence and reactions of ¹⁴C-cacodylic acid in soils. Environ. Sci. Technol. **7**: 47-50.

Woolson, E.A. 1977. Generation of alkylarsines from soil. Weed Sci. **25**: 412-416.

Wu, L. y Antonovics, J. 1976. Experimental ecological genetics in *Plantago*. II. Lead tolerance in *Plantago lanceolata* and *Cynodon dactylon* from roadside. *Ecology* **57**: 205-208.

Zucker, M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **40**: 779-784.