

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**  
**CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Variabilidad intraespecífica de *Tagetes minuta* L. en la  
acumulación de Plomo: Comparación de poblaciones con  
diferente historial de exposición.**

**Tesinista: Eliana Melisa Miranda Pazcel**

Firma:

**Directora: Dra. María Julieta Salazar**

Firma:

**Lugar de trabajo: Cátedra de Química General**

**Córdoba, Marzo 2017**



**Variabilidad intraespecífica de *Tagetes minuta* L. en la acumulación de Plomo:  
Comparación de poblaciones con diferente historial de exposición.**

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Dr. José Manuel Meriles

Firma: .....

Nombre y Apellido: Dra. Judith Hebelén Rodríguez

Firma: .....

Nombre y Apellido: Dra. Nacira Muñoz

Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: 22 de Marzo de 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por ser pública y brindarme el estudio de la Carrera de grado.

Agradezco a la Cátedra de Química General por brindarme el espacio y los recursos para desarrollar la tesina.

Agradezco al tribunal por las correcciones realizadas que contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo

A mi directora, Julieta, por enseñarme tanto y estar siempre presente en el trayecto.

A mí familia por estar, sobre todo a mis padres por darme la oportunidad de venir a estudiar a Córdoba y brindarme todo el apoyo necesario para hacerlo.

A mis amistades, por acompañarme en el camino y ser los que me desenchufan de lo académico.

Por último a la música, a esa batucada con la que me crucé un día y que quiero tanto, Batuqueando, por permitirme desconectar y disfrutar tanto bailando y tocando.

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.2. Objetivos</b> .....	3
1.2.1    Objetivo General .....	3
1.2.2    Objetivos específicos .....	4
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	4
<b>2.1. Obtención de semillas y suelos</b> .....	4
<b>2.2. Diseño experimental</b> .....	5
<b>2.3. Determinaciones</b> .....	6
2.3.1. Poder de extracción de los exudados radicales y concentración de Pb en raíz, tallo y hojas.....	6
2.3.2. Medición de parámetros químico-fisiológicos.....	7
2.3.2.1. Determinación de la capacidad férrica reductora del plasma (FRAP).....	8
2.3.2.2. Cuantificación de malondialdehído (MDA).....	9
2.3.2.3. Determinación de clorofilas y carotenos. ....	9
2.3.2.4. Determinación de azúcares solubles.....	10
2.3.2.5. Cuantificación de almidón.....	10
2.3.2.6. Cuantificación de proteínas.....	11
2.3.3. Análisis de la composición porcentual de compuestos volátiles .....	11
2.3.4. Análisis de los datos .....	12
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>3.1. Acumulación y traslocación de Pb individuo por individuo.</b> .....	13
<b>3.2. Análisis de la concentración de Pb y otros elementos en raíz, tallo y hoja y el poder de extracción de los exudados radicales.</b> .....	19
<b>3.3. Análisis de variables fisiológicas</b> .....	25
<b>3.4. Análisis de la composición porcentual de compuestos volátiles</b> .....	34
<b>3.5. Integración de los resultados</b> .....	41
<b>4. CONCLUSIÓN</b> .....	42
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	44

## 1. INTRODUCCIÓN

El suelo es, y ha sido a lo largo de la historia, un importante sumidero de contaminantes emitidos por las actividades humanas; pero al mismo tiempo puede actuar como fuente de contaminantes cuando interactúa con el agua, con el aire y con los seres vivos (Kabata Pendias, 2011; Mico y col., 2006). Esta relación con ambos roles, fuente y sumidero, entre el suelo y el resto de los compartimientos del ambiente hace que el estudio de la contaminación de los suelos sea de alta prioridad ya que la productividad de los mismos es fundamental para la supervivencia de la humanidad, y la contaminación puede comprometerla (Wienhold y col., 2004). La contaminación de los suelos por metales pesados resulta una de las formas de contaminación más importantes, debido a sus elevados tiempos de residencia. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados por ser elementos químicos, no pueden ser degradados. A esta característica de persistencia, se suma el hecho de que se acumulan a lo largo de las cadenas tróficas (bioacumulación y biomagnificación), con graves consecuencias sobre el ecosistema y la salud humana (Wu y col., 2010).

Entre los metales pesados más comunes que se encuentran como contaminantes del suelo, el plomo (Pb) es uno de los más tóxicos y frecuentes (Cecchi y col., 2008; Grover y col., 2010; Shahid y col., 2011). Este metal es ampliamente utilizado en varios procesos industriales y se da como un contaminante en todos los componentes ambientales. La prominencia de la contaminación ambiental de Pb es el resultado de su persistencia (Andra y col., 2009; Islam y col., 2008; Punamiya y col., 2010) y de sus numerosas fuentes, del presente y del pasado. Estas fuentes incluyen la fundición y la combustión de gasolina con Pb, o aplicaciones de medios contaminados con Pb al suelo (aguas residuales y fertilizantes) (Grover y col., 2010; Gupta y col., 2009; Piotrowska y col., 2009).

La contaminación del suelo con metales pesados implica medidas complejas y costosas, necesarias para poder continuar utilizando el suelo como recurso (Becerril Soto y col., 2007). En este contexto, la fitorremediación se presenta como una alternativa que contempla la conservación del suelo. En particular, la fitoextracción aprovecha el potencial de las plantas para acumular el contaminante en sus tejidos aéreos, tratándolos como residuos luego de la cosecha (Alvarez y Illman, 2006). Esta

tecnología emergente tiene muchas ventajas sobre las tradicionales técnicas de descontaminación, especialmente cuando las plantas utilizadas son nativas o no invasoras resultados favorables en términos de costo-beneficio, características de valor social y estético (Alvarez y Illman, 2006). El uso de plantas aromáticas, en lugar de cultivos comestibles no aromáticos, para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados es una técnica considerada sustentable, estética, segura toxicológicamente y ambientalmente amigable (Gupta y col., 2013).

*Tagetes minuta* L. es una planta anual, aromática, perteneciente a la familia de las Asteraceae, originaria de regiones templadas de América del Sur, la cual se caracteriza por una rica química de productos naturales y con aceites esenciales ampliamente utilizados en la cosmética, perfumería, como saborizante de alimentos y bebidas y además como medicina (Vasudevan y col., 1997).

Es importante destacar que estudios realizados por el grupo de trabajo en el cual se enmarca este estudio han reportado que *T. minuta* puede acumular Pb en determinadas condiciones (Cid y col., 2016; Salazar y Pignata, 2014; Salazar y col., 2016a; Salazar y col., 2016b). Sin embargo, los estudios realizados por Sosa y col. (2016) revelaron que el aceite esencial de *T. minuta* no presenta Pb incluso cuando sus hojas muestran concentraciones elevadas del metal, indicando la posibilidad de utilizarlo comercialmente de manera segura.

En los estudios citados sobre acumulación de Pb en *T. minuta* se encontró repetidamente una gran variabilidad de respuesta entre individuos. Con respecto a este resultado, la bibliografía sugiere que la exposición crónica a metales pesados puede ser un agente selectivo muy fuerte y estable para las poblaciones expuestas (Meyer y col., 2010), siendo éste un factor crucial en el campo de la fitorremediación (Küpper y col., 2007). Así esta exposición crónica puede resultar, en la emergencia de ecotipos de especies tolerantes (que previenen, disminuyen o reparan los efectos adversos del metal incorporado). Estas capacidades pueden surgir por aclimatación (desarrollo de la habilidad por la exposición del individuo), por adaptación (selección de generación en generación), y más frecuentemente, por ambos procesos (Meyer y col., 2010; Posthuma y col., 1993). Los antecedentes muestran que *T. minuta*, posiblemente responda mediante mecanismos de aclimatación o adaptación al Pb, hecho que se refleja en la

elevada capacidad de acumulación que presentan algunos individuos en sitios altamente contaminados (valores de Pb en suelo superiores a las 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Según lo expuesto, se propone como hipótesis que esta especie presenta, en la población previamente estudiada, individuos con mayor predisposición a la acumulación de Pb que otros, posiblemente asociada con cambios fisiológicos que aumenten la tolerancia al metal. Algunos de estos individuos pueden tener un perfil genético que les permita aclimatarse rápidamente a la condición extrema y así adaptar su fisiología a fin de tolerar el tóxico incorporado en sus tejidos, pudiendo en consiguiente acumularlo en mayor medida.

Por otro lado, el estado del arte muestra un déficit en el conocimiento de los procesos de incorporación de Pb en las plantas, así como de sus mecanismos de translocación en distintos órganos (Pourrut y col., 2011). En general, las plantas poseen sistemas de detoxificación ante el ingreso de metales tóxicos, los que incluyen la incorporación selectiva, procesos de excreción, formación de complejos con ligandos específicos y compartimentalización del tóxico (Gupta y col., 2010; Krzesłowska y col., 2010; Maestri y col., 2010). A su vez, la incorporación de Pb en plantas produce un aumento en la generación de radicales libres y por ende de estrés oxidativo, con los consiguientes problemas fisiológicos derivados (Gupta y col., 2009; Sharma y col., 2012). En plantas acumuladoras, tanto los sistemas detoxificantes como los de excreción/compartimentalización de metales pesados deberían funcionar acoplados, a fin de explicar que existan individuos capaces de acumular grandes cantidades de Pb en tejidos aéreos (Szczydowska y col., 2013). Por lo anteriormente expuesto se plantea una segunda hipótesis: los parámetros fisiológicos relacionados con la detoxificación de radicales libres generados por estrés oxidativo en plantas, están modificados en los individuos que acumulan elevadas cantidades de Pb.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Estudiar la variabilidad intra-específica de parámetros físico-químicos y fisiológicos de *T. minuta* en relación a la acumulación de Pb.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la exposición crónica a suelos contaminados con Pb en la capacidad de acumulación del tóxico por parte de *T. minuta*.
- Identificar los factores o características propias de *T. minuta* asociados a su capacidad para la acumulación de Pb.
- Estudiar los procesos fisiológicos que median la incorporación y translocación de Pb en tejidos vegetales.
- Analizar la composición química de los aceites esenciales (compuestos volátiles) en relación a la acumulación de Pb.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Obtención de semillas y suelos

Se utilizaron semillas de *Tagetes minuta* L. recolectadas a campo a partir de dos poblaciones diferentes. Una de las poblaciones cuenta con un historial de 30 años de exposición a suelos contaminados con Pb, mientras que la otra no. La primera de las poblaciones corresponde a la localidad de Bouwer, 18 km al sur de la ciudad de Córdoba. La segunda corresponde a un sitio no contaminado, la localidad de Intiyaco, situada a 80 km al Suroeste de la ciudad de Córdoba. Estas semillas fueron esterilizadas con NaClO al 1% mediante agitación manual durante 10 minutos, luego se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se germinaron sobre papel de filtro humedecido con agua destilada, en cápsulas de Petri durante 4 días en oscuridad y en cámaras de cultivo. Finalmente, las plántulas con al menos un par de hojas verdaderas, fueron trasladadas a suelo en macetas.

Los suelos en los que crecieron las plantas fueron extraídos de la localidad de Bouwer, de un sitio contaminado por una fundición recicladora de plomo a partir de baterías ácidas agotadas. Dicha industria operó desde el año 1984 hasta el año 2005 de manera irregular (Salazar y Pignata, 2014). También se recolectó suelo en la misma localidad pero fuera del área contaminada, es decir de un sitio control. Éste presenta los valores naturales de Pb en suelo. Las características de los suelos utilizados se presentan en la Tabla 1.



Tabla 1. Características generales de los suelos utilizados en el experimento.

Variable	Suelo Control	Suelo Contaminado
Ph	6,5±0,1	6,7±0,1
Conductividad Eléctrica ( $\mu\text{s cm}^2$ )	64±3	72±5
Materia orgánica (%)	9±1	8,5±0,8
Relación Carbono:Nitrógeno (%)	9,5±0,1	8,9±0,1
Pb I ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	21±2	168±6
Pb II ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,6±0,1	311±17
Pb III ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	5±2	734±5
Pb Pseudototal ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	27±1	1212±13

Pb I: Concentración de Pb en suelo en la fracción móvil (o intercambiable); Pb II: Concentración de Pb en suelo en la fracción movilizable (o acomplejada, adsorbida, y en forma de carbonatos); Pb III: Concentración de Pb en suelo en la fracción residual (resto de los metales). Pb I, Pb II y Pb III fueron determinados mediante la técnica de extracción secuencial de tres pasos (Maiz y col., 1997). Pseudototal es la sumatoria de Pb I, II, III, a su vez, hace referencia a que se utilizó ácido nítrico puro para la extracción por lo que existe la posibilidad de que no se haya extraído el Pb asociado a silicatos.

Antes de la recolección se quitó cualquier cubierta vegetal u objeto extraño de la superficie, y se tomaron únicamente los primeros 15 cm de suelo. Una vez en el laboratorio se tamizó con malla de 2 mm y homogeneizó.

## 2.2. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en macetas tipo parcela (amplia superficie) simulando las condiciones silvestres. En cada maceta crecieron simultáneamente 25 individuos. Se trabajó con un total de 4 macetas con suelo contaminado para cada población (con historial de exposición y sin historial) y 1 maceta más por población con suelo control. Trabajando así con un total de 250 individuos al inicio del experimento.

El estudio se realizó bajo condiciones controladas en invernadero. Las plantas fueron identificadas numéricamente desde el comienzo para trazar sus resultados a nivel individual.

La recolección de muestras y cosecha de las plantas se realizó al comenzar el proceso de floración. En primer lugar, con las plantas en pie, se colectaron 6 hojas de cada planta que se conservaron en freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para luego realizar determinaciones

de parámetros fisiológicos y compuestos aromáticos. Posteriormente, las plantas completas fueron retiradas del suelo y trasplantadas a medio líquido por 24 hs para tomar muestras de exudados radicales y evaluar el potencial de extracción de Pb de los mismos de acuerdo a la metodología de Salazar y col. (2016b). Finalmente, se separaron hojas, tallos y raíces para determinar en el laboratorio la biomasa seca producida y la concentración de Pb y otros metales en los tres órganos.

## **2.3. Determinaciones**

### **2.3.1. Poder de extracción de los exudados radicales y concentración de Pb en raíz, tallo y hojas.**

Los exudados radicales fueron recolectados según Salazar y col. (2016b) con leves modificaciones. Para ello la planta completa fue colocada en un tubo depositando el sistema radical en 50 mL de agua corriente. Luego de 24 hs se retiró la planta y lavando las raíces se restauró el volumen de 50 mL con agua corriente. Esta muestra de exudados es una solución de los mismos. Para evaluar el poder de extracción de Pb que tienen los exudados se cuantificó la cantidad de Pb potencialmente extraíble en suelos contaminados a partir de ser mezclados con el suelo contaminado. Esta prueba también fue realizada con una muestra de agua corriente. La diferencia entre la cantidad de Pb extraída por el agua y por cada muestra de exudado fue registrada como “el poder de extracción de los exudados relativo al agua”, pudiendo arrojar valores tanto positivos como negativos. Con este propósito se tomaron 15 mL de exudados y se los mezcló con 1 g de suelo del sitio contaminado, la mezcla fue agitada a temperatura ambiente por 6 horas, luego centrifugada y finalmente el sobrenadante fue filtrado (Papel de filtro cuantitativo, Filtrak 391, marca Munktell, Alemania). Dicho sobrenadante fue conservado para posteriormente cuantificar el contenido de Pb y otros elementos por fluorescencia de rayos X, reflexión total (T-XRF), en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron en Campinas, Brasil (LNLS) de la misma forma en que se explica para las muestras vegetales a continuación.

Al retirar las plantas del tubo colector de exudados, las mismas fueron separadas en raíz, tallo y hojas. Las muestras fueron guardadas en bolsas de papel y llevadas a

secar en estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante, dicho valor fue registrado como biomasa seca producida por órgano por planta.

Posteriormente las muestras fueron molidas y homogeneizadas con molinillo eléctrico. Se tomó una alícuota de 0,1 g de materia seca y se la digirió utilizando 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> puro (Salazar y col., 2016b). Luego de 72 hs de digestión la muestra fue filtrada (Papel de filtro cuantitativo, Filtrak 391, marca Munktell, Alemania).

La cuantificación de metales pesados se llevó a cabo de acuerdo a trabajos previos del equipo de investigación (Wannaz y col., 2011). Para ello, las muestras filtradas, tanto de plantas como de exudados, fueron adicionadas con un estándar interno de Ga para alcanzar una concentración final del mismo de 10 µg g<sup>-1</sup>. Una gota de 7 µL de la muestra fue sembrada en el centro de un soporte acrílico para ser analizada por la técnica T-XRF en el LNLS. También se prepararon muestras a partir de soluciones estándar de Cu, Pb, Zn, Fe, y Mn, como así también blancos, todas ellas marcadas con el estándar interno de Ga, para calibrar el equipo de medición. Las muestras fueron medidas durante 200 segundos, utilizando la línea de fluorescencia de rayos X montada con la disposición de reflexión total. Se utilizó un haz incidente policromático de aproximadamente 5 mm de ancho y 0,1 mm de alto para la excitación de la muestra. Para la detección de la fluorescencia de rayos X se utilizó un detector Si (Li) con una resolución de energía desde 165 eV hasta 5,9 keV.

Para tener un control de calidad de las mediciones de metales pesados no sólo se prepararon blancos y soluciones estándar (curva de calibración) sino que también se trabajó con material certificado de referencia: Oriental Tobacco Leaves (CTA-OTL-1, ICTJ) y CRM281 (rye-grass, European Commission/BCR). Estas muestras fueron procesadas y analizadas de la misma manera que las muestras del experimento, encontrando que los valores medidos están dentro de un rango definido por ±3,5% del valor certificado.

### 2.3.2. Medición de parámetros químico-fisiológicos.

Con el propósito de estudiar la capacidad antioxidante de cada planta frente al estrés oxidativo se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos partiendo de una extracción alcohólica única que es común a las técnicas usadas en cada parámetro

fisiológico. Para ello, se utilizaron las hojas que estaban conservadas en freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron muestras de 100 mg por individuo, las cuales fueron molidas con nitrógeno líquido, homogeneizadas con 1500  $\mu\text{L}$  de alcohol etílico al 80 % v/v calidad pro-análisis y posteriormente centrifugadas a 14000 RPM durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El extracto obtenido fue utilizado inmediatamente para realizar distintas determinaciones fisiológicas siguiendo el esquema de la figura 1.

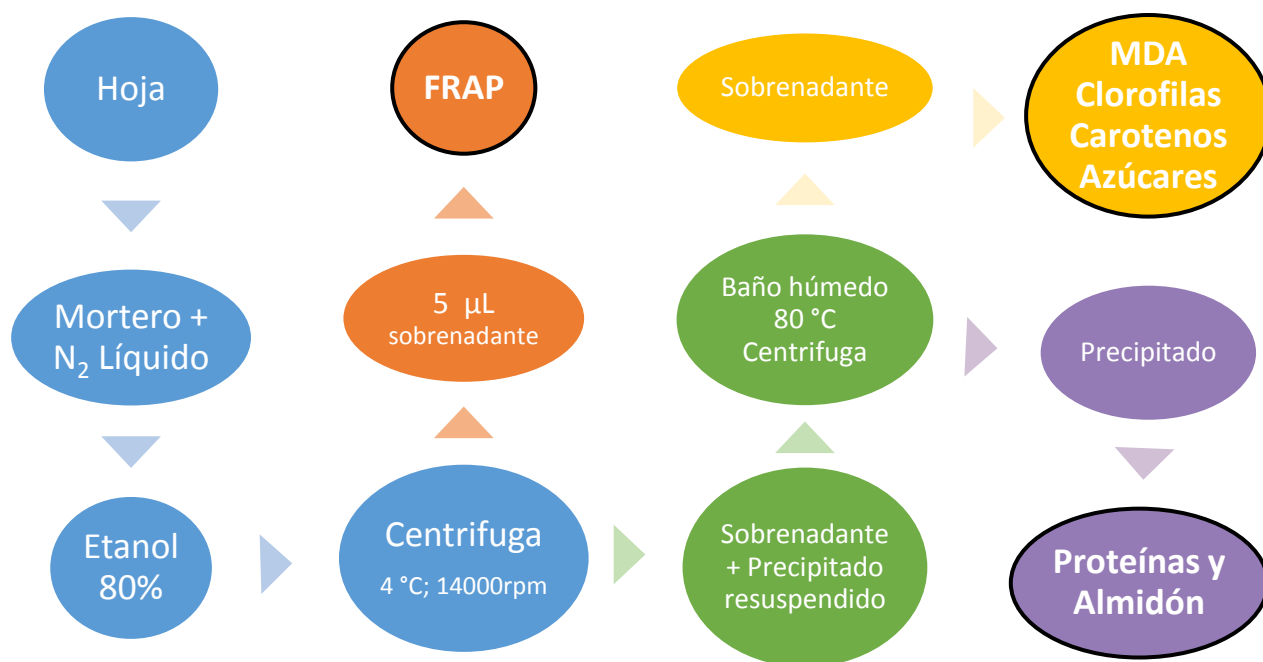


Figura 1. Representación esquemática de los pasos generales a seguir para realizar las determinaciones fisiológicas

### 2.3.2.1. Determinación de la capacidad férrica reductora del plasma (FRAP).

Esta determinación indica el poder reductor total no enzimático, es decir la suma de los compuestos de bajo peso molecular en su estado reducido. Una mayor cantidad de estos compuestos en estado reducido se relaciona con una mayor capacidad de defensa antioxidante (Parola, 2016).

Con el fin de cuantificar FRAP se procedió según Robert y col. (2014), para la cual se tomó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  del primer sobrenadante (Fig. 1), que fue mezclada con 145  $\mu\text{L}$  de etanol 80 % y 150  $\mu\text{L}$  de buffer reactivo en una microplaca de 96-well. El

buffer reactivo fue preparado en el momento, mezclando 5 mL de buffer acetato de Na 0,3 M pH 3,6; 0,5 mL de TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, marca Sigma-Aldrich) 10 mM en HCl 40 mM y 0,5 mL de FeCl<sub>3</sub> 200 mM.

La placa fue incubada en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se realizó la lectura por espectrofotometría a 600 nm (Thermo Scientific Multiskan Spectrum). Se preparó una curva estándar de Trolox para determinar FRAP en las muestras expresándose los resultados como equivalentes de Trolox.

### 2.3.2.2. Cuantificación de malondialdehído (MDA).

El extracto remanente fue vortereado con la finalidad de resuspender el precipitado, luego se lo llevó a baño húmedo de 80 °C por 20 minutos, se lo dejó enfriar y se centrifugó a 14000 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante fue empleado en la determinación de MDA, como así también de clorofilas, carotenos y azúcares solubles (figura 1). El precipitado se llevó a estufa hasta secarse para luego realizarle determinaciones de proteínas y almidón en él.

La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó de acuerdo a Heath y Packer (1968), para esto se tomó una fracción de 200 µL del extracto vegetal y se le agregó 200 µL de reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % y ácido tricloroacético (TCA) 20%). La mezcla se llevó a baño húmedo a 80 °C durante 20 minutos, luego se la centrifugó a 14000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente y por último se enfrió en hielo para después realizar la lectura mediante espectrofotometría en microplaca a 532 nm y 600 nm. La concentración de MDA se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$[MDA] = (Abs_{532} - Abs_{600}) / (\epsilon \cdot l)$$

Donde Abs indica la absorbancia registrada a la longitud de onda indicada en el subíndice,  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar del MDA que vale 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, l es el paso óptico del well de la microplaca (0,82 cm cuando tiene 300 µL de volumen).

### 2.3.2.3. Determinación de clorofilas y carotenos.

Con el propósito de determinar el contenido de clorofilas a, b, totales y carotenos, se tomó una alícuota de 15 µL del sobrenadante y se agregó 285 µL de alcohol 80 % para luego leer en microplaca en el espectrofotómetro a 470 nm (carotenos), 654nm

(clorofilas totales), 645nm (clorofila b) y 663nm (clorofila a). Para los cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas (Lichtenthaler, 1987; Palta, 1990):

$$Cl_{Tot} = (1000 \cdot Abs_{654}) / (39,8 \cdot l)$$

$$Cl_a = (13,36 \cdot A_{663}/l) - (5,19 \cdot A_{645}/l)$$

$$Cl_b = (27,43 \cdot A_{645}/l) - (8,12 \cdot A_{663}/l)$$

$$Carotenos = \left( 1000 \cdot \frac{Abs_{470}}{l} - 2,13 \cdot Cl_a - 97,64 \cdot Cl_b \right) / 209$$

Donde Cl significa concentración de Clorofila y el subíndice indica sí se trata de clorofilas totales, a o b. Abs significa absorbancia y el subíndice la longitud de onda en la que fue leída, y l es el paso óptico del well de la microplaca (0,82 cm cuando hay 300  $\mu$ L).

#### 2.3.2.4. Determinación de azúcares solubles.

Para la cuantificación de azúcares solubles se utilizó el resto del sobrenadante vegetal, siguiendo el protocolo de Leyva y col. (2008), tomando una alícuota de 15  $\mu$ L a la que se le agregó 135  $\mu$ L de alcohol etílico 80 % y 450  $\mu$ L de reactivo de antrona (antrona 0,2 % p/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). También se preparó una curva estándar de glucosa que fue tratada de la misma forma que las muestras. A continuación, las muestras y la curva fueron incubadas durante 10 minutos a 4 °C y luego fueron llevadas a baño de 80 °C por 30 minutos. Por último, se los dejó enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos para después leer en el espectro de absorbancia por duplicado a 620 nm.

#### 2.3.2.5. Cuantificación de almidón.

El precipitado del extracto fue secado, pesado (obtención del valor de peso seco utilizado) y luego dividido en dos partes iguales para realizar las determinaciones de almidón en una mitad y proteínas en la otra.

Con respecto al contenido de almidón, este fue determinado a partir de azúcares reductores (Arias y col., 2003) liberados después de una hidrólisis realizada con la enzima amiloglucosidasa (E.C 3.2.1.3). Se resuspendió la fracción insoluble del precipitado 1/2 (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada y fue llevada a incubación a 100 °C durante 30 minutos para gelatinizar el almidón. Después las muestras fueron digeridas con 76 U de

amiloglucosidasa disuelta en tampón acético-acetato 200 mM pH 4,6 cada 0,25 g de peso fresco, a 55 °C durante toda la noche, y finalmente se centrifugaron a 1200 g por 10 minutos. A continuación, se preparó el reactivo de Sumner mezclando 8,8 mL de H<sub>2</sub>O, 0,8 mL de NaOH 2 N, 1,76 g de tartrato de Na y K tetrahidratado y 0,04 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se tomó una alícuota de 30 µL que se mezcló con 250 µL del reactivo de Sumner y 30 µL de H<sub>2</sub>O. Siguiendo los mismos pasos que para las muestras se preparó una curva de calibración de glucosa. Las muestras y la curva se llevaron a ebullición por 5 minutos, luego se les agregó 300 µL de H<sub>2</sub>O y finalmente se midieron en espectrofotómetro los valores de absorbancia a 550 nm (Parola, 2016).

#### 2.3.2.6. Cuantificación de proteínas.

La mitad restante del pellet fue utilizada para determinar proteínas a partir del protocolo de Lowry modificado (Lowry y col., 1951). Se resuspendió el mismo con 750 µL de H<sub>2</sub>O destilada, se le agregó dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%. Luego se lo hirvió durante 5 minutos y centrifugó a 14000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota de 10 µL del sobrenadante y se le agregaron 70 µL de agua y 800 µL de reactivo ABC preparado en el momento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 %, NaOH al 0,1 % y SDS al 1 %, Tartrato de sodio potasio al 1 %, CuSO<sub>4</sub> al 1 %). Pasados 15 minutos exactos se detuvo la reacción añadiendo 32 µL del compuesto Folling y luego de 10 minutos se realizaron las lecturas en espectrofotómetro a 578 nm refiriendo estos valores a una curva de calibración de suero de Albúmina Bobina (BSA).

#### 2.3.3. Análisis de la composición porcentual de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles fueron analizados mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) siguiendo la metodología de Sosa y col. (2016).

La técnica SPME se basa en la extracción de compuestos que están inmersos en una matriz mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, que en la mayoría de los casos se trata de un polímero, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico.

Para la realización de esta técnica se colocaron 100 mg de material fresco en un vial de 10 mL, el cual se cerró herméticamente y se colocó en un baño de agua a 40 °C por 10 minutos. Posteriormente se introdujo en el vial una fibra de polidimetilsiloxano

(PDMS, 100  $\mu\text{m}$  de espesor), obtenida de Supelco Inc., la cual se expuso durante 30 minutos manteniendo la temperatura constante a 40  $^{\circ}\text{C}$  (Vázquez y col., 2011). Una vez transcurrido el tiempo de exposición las sustancias extraídas por la fibra fueron térmicamente desorbidas a 250  $^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min, en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer) acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer según Vázquez y col. (2011). La identificación de las sustancias se realizó por comparación de los espectros obtenidos con los provisto por las bibliotecas NIST 2,0 y WILEY 7n.

#### 2.3.4. Análisis de los datos

Con los datos recabados sobre acumulación se calcularon los siguientes factores indicadores de la eficiencia fitoextractiva del contaminante para cada muestra:

- Factor de Traslocación “FT”: es la relación entre la concentración de Pb en raíces y parte aérea (Bu-Olayan y Thomas, 2009).

$$FT = C_{\text{aérea}} / C_{\text{raíz}}$$

Las concentraciones de Pb fueron medidas por separado en tallos y hojas, por lo que para obtener el dato de la concentración de Pb en la parte aérea de las plantas, la concentración medida en hojas y tallos se multiplicó por la biomasa total de cada órgano. Estas masas de Pb se sumaron entre sí y el resultado se dividió por la biomasa total de los órganos aéreos (Salazar y Pignata, 2014):

$$C_{\text{aérea}} = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}})$$

Dónde: C significa concentración en la parte de la planta indicada en el subíndice; y BioM es la biomasa correspondiente a la parte de la planta indicada en el subíndice.

- Factor de Transferencia Total “FTT”: el mismo se basa en la masa del metal que se trasloca desde la raíz a la parte aérea. Se calcula de la siguiente manera (Salazar y col., 2016a):

$$FTT = (\text{BioM}_{\text{hoja}} \times C_{\text{hoja}} + \text{BioM}_{\text{tallo}} \times C_{\text{tallo}}) / (\text{BioM}_{\text{raíz}} \times C_{\text{raíz}})$$

Para la interpretación de los datos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), corroborando previamente el cumplimiento de los supuestos mediante el uso de



Infostat acoplado a R. También se hicieron análisis de correlación de Pearson entre las diversas variables y análisis de componentes principales.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Acumulación y traslocación de Pb individuo por individuo.**

La figura 2 muestra las concentraciones de Pb en hoja y la biomasa seca de hoja de cada individuo para ambas poblaciones, ordenados de izquierda a derecha de manera creciente según la concentración de Pb. Si bien la mayoría de los individuos de ambas poblaciones presentan concentraciones de Pb en el mismo rango, Bouwer incluyó un individuo (520) con un valor elevado (entre 4 y 20 veces más que el resto) lo cual no se encontró para la población de Intiyaco. En la figura se puede destacar que la mayoría de los individuos a la derecha presentan biomasa bajas en comparación a los de la izquierda, indicando que la incorporación de Pb puede reducir la biomasa, aunque se encontraron algunas excepciones para la población de Bouwer. Para los individuos de Bouwer que acumularon más de  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  de Pb en hoja, la biomasa fue superior a 1,5 g, mientras que para los individuos de Intiyaco en esa condición la biomasa no supero el valor de 0,5 g. Esto muestra que existe una capacidad solo en algunos individuos de acumular el metal sin dejar de producir biomasa.

La figura 3 muestra las concentraciones de Pb en tallo y la biomasa seca de tallo de cada individuo para ambas poblaciones, ordenados de izquierda a derecha de manera creciente según la concentración de Pb. Para el caso de Pb y biomasa en tallo, ambas poblaciones tuvieron resultados similares, habiendo un único individuo, de Intiyaco, que se destacó por tener al mismo tiempo la mayor cantidad de biomasa y la concentración de Pb más alta, aunque esta última variable no fue muy superior al más elevado de Bouwer.

La figura 4 muestra las concentraciones de Pb en raíz y la biomasa seca de raíz de cada individuo para ambas poblaciones, ordenados de izquierda a derecha de manera creciente según la concentración de Pb. Para el caso de Pb y biomasa en raíz, ambas poblaciones tuvieron resultados similares.

En la figura 5 se presentan las extracciones totales de Pb en cada órgano en barras apiladas, ya que la suma representa la extracción total por planta, los individuos fueron

ordenados de izquierda a derecha de manera creciente en función de la extracción total por planta. También están indicados en la figura los factores de traslocación (FT) y de transferencia total (FTT) de Pb de cada individuo. Ambas poblaciones mostraron individuos que extraen desde muy poco Pb (cerca de 30  $\mu\text{g}$  Pb por planta) hasta mucho (1000  $\mu\text{g}$  Pb por planta). La población de Intiyaco contó con un individuo muy eficiente, dada su combinación de una elevada concentración de Pb en tallo y una alta producción de biomasa en el mismo órgano, se trata del individuo 668, con una extracción total por planta que se sale de la escala del gráfico y alcanza los 4350  $\mu\text{g}$  de Pb por planta. Los individuos que superaron una eficiencia de extracción de 500  $\mu\text{g}$  de Pb por planta mostraron, en ambas poblaciones una variación superior en los factores de traslocación y transferencia total. Es decir que por debajo de ese umbral la especie mantiene un rango relativamente predecible para sus procesos de traslocación a la parte aérea, siendo más estable en la población de Bouwer que en la de Intiyaco; mientras que cuando se supera, algunos individuos mantienen la traslocación y otros la limitan. Para la población de Bouwer, los casos en que el proceso de traslocación se mantuvo, la mayor cantidad de Pb en la parte aérea se acumuló en la hoja (individuos 508 y 504). Para la población de Intiyaco, los casos en que el proceso de traslocación se mantuvo, la mayor cantidad de Pb en la parte aérea se acumuló en la tallo (individuos 471, 474, 662, 666 y 668).

Figura 2. Concentración de Pb y biomasa seca en hoja de cada individuo en las poblaciones de A. Bouwer y B. Intiyaco. Los individuos están ordenados de izquierda a derecha de manera creciente para la concentración de Pb.



Figura 3. Concentración de Pb y biomasa seca en tallo de cada individuo en las poblaciones de A. Bouwer y B. Intiyaco. Los individuos están ordenados de izquierda a derecha de manera creciente para la concentración de Pb.

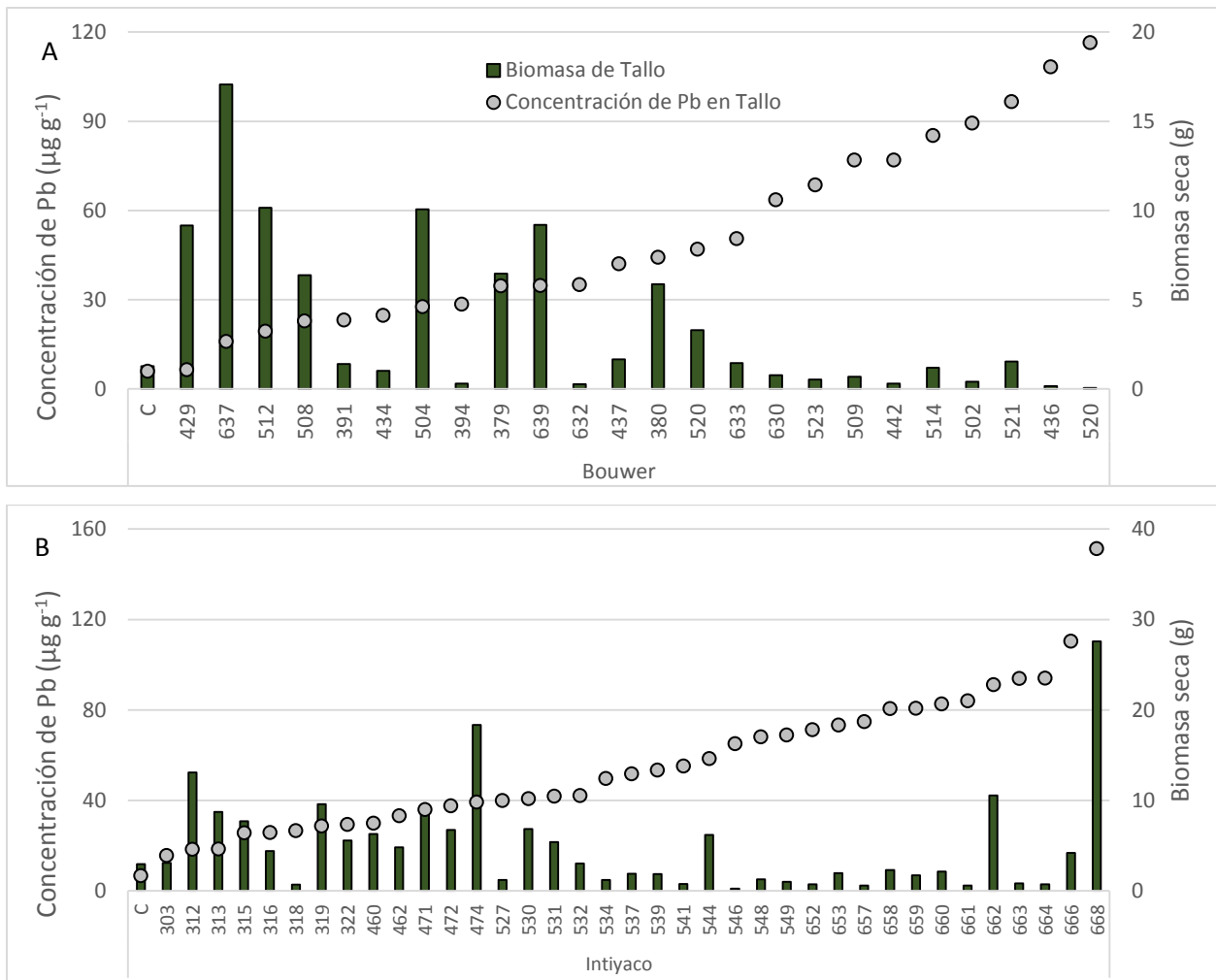


Figura 4. Concentración de Pb y biomasa seca en raíz de cada individuo en las poblaciones de A. Bouwer y B. Intiyaco. Los individuos están ordenados de izquierda a derecha de manera creciente para la concentración de Pb.

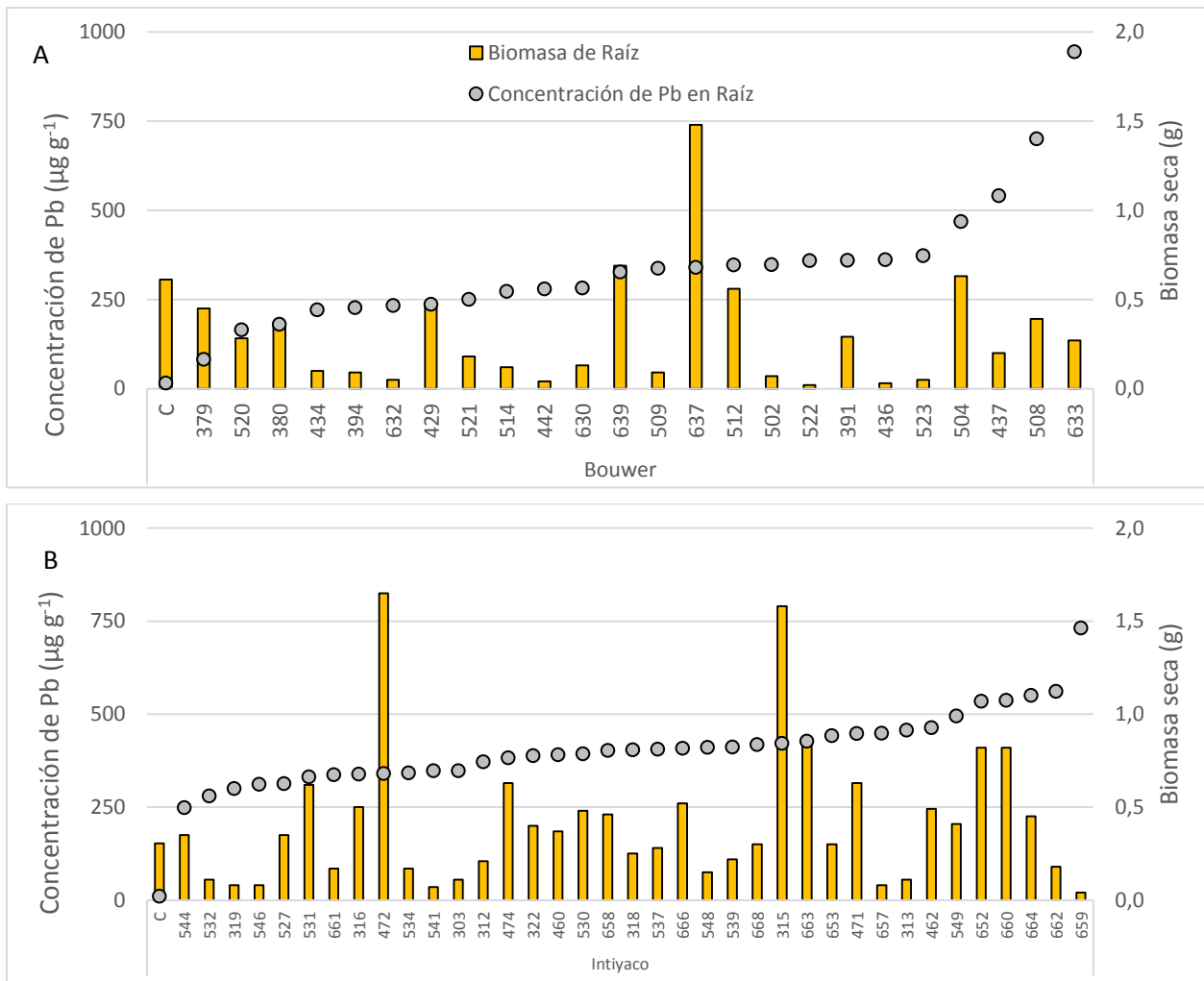
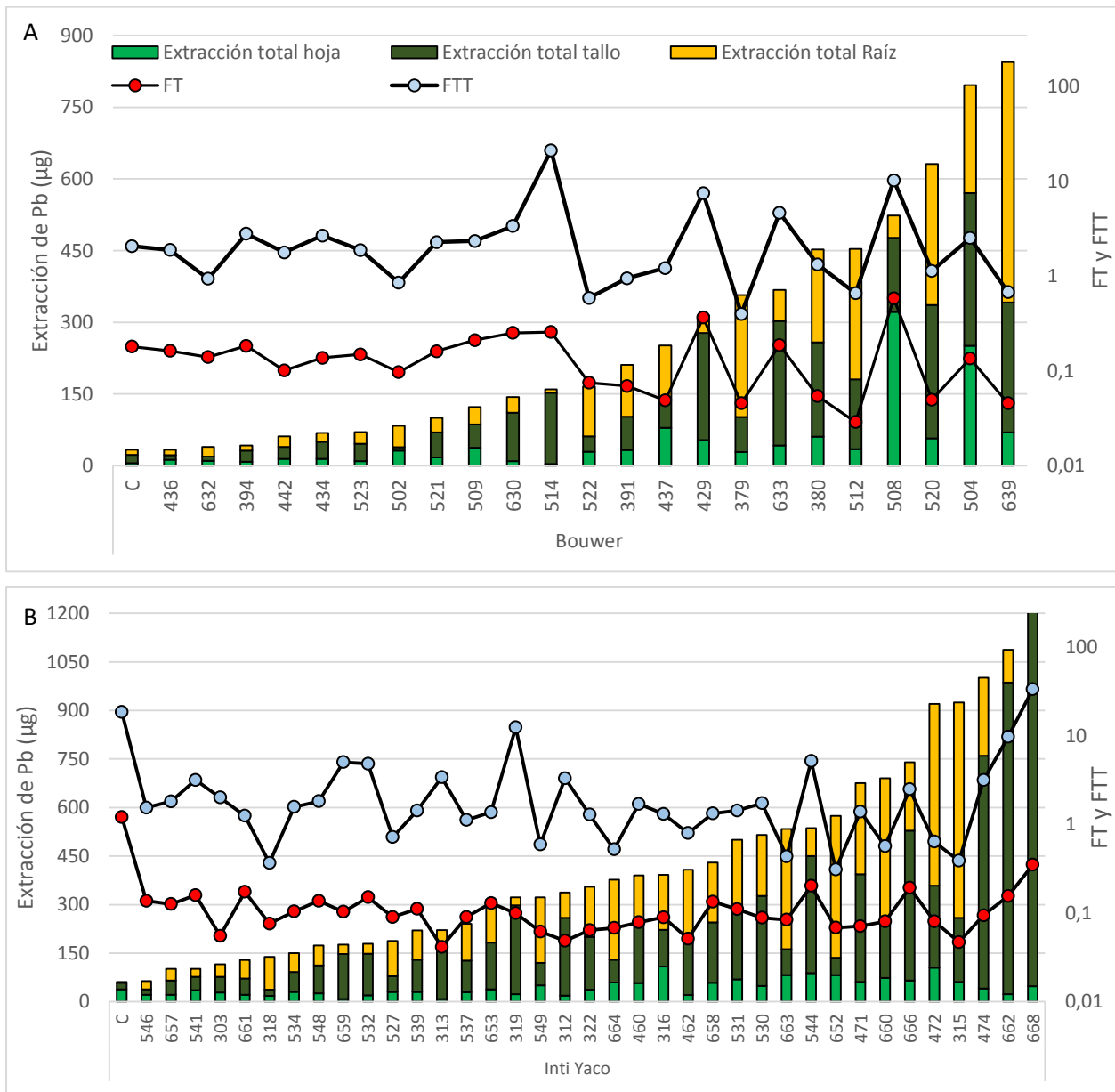


Figura 5. Extracción total de Pb por órgano y por planta, y factores de traslocación (FT) y transferencia total (FTT) de Pb de cada individuo en las poblaciones de A. Bouver y B. Intiyaco. Los individuos están ordenados de izquierda a derecha de manera creciente para extracción total de Pb por planta. La escala del eje en el que se representan FT y FTT es logarítmica en base 10. La línea que une los puntos que representan a FT y FTT no indica una continuidad entre un dato y otro sino que simplemente pretende destacar el incremento de la variabilidad de los factores a medida que aumenta la extracción total.



### **3.2. Análisis de la concentración de Pb y otros elementos en raíz, tallo y hoja y el poder de extracción de los exudados radicales.**

La tabla 2 incluye los datos de supervivencia, biomasa y variables relacionadas a la acumulación de Pb para las dos poblaciones de *T. minuta* estudiadas cuando crecieron en suelo control y contaminado, también incluye los resultados del ANOVA comparando esos cuatro tratamientos.

Los individuos tuvieron una supervivencia alta, la máxima fue de 90% en plantas de Intiyaco cuando crecieron en suelo contaminado y de 86% en suelo control, valores muy cercanos. Por su parte, los individuos originarios de Bouwer presentaron diferencias, siendo mayor la supervivencia en suelo control, con un 87%, en contraste con suelo contaminado de 67%. A diferencia de todas las otras variables presentadas en la tabla 2 para las cuales la unidad muestral fue el individuo, la supervivencia se determinó en términos de porcentaje para cada maceta. Es por esto que los tratamientos llevados a cabo con suelo control no presentan desvíos y no participaron del ANOVA.

La biomasa de hoja y tallo mostró diferencias estadísticamente significativas sólo para la población de Bouwer, siendo mayor cuando creció en suelo contaminado. La biomasa de raíz no mostró diferencias significativas.

También se puede ver que no hubo diferencias significativas en la concentración de Pb en hoja para las distintas poblaciones y suelos, sí las hubo para los casos de tallo y raíz, siendo mayor cuando las plantas crecieron en suelo contaminado para ambas poblaciones. A su vez los valores en raíz son los más altos debido a que este órgano es el primer impedimento para la translocación del metal desde los suelos (Blaylock y Huang, 2000).

Teniendo en cuenta la concentración de Pb en la parte aérea, la misma es mayor en suelos contaminados que en suelos control, como es de esperar, pero sin diferencia según población de origen. Lo mismo ocurrió para la concentración media de Pb en toda la planta.

Los valores de extracción total de Pb muestran que la mayor cantidad de plomo está acumulada en la raíz y el tallo, habiendo diferencias significativas entre suelo control y contaminado.

El poder de extracción de los exudados relativo al agua no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2. Supervivencia, biomasa (BM), concentración, extracción neta (ET), factor de traslocación (FT) y de transferencia total (FTT) de Pb en los diferentes órganos y poder de extracción de Pb de los exudados (PEE). Valores medios, errores estándar y ANOVA comparando entre poblaciones cuando crecen en suelos contaminados y control, tomando a cada individuo como réplica.

	Bouwer		Intiyaco		ANOVA (p)
	Suelo Contaminado	Suelo Control	Suelo Contaminado	Suelo Control	
<b>Supervivencia (%)</b>	67 ± 12b	87,5	90 ± 4 a	86	0,0286
<b>BM<sub>Hoja</sub> (g/planta)</b>	1,6 ± 0,3 a	0,8 ± 0,3 b	1,9 ± 0,2 a	1,7 ± 0,4 a	0,04
<b>BM<sub>Tallo</sub> (g/planta)</b>	3,7 ± 0,9 a	1,3 ± 0,8 b	5,0 ± 0,7 a	2,9 ± 1,4 a	0,05
<b>BM<sub>Raíz</sub> (g/planta)</b>	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	ns
<b>Pb<sub>Hoja</sub> (µg/g PS)</b>	28 ± 3	24 ± 3	28 ± 2	22 ± 4	ns
<b>Pb<sub>Tallo</sub> (µg/g PS)</b>	47 ± 7 a	6 ± 1 b	56 ± 5 a	7 ± 1 b	0,0001
<b>Pb<sub>Raíz</sub> (µg/g PS)</b>	354 ± 29 a	15 ± 2 b	409 ± 22 a	10 ± 3 b	0,0001
<b>Pb<sub>Parte aérea</sub> (µg/g PS)</b>	38 ± 4 a	13 ± 1 b	47 ± 3 a	13 ± 1 b	0,0001
<b>Pb<sub>Planta</sub> (µg/g PS)</b>	59 ± 5 a	13 ± 1 b	71 ± 4 a	13 ± 1 b	0,0001
<b>ET<sub>Hoja</sub> (µg/planta)</b>	43 ± 8 a	20 ± 6 b	45 ± 6 a	39 ± 7 a	0,0238
<b>ET<sub>Tallo</sub> (µg/planta)</b>	111 ± 36 a	9 ± 3 b	188 ± 28 a	17 ± 4 b	0,0001
<b>ET<sub>Raíz</sub> (µg/planta)</b>	115 ± 32 a	6 ± 3 b	170 ± 24 a	4 ± 3 b	0,0001
<b>ET<sub>Planta</sub> (µg/planta)</b>	269 ± 64 a	35 ± 8 b	390 ± 49 a	45 ± 9 b	0,0001
<b>PEE<sub>Pb</sub> (µg/g)</b>	-0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,3	1,5 ± 0,7	ns
<b>FT<sub>Pb</sub></b>	0,1 ± 0,02 b	1,1 ± 0,2 a	0,1 ± 0,01 b	2,2 ± 0,5 a	0,0001
<b>FTT<sub>Pb</sub></b>	2,2 ± 0,3 c	11 ± 2 b	2,0 ± 0,3 c	32 ± 7 a	0,0001

BM: biomasa en la parte de la planta indicada en el subíndice. Pb: Concentración de Pb en la planta indicada en el subíndice. ET: Extracción total en la planta indicada en el subíndice. PEE<sub>Pb</sub>: Poder de extracción de Pb de los exudados. FT<sub>Pb</sub>: Factor de traslocación de Pb. FTT<sub>Pb</sub>: Factor de transferencia total de Pb. Letras diferentes indican diferencias significativas con p<0,05.

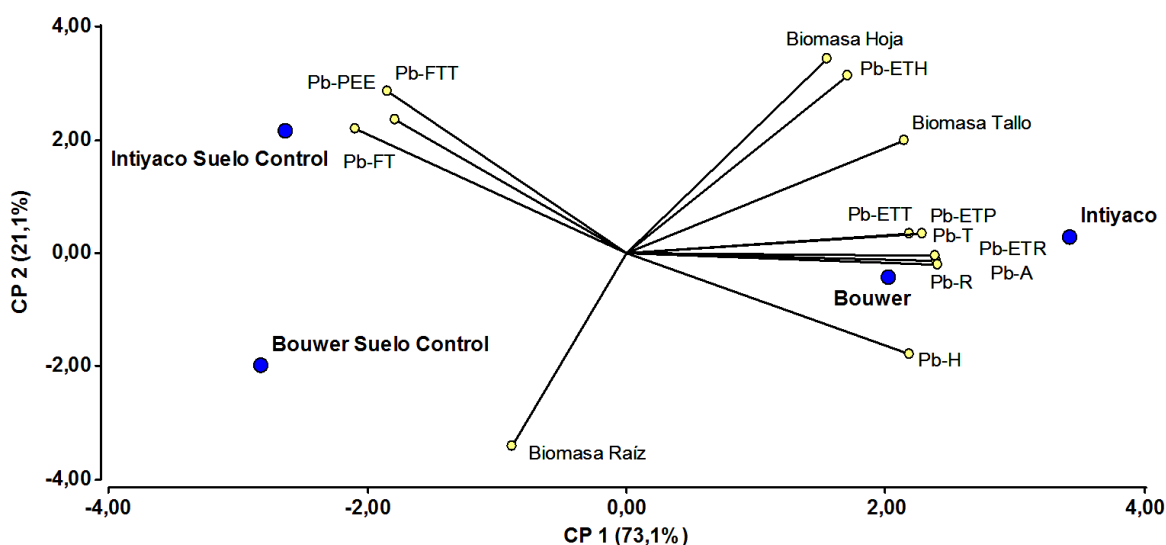
Tanto el factor de traslocación como el de transferencia total de Pb fueron superiores en las plantas que crecieron en suelo control comparado a las que crecieron en suelo contaminado, mostrando que ambas poblaciones tienen mayor transferencia y traslocación cuando no están expuestas, siendo mayores los valores encontrados en la



población de Intiyaco. Reafirmando la tendencia de este metal a permanecer en la raíz (Kabata Pendias, 2011).

La figura 6 muestra un análisis multivariado de componentes principales que integra todas estas variables mencionadas. El PCA muestra que las poblaciones tienen un comportamiento parecido, y que es únicamente la exposición a suelos contaminados con Pb lo que genera mayores diferencias en estas variables. Cabe destacar la asociación positiva que este análisis mostró entre las variables biomasa de hoja y tallo y la acumulación de Pb en las distintas partes de la planta, lo que también muestra una mayor producción de biomasa aérea en las plantas expuestas. Los efectos generales de la exposición de plantas terrestres a suelos contaminados con Pb incluyen la reducción de la biomasa, por el contrario, en este caso se observó una situación de marcada tolerancia e incluso hormesis (Pinto y col., 2004).

Figura 6. Análisis de componentes principales para las variables relacionadas a la acumulación de Pb en las diferentes partes de la planta. Los datos fueron agrupados por población de origen y exposición a Pb.



Los indicadores azules presentan la ubicación media de cada tratamiento en el PCA. Los indicadores Intiyaco y Bouwer hacen referencia al tratamiento con suelo contaminado.

La tabla 3 muestra los resultados para el poder de extracción de los exudados para diversos metales. La exposición de las plantas a suelos contaminados no modificó el poder de extracción de Pb o Mn de los exudados, pero sí de Fe, Cu y Zn. Al no estar expuestas a Pb, las plantas exudaron compuestos con poder de extracción negativa para Fe, Cu y Zn, es decir que los exudados disuelven estos elementos en menor medida que

el agua. Al estar expuestas, las plantas comienzan a exudar compuestos que aumentan la disolución de esos elementos, por sobre la del agua, cabe destacar que estos elementos son micronutrientes esenciales. Ante ciertas situaciones de estrés ambiental, algunas plantas pueden presentar una respuesta fisiológica liberando compuestos para solubilizar los nutrientes necesarios para su desarrollo (Neumann, 2007; Sterckeman y col., 2005). También ha sido reportado que algunas especies acumuladoras de Ni liberan exudados que ayudan a la incorporación de este contaminante, ganando tolerancia a su toxicidad mediante la incorporación conjunta de otros metales que son nutrientes (Wenzel y col., 2003).

Tabla 3. ANOVA comparando el poder de extracción de los exudados para Mn, Fe, Cu, Zn y Pb para los cuatro tratamientos.

	BOUWER		INTIYACO		ANOVA P
	Suelo Control	Suelo Contaminado	Suelo Control	Suelo Contaminado	
<b>PEE<sub>Mn</sub></b>	6±4	4±3	7±4	3±2	ns
<b>PEE<sub>Fe</sub></b>	-27±7 b	5±5 a	-37±8 b	15±4 a	0,0001
<b>PEE<sub>Cu</sub></b>	-0,3±0,2 b	0,4±0,1 a	-0,6±0,2 b	0,1±0,1 a	0,0018
<b>PEE<sub>Zn</sub></b>	-2,8±0,3 b	0,4±0,2 a	-4,4±0,4 c	0,4±0,2 a	0,0001
<b>PEE<sub>Pb</sub></b>	0,7±0,9	-0,3±0,7	2±1	0,4±0,6	ns

PEE: Poder de extracción de los exudados para el metal indicado en el subíndice. Letras diferentes indican diferencias significativas, ns: no significativo.

El poder de extracción de Pb no se vio afectado por la exposición al contaminante, probablemente por no ser éste un nutriente. Por otro lado, se ha reportado que las especies vegetales que siguen una estrategia de tolerancia frente a metales pesados por medio de la exclusión, lo hacen a través de sus exudados (Larsen y col., 1998; Zhu y col., 2011). Esto muestra que *T. minuta*, al no mostrar una reducción en la solubilidad de Pb, no utiliza un mecanismo de exclusión de Pb a nivel de exudados rizoféricos, por lo que no corresponde a una de las especies vegetales que siguen la estrategia de “excluseras” frente a la presencia de contaminantes en el suelo.

El poder de extracción de Mn tampoco se vio afectado por la exposición al contaminante. El Mn es uno de los elementos más abundante en el suelo y su solubilidad está fundamentalmente ligada a los cambios de pH (Kabata-Pendias y Pendias, 2001); el hecho de que los exudados producidos ante la exposición a Pb no

hayan modificado su poder de extracción para este elemento sugiere que los exudados de *T. minuta* regulan la incorporación de elementos desde el suelo mediante compuestos orgánicos y no mediante cambios de pH, la cual es una estrategia asociada a plantas acumuladoras (Jones y Darrah, 1994). También cabe destacar que el poder de extracción de Mn ya era positivo y relativamente alto para los exudados de las plantas no expuestas a Pb, por lo cual puede no haber sido necesario un aumento de su solubilidad frente a la exposición al contaminante.

En concordancia con los datos reportados sobre poder de extracción de los exudados, en la tabla 4 se presentan las concentraciones de Mn, Fe, Cu y Zn en las distintas partes de la planta. La concentración de dichos elementos fueron significativamente superior en las plantas expuestas a Pb, sugiriendo que estos elementos esenciales fueron requeridos por la planta en mayor medida debido a la exposición a suelos contaminados con Pb. Esto ocurre para las hojas fundamentalmente, sobre todo en el caso de Cu y Zn. Esta demanda particular de dichos elementos pareciera estar siendo cubierta por una modificación en la capacidad de extracción que los exudados tienen para dichos elementos. En relación a esto, Jones y Darrah (1994), quienes estudiaron plantas expuestas a otro metal pesado, Al, propusieron que algunos ácidos orgánicos exudados por las raíces pueden participar de un mecanismo general de incorporación de micronutrientes y a la vez de un mecanismo de desintoxicación de Al. Con lo cual, la planta puede estar liberando compuestos con el propósito de aliviar los efectos tóxicos del metal y como efecto secundario se incrementa la incorporación de los micronutrientes.

Tabla 4. Valor medio, errores estándar y resultados del ANOVA comparando la concentración de Mn, Fe, Cu y Zn en los distintos órganos expresadas en  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco, entre poblaciones y tratamientos de exposición a Pb.

	Bouwer		Intiyaco		ANOVA
	Suelo Control	Suelo Contaminado	Suelo Control	Suelo Contaminado	P
<b>Mn</b> <sub>Raíz</sub>	22±2 b	48±4 a	24±3 b	34±4 a	0,0001
<b>Mn</b> <sub>Tallo</sub>	10±2 c	24±3 a	17±2 b	19±2 b	0,0007
<b>Mn</b> <sub>Hoja</sub>	37±3 c	107±10 a	60±4 b	123±8 a	0,0001
<b>Fe</b> <sub>Raíz</sub>	421±45 c	741±57 a	393±51 c	582±45 b	0,0001
<b>Fe</b> <sub>Tallo</sub>	47±8	71±27	60±9	331±100	ns
<b>Fe</b> <sub>Hoja</sub>	205±22	238±22	172±5	226±18	ns
<b>Cu</b> <sub>Raíz</sub>	28±20	26±8	94±23	27±6	ns
<b>Cu</b> <sub>Tallo</sub>	6,8±0,7 b	5,8±0,7 b	10,7±0,8 a	6,9±0,6 b	0,0001
<b>Cu</b> <sub>Hoja</sub>	7,1±0,5 b	11±1 a	7,0±0,6 b	9,8±0,9 a	0,003
<b>Zn</b> <sub>Raíz</sub>	25±2 b	41±3 a	22±2 b	35±2 a	0,0001
<b>Zn</b> <sub>Tallo</sub>	98±56	25±6	23±6	28±5	ns
<b>Zn</b> <sub>Hoja</sub>	50±3 b	70±3 a	37±3 c	71±2 a	0,0001

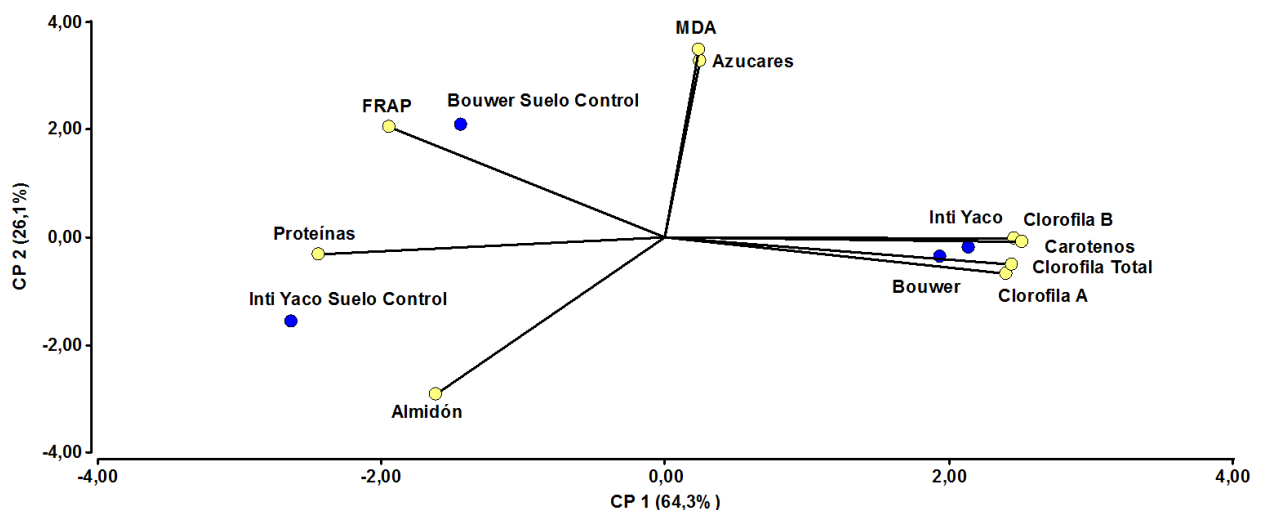
Mn, Fe, Cu, Zn: Concentraciones de dichos elementos en la parte de la planta indicada en el subíndice. Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ , ns: no significativo.

La función biológica del Mn en las plantas está asociada a la fotosíntesis (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Los autores Singh y Agrawal (2007) estudiaron el ingreso de diversos metales a la planta *Beta vulgaris* cuando la misma crece en suelos enmendados con residuos contaminados. Los tratamientos que utilizaron tenían niveles crecientes de Pb y otros metales en suelo y constantes de Mn; y el aumento en el ingreso de Pb a la raíz y su traslocación a la parte aérea fue acompañado de una disminución en el ingreso de Mn, lo cual podría sugerir un fenómeno de competencia de estos elementos. Esto estaría de acuerdo con lo reportado por Kabata-Pendias y Pendias (1979). Adicionalmente la especie estudiada por Singh y Agrawal (2007) se vio impactada fisiológicamente, con una disminución en los pigmentos fotosintéticos y concluyeron que no es apropiada para crecer en suelos contaminados. En el presente caso de estudio, *T. minuta* mostró que ante un incremento de Pb en suelo y en la planta, incorpora una mayor cantidad de Mn en toda la planta, lo cual está de acuerdo con el aumento de los pigmentos fotosintéticos que se presenta más adelante.

### 3.3. Análisis de variables fisiológicas

Con el propósito de encontrar una descripción general del perfil fisiológico de las plantas en los distintos tratamientos, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA), el cual se presenta en la figura 7. Puede destacarse que las dos poblaciones mostraron un patrón fisiológico muy parecido al crecer en suelos contaminados, mostrando una relación fuerte y positiva con los pigmentos. Por el contrario, al crecer en suelo control el perfil fisiológico fue diferente al de las plantas expuestas y diferente entre ambas poblaciones. Al crecer en suelos limpios, la población de Bouwer mostró una asociación más importante con FRAP mientras que la de Intiyaco se asoció con proteínas y en menor medida con almidón.

Figura 7. Análisis de componente principales de las variables fisiológicas (expresadas en peso seco) agrupando los datos por población y por exposición a suelos contaminados o control.



Los indicadores azules presentan la ubicación media de cada tratamiento en el PCA. Los indicadores Intiyaco y Bouwer hacen referencia al tratamiento con suelo contaminado.

En la Tabla 5 se exponen los valores de las variables fisiológicas para los distintos tratamientos. Los valores encontrados para FRAP muestran una mayor capacidad ferredoxina en las plantas que crecieron en suelo control que en suelo contaminado para ambas poblaciones. No obstante la reducción en la capacidad antioxidante fue más marcada para la población de Bouwer. Los antecedentes bibliográficos muestran que las plantas terrestres elevan su capacidad antioxidante frente a diferentes tipos de estrés, mostrando un incremento en los valores de FRAP a medida que aumenta el nivel de

estrés (Deng y col., 2012; Ríos y col., 2008; Sánchez-Rodríguez y col., 2010; Szóllósi y col., 2009; Trudic y col., 2012). En este estudio se observó una tendencia opuesta. En este contexto cabe destacar que *T. minuta* es una especie con alto contenido de aceites esenciales, los cuales presentan naturalmente y en condiciones normales, sin estrés, una elevada capacidad antioxidante (Karimian y col., 2014), que incluso ha sido reportada mediante la técnica de FRAP (Mlala, 2015). En este contexto, los resultados de la presente investigación indicarían una deficiencia en estos compuestos debida a la exposición a Pb, lo cual compromete la capacidad antioxidante no enzimática de la planta.

Los azúcares solubles presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Para las plantas correspondientes a la población de Bouwer, la exposición a suelos con Pb causó una disminución de azúcares solubles comparado al control. En el caso de la población de Intiyaco el efecto fue el opuesto. El contenido de azúcares solubles puede tener respuestas diferentes en función del tipo de estrés que experimente la planta, siendo esperable una reducción del mismo frente al estrés causado por la exposición a metales pesados (Lanaras y col., 1993; Rosa y col., 2009). La población de Bouwer respondió indicando estrés ante la exposición a Pb mientras que la de Intiyaco no. La población de Intiyaco mostró un comportamiento similar al encontrado por Rodríguez y col. (2015) para la especie *Pisum sativum*. En dicho estudio, este resultado es considerado una respuesta de defensa que ayuda a la planta a conservar el turgor de las células y proteger sus membranas del estrés oxidativo.

El contenido de MDA indica el nivel de peroxidación de lípidos y por ende de daño de las membranas. La exposición de las poblaciones estudiadas a suelo contaminado no introdujo un efecto significativo en este parámetro. No obstante, la población de Bouwer se caracterizó por tener valores superiores a la de Intiyaco. Estos resultados muestran una resistencia importante de la especie estudiada frente a la exposición a Pb. Resultados muy similares a estos han sido interpretados como características ideales en la selección de especies para fitorremediación (Maldonado-Magaña y col., 2011).

Si se observan los datos de pigmentos, todos ellos (Clorofilas a, b, totales y carotenos), resultaron significativamente más altos en plantas crecidas en suelo contaminado, que en suelo control, repitiéndose la tendencia en ambas poblaciones y

sin existir diferencias entre ellas. Con respecto a la relación clorofila A/B no hubo diferencias significativas.

La bibliografía indica que, como generalidad, las plantas terrestres son sensibles a la presencia de metales pesados en suelo, manifestando una reducción en el contenido de clorofilas a y b, y en la relación clorofila a/b (Moustakas y col., 1994), ya que experimentan una inhibición de la biosíntesis de dichos pigmentos y de las enzimas que participan del proceso (Rai y col., 2016). Incluso en el caso de *Brassica juncea*, una especie de crecimiento rápido recomendada reiteradamente en la bibliografía para su uso en fitorremediación de metales pesados, se ha observado una disminución de los pigmentos fotosintéticos en respuesta a la exposición a Pb (John y col., 2012). En contraste con esto, ambas poblaciones de la especie estudiada no manifestaron este efecto tóxico ante la exposición Pb. Los resultados encontrados para clorofilas son coherentes con aquellos de biomasa, ya que el efecto fitotóxico de los metales pesados sobre estos pigmentos es el responsable de la disminución de biomasa encontrada en la mayoría de estudios citados en la bibliografía (Rai y col., 2016). Esto muestra nuevamente la tolerancia de *T. minuta* al plomo independientemente de la historia transgeneracional de exposición. También es importante destacar que en relación a la contaminación por metales pesados, las especies acuáticas, como así también las terrestres crecidas en hidroponía, muestran una capacidad mayor de acumulación; y en el caso particular de las acuáticas una mayor capacidad de tolerancia a este tipo de estrés. Por ejemplo, Ralph y Burchett (1998) encontraron un leve incremento del contenido de clorofilas al exponer la especie acuática *Halophila ovalis* a concentraciones bajas de Pb en agua. A concentraciones elevadas, el contenido de clorofilas se redujo pero se mantuvo la relación clorofila a/b, siendo este dato interpretado como un indicador de resistencia. En otro estudio, los autores Rodríguez y col. (2015) estudiaron un cultivar resistente a Pb de la especie *Pisum sativum*, considerada útil en procesos de fitorremediación, encontrando también un incremento de las clorofilas y carotenoides en respuesta a la exposición a Pb en el suelo.

Los valores de carotenos, que también mostraron un incremento ante la exposición a Pb, indican que hubo daño en alguna medida, ya que son moléculas antioxidantes, que se producen con la finalidad de neutralizar las especies reactivas del

oxígeno (EROs) que aparecen en presencia de metales pesados (Foyer y Harbinson, 1994; Rai y col., 2016). El aumento de estos pigmentos es interpretado como una respuesta de protección de la planta, que dados los resultados del presente experimento pueden interpretarse como efectivos ya que no hubo reducción de los pigmentos fotosintéticos.

La exposición de *T. minuta* a Pb produjo en ambas poblaciones una reducción significativa de proteínas solubles. Este efecto ha sido observado previamente en otras especies expuestas a Pb y es atribuido al aumento de la actividad proteasa que degrada proteínas, como así también al daño producido por el efecto tóxico de las EROs (Hamid y col., 2010; John y col., 2012; Palma y col., 2002; Xu y col., 2009).

Tabla 5. Comparación de variables fisiológicas entre poblaciones cuando crecen en suelos contaminados y control.

	<b>Bouwer</b>		<b>Intiyaco</b>		<b>ANOVA (p)</b>
	Suelo Contaminado	Suelo Control	Suelo Contaminado	Suelo Control	
<b>FRAP</b> (umoles de Trolox/g PS)	306 ± 56 c	905 ± 89 a	528 ± 44 b	696 ± 89 a	0,0001
<b>Azúcares solubles</b> (mg/g PS)	124 ± 11 b	182 ± 18 a	169 ± 9 a	120 ± 9 b	0,0002
<b>MDA</b> (nmol/g PS)	671 ± 38 a	750 ± 61 a	549 ± 29 b	512 ± 61 b	0,003
<b>Clorofila A</b> (mg/g PS)	5,9 ± 0,5 a	3,7 ± 0,5 b	6,9 ± 0,4 a	3,7 ± 0,5 b	0,0001
<b>Clorofila B</b> (mg/g PS)	1,7 ± 0,2 a	1,1 ± 0,1 b	1,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 b	0,0001
<b>Clorofilas totales</b> (µg/g PS)	8,9 ± 0,8 a	5,5 ± 0,7 b	10,3 ± 0,6 a	5,3 ± 0,7 b	0,0001
<b>Relación Clorofila A/B</b>	3,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,7 ± 0,1	4,1 ± 0,3	ns
<b>Carotenos</b> (µg/g PS)	2,7 ± 0,2 a	1,5 ± 0,2 b	2,7 ± 0,2 a	1,3 ± 0,1 b	0,0001
<b>Proteínas Solubles</b> (mg de Albumina/g PS)	195 ± 18 b	276 ± 28 a	219 ± 14 b	313 ± 28 a	0,0023
<b>Almidón</b> (mg/g PS)	315 ± 27	316 ± 23	321 ± 21	345 ± 21	ns



En cuanto al contenido de almidón, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. La respuesta normal de cualquier planta ante un factor de estrés abiótico es el incremento en el contenido de almidón (Prado y col., 2010; Rodriguez y col., 2015), de esta manera el almidón es uno más de los parámetros fisiológicos que está indicando tolerancia al metal por parte de la especie estudiada.

En las tablas 6 y 7 se exponen los resultados para las correlaciones entre los parámetros fisiológicos para cada población. Se destaca que la población de Bouwer presenta una relación más estrecha entre los parámetros fisiológicos que la de Intiyaco.

Tabla 6. Matriz de correlación de los parámetros fisiológicos entre sí para la población de Intiyaco. Por encima de la diagonal de 1 se reportan los valores de p y por debajo los valores de R<sup>2</sup>. En Verde se resaltan los p significativos y en naranja sus respectivos R<sup>2</sup>.

INTIYACO	Azúcares	FRAP	MDA	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total	Carotenos	Proteínas	Almidón
Azúcares	1	0,003	0,381	0,516	0,62	0,58	0,619	0,903	0,086
FRAP	0,484	1	0,359	0,32	0,377	0,283	0,16	0,047	0,821
MDA	-0,15	0,16	1	0,367	0,063	0,271	0,043	0,664	0,409
Clorofila A	-0,112	0,173	0,155	1	0	0	0	0,13	0,256
Clorofila B	-0,086	0,154	0,313	0,886	1	0	0	0,312	0,216
Clorofila Total	-0,095	0,187	0,189	0,987	0,934	1	0	0,201	0,239
Carotenos	-0,086	0,243	0,339	0,941	0,874	0,95	1	0,352	0,351
Proteínas	0,021	0,338	0,075	-0,257	-0,173	-0,218	-0,16	1	0,295
Almidón	0,29	0,04	-0,142	0,194	0,211	0,201	0,16	-0,18	1

En ambas poblaciones hubo una correlación significativa y positiva entre el contenido de azúcares solubles y la capacidad reductora no enzimática indicada por la variable FRAP. Este resultado puede indicar que el incremento en el contenido de azúcares solubles tiene una función de protección contra el estrés oxidativo como fue propuesto por Rodriguez y col. (2015). Ambas poblaciones también mostraron correlaciones significativas y positivas entre los pigmentos (clorofilas y carotenoides), lo

cual resulta muy esperable y respalda la función protectora que los carotenoides tienen sobre los fotosistemas (Rai y col., 2016).

Tabla 7. Matriz de correlación de los parámetros fisiológicos entre sí para la población de Bouwer. Por encima de la diagonal de 1 se reportan los valores de p y por debajo los valores de R<sup>2</sup>. En Verde se resaltan los p significativos y en naranja sus respectivos R<sup>2</sup>.

BOUWER	Azúcares	FRAP	MDA	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total	Carotenos	Proteínas	Almidón
Azúcares	1	0,029	0,253	0,053	0,008	0,017	0,004	0,884	0,534
FRAP	0,477	1	0,877	0,025	0,002	0,019	0,001	0,255	0,418
MDA	-0,261	0,036	1	0,231	0,623	0,143	0,231	0,018	0,110
Clorofila A	0,428	0,487	-0,273	1	0	0	0	0,068	0,369
Clorofila B	0,563	0,647	-0,114	0,851	1	0	0	0,300	0,081
Clorofila Total	0,514	0,506	-0,331	0,909	0,870	1	0	0,035	0,581
Carotenos	0,606	0,656	-0,273	0,855	0,933	0,885	1	0,197	0,285
Proteínas	-0,034	0,260	0,510	-0,406	-0,237	-0,463	-0,293	1	0,605
Almidón	-0,144	-0,187	-0,359	-0,207	-0,390	-0,128	-0,245	-0,120	1

En el caso particular de la población de Bouwer, la capacidad reductora no enzimática mostró correlación significativa y positiva con los pigmentos, sugiriendo que hay una protección de la actividad fotosintética por esta vía frente al estrés que parece solo en la población históricamente expuesta. Si bien ambas poblaciones experimentan el mismo efecto en el contenido de FRAP como respuesta a la exposición a Pb (Tabla 5), la identidad de los compuestos que aportan a esa capacidad reductora no enzimática puede ser diferente y estar cumpliendo una función más específica y relacionada al mantenimiento de la actividad fotosintética en el caso de Bouwer.

También se realizaron correlaciones entre Pb en la planta (la concentración de Pb en los distintos órganos de la planta, la extracción total de plomo por planta y el poder de extracción de los exudados relativo al agua) y las variables fisiológicas (Tablas 8, 9, 10 y 11). Para la población de Intiyaco las correlaciones fueron significativas entre la

concentración de Pb en la raíz y la mayoría de las variables fisiológicas, exceptuando únicamente azúcares, proteínas y almidón. Estos resultados indican que la especie *T. minuta* manifiesta una respuesta fisiológica en la hoja dado el ingreso de Pb en la raíz cuando se trata de individuos que no presentan una historia transgeneracional de exposición.

Por su parte, la población de Bouwer muestra correlación significativa entre algunas de las variables fisiológicas, exceptuando MDA, clorofilas B, proteínas y almidón; y la concentración de Pb en la hoja y no en tallo o en raíz. Pese a que no se encontraron diferencias significativas para las concentraciones del metal en ninguno de los órganos entre las poblaciones cuando fueron expuestas, y el análisis multivariado de componentes principales para las variables fisiológicas muestra en un estado general muy similar para ambas poblaciones, la respuesta fisiológica de cada una parece estar relacionada con la presencia del Pb en diferentes partes de la planta.

Tabla 8. Valores de probabilidad p de las correlaciones entre las concentraciones de Pb en la planta y las variables fisiológicas para la población de Intiyaco.

<b>p valor</b>							
<b>INTIYACO</b>	Pb <sub>Hoja</sub>	Pb <sub>Tallo</sub>	Pb <sub>Raíz</sub>	ETP <sub>Pb</sub>	PEE <sub>Pb</sub>	FT <sub>Pb</sub>	FTT <sub>Pb</sub>
Azúcares	0,07	0,81	0,59	0,93	0,48	0,13	0,76
FRAP	0,59	0,41	0,02	0,60	0,80	0,57	0,44
MDA	0,82	0,41	0,02	0,47	0,98	0,19	0,06
Clorofila A	0,91	0,72	0,06	0,52	0,96	0,55	0,31
Clorofila B	0,63	0,73	0,06	0,49	0,86	0,56	0,23
Clorofila Total	0,67	0,62	0,03	0,35	0,92	0,53	0,3
Carotenos	0,50	0,63	0,02	0,05	0,67	0,36	0,24
Proteínas	0,72	0,53	0,83	0,57	0,26	0,59	0,81
Almidón	0,96	0,35	0,37	0,74	0,31	0,69	0,26

Pb: Concentración de plomo en la parte de la planta indicada por el subíndice. ETP<sub>Pb</sub>: Extracción total de plomo por planta; PEE<sub>Pb</sub>: Poder de extracción de plomo de los exudados relativo al agua, FT<sub>Pb</sub>: Factor de translocación de plomo; FTT<sub>Pb</sub>: Factor de transferencia total de plomo. Se muestra los valores de p, indicándose en verde los significativos.

Tabla 9. Coeficientes de las correlaciones entre Pb en la planta y las variables fisiológicas para la población de Intiyaco.

<b>R<sup>2</sup> Pearson</b>									
<b>INTIYACO</b>	Azúcares	FRAP	MDA	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total	Carotenos	Proteínas	Almidón
Pb <sub>Hoja</sub>	-0,31	0,09	-0,04	-0,02	-0,08	-0,07	-0,12	-0,06	-0,01
Pb <sub>Tallo</sub>	-0,04	0,14	-0,14	0,06	0,06	0,08	0,08	-0,11	0,16
Pb <sub>Raíz</sub>	0,09	0,39	0,39	0,32	0,31	0,35	0,38	0,04	-0,15
ETP <sub>Pb</sub>	-0,01	0,09	0,12	0,11	0,12	0,16	0,33	0,10	0,06
PEE <sub>Pb</sub>	0,12	0,04	0,00	-0,01	-0,03	-0,02	-0,07	0,19	0,17
FT <sub>Pb</sub>	-0,25	0,1	-0,22	-0,1	-0,1	-0,11	-0,15	-0,09	0,07
FTT <sub>Pb</sub>	-0,05	0,13	-0,32	-0,17	-0,2	-0,17	-0,2	-0,04	0,19

Pb: Concentración de plomo en la parte de la planta indicada por el subíndice. ETP<sub>Pb</sub>: Extracción total de plomo por planta; PEE<sub>pe</sub>: Poder de extracción de plomo de los exudados relativo al agua, FT<sub>Pb</sub>: Factor de translocación de plomo; FTT<sub>Pb</sub>: Factor de transferencia total de plomo. Se muestran los valores de R<sup>2</sup> destacados en naranja cuando se corresponden con un p significativo.

Tabla 10. Valores de probabilidad p de las correlaciones entre las concentraciones de Pb en la planta y las variables fisiológicas para la población de Bouwer.

<b>p valor</b>							
<b>BOUWER</b>	Pb <sub>Hoja</sub>	Pb <sub>Tallo</sub>	Pb <sub>Raíz</sub>	ETP <sub>Pb</sub>	PEE <sub>Pb</sub>	FT <sub>Pb</sub>	FTT <sub>Pb</sub>
Azúcares	0,05	0,35	0,71	0,63	0,95	0,57	0,47
FRAP	0,07	0,28	0,43	0,42	0,49	0,96	0,79
MDA	0,15	0,28	0,38	0,16	0,29	0,33	0,31
Clorofila A	0,01	0,81	0,29	0,74	0,89	0,85	0,7
Clorofila B	0,21	0,74	0,24	0,72	0,97	0,7	0,5
Clorofila Total	0,03	0,79	0,22	0,62	0,86	0,76	0,56
Carotenos	0,05	0,58	0,25	0,92	0,87	0,86	0,62
Proteínas	0,97	0,94	0,72	0,40	0,75	1	0,58
Almidón	0,58	0,76	0,11	0,98	0,49	0,52	0,26

Pb: Concentración de plomo en la parte de la planta indicada por el subíndice. ETP<sub>Pb</sub>: Extracción total de plomo por planta; PEE<sub>pe</sub>: Poder de extracción de plomo de los exudados relativo al agua, FT<sub>Pb</sub>: Factor de translocación de plomo; FTT<sub>Pb</sub>: Factor de transferencia total de plomo. Se muestra los valores de p, indicándose en verde los significativos.

Tabla 11. Coeficientes de las correlaciones entre Pb en la planta y las variables fisiológicas para la población de Intiyaco.

<b>R<sup>2</sup> Pearson</b>									
<b>BOUWER</b>	Azúcares	FRAP	MDA	Clorofila A	Clorofila B	Clorofila Total	Carotenos	Proteínas	Almidón
Pb <sub>Hoja</sub>	0,43	0,40	-0,33	0,54	0,29	0,46	0,44	0,01	0,13
Pb <sub>Tallo</sub>	0,22	-0,25	-0,25	-0,06	-0,08	-0,06	-0,13	0,02	0,07
Pb <sub>Raíz</sub>	-0,09	-0,18	0,20	-0,24	-0,27	-0,28	-0,26	0,08	-0,36
ETP <sub>Pb</sub>	0,11	0,19	0,32	-0,08	-0,08	-0,11	0,02	0,19	0,01
PEE <sub>Pb</sub>	-0,01	0,16	0,24	0,03	0,01	-0,04	-0,04	-0,07	0,16
FT <sub>Pb</sub>	0,13	-0,01	-0,22	0,04	0,09	0,07	0,04	0	0,15
FTT <sub>Pb</sub>	0,16	0,06	-0,23	0,09	0,15	0,13	0,11	0,12	0,25

Pb: Concentración de plomo en la parte de la planta indicada por el subíndice. ETP<sub>Pb</sub>: Extracción total de plomo por planta; PEE<sub>Pb</sub>: Poder de extracción de plomo de los exudados relativo al agua, FT<sub>Pb</sub>: Factor de translocación de plomo; FTT<sub>Pb</sub>: Factor de transferencia total de plomo. Se muestran los valores de R<sup>2</sup> destacados en naranja cuando se corresponden con un p significativo.

Previamente en este texto se estableció que la exposición a Pb causa una disminución de la capacidad reductora no enzimática, es decir comparando plantas que crecieron en suelo control con aquellas que crecieron en suelo contaminado (Tabla 5). No obstante, al considerar únicamente aquellos individuos que crecieron en suelos contaminados y analizar la relación entre esta variable y la concentración de Pb en la planta (tablas 8, 9, 10 y 11), se encontró una correlación significativa y positiva en ambas poblaciones. Indicando que la especie responde en defensa ante el ingreso de Pb en sus órganos mediante la actividad reductora no enzimática independientemente de la historia de exposición.

Para la población de Intiyaco se encontró una correlación positiva entre el ingreso del Pb a la planta y el contenido de MDA, mientras que para Bouwer estas variables resultaron independientes, sugiriendo que la historia de exposición a Pb de esta especie la ha preparado para evitar el daño de las membranas celulares. Reforzando esta hipótesis, se encontró también, que para la población oriunda de Bouwer hay una correlación significativa y positiva entre la concentración de Pb en la planta y el contenido de azúcares solubles, relación que no existe para la población de Intiyaco. En este contexto, se puede sugerir que la población expuesta tiene la

capacidad acumular Pb sin experimentar daño en sus membranas posiblemente debido al efecto protector contra el daño oxidativo que tienen los azúcares solubles (Rodríguez y col., 2015). El resultado del ANOVA para azúcares (Tabla 5), indicó que la población de Intiyaco respondió ante la exposición a Pb en suelo con un aumento de azúcares, mientras que la de Bouwer lo hizo con una disminución de dichos compuestos. Esto puede interpretarse como una capacidad intrínseca de la especie de responder al estrés por este medio, pero que, ante la exposición particularmente a Pb, la aclimatación a esta presión ambiental, hace que el mecanismo se active ante la presencia del plomo en la hoja y no ante la simple exposición a nivel radical.

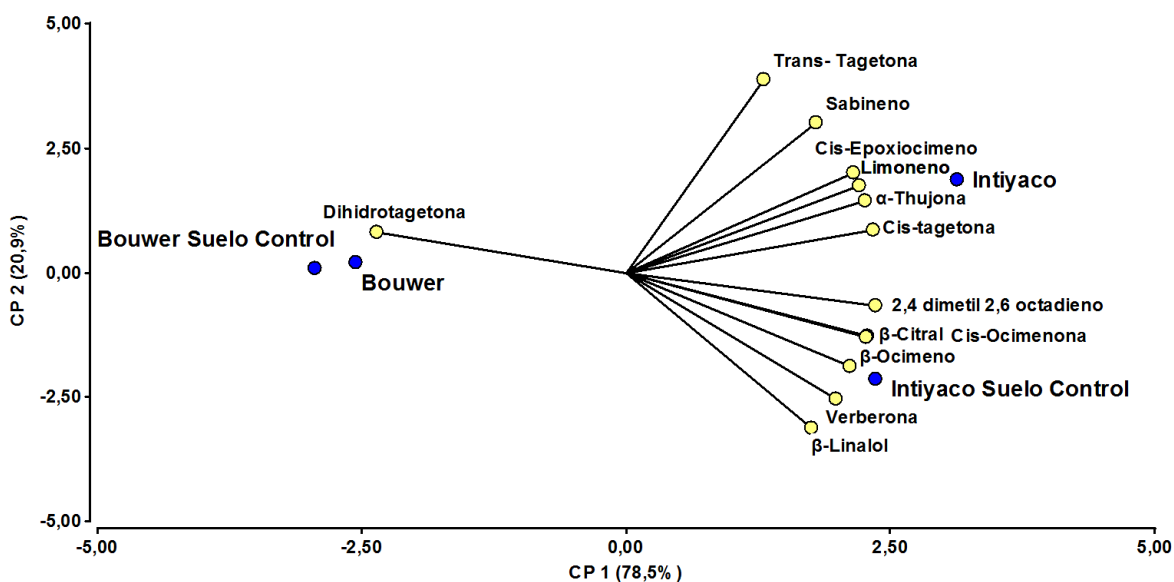
### **3.4. Análisis de la composición porcentual de compuestos volátiles**

*Tagetes minuta* L. es una especie de interés comercial ya que produce una gran cantidad de aceites esenciales que son utilizados en diversas industrias (Patel y Patra, 2014). Los principales componentes de dichos aceites son compuestos volátiles de la familia de los terpenos (Singh y col., 2016). La importancia del estudio de los aceites esenciales de esta especie en relación a su capacidad para la tolerancia y acumulación de Pb reside en su potencial para combatir las ROS y radicales libres protegiendo a los tejidos y estructuras de la planta contra los daños toxicológicos del contaminante (Shirazi y col., 2014).

Con el propósito de obtener una visión generalizada de los mismos en cada población, según su origen y exposición a Pb, se realizó un análisis de componentes principales (Figura 8). En éste se ve cómo los aceites esenciales de la población de Bouwer, independientemente de la exposición al contaminante, se componen principalmente de dihidrotagetona. En cambio, para la población de Intiyaco se diferencian dos grupos, las plantas que crecieron en suelo contaminado, asociadas a limoneno, cis-tagetona, cis-epoximeno y  $\alpha$ -thujona y las que lo hicieron en suelo control, que se asociaron mayormente a verberona,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -citral y cis-cimemona. A partir de este análisis se puede decir que hay una marcada diferencia según el origen de planta, y por lo tanto este origen, relacionado con el historial de exposición a Pb, estaría marcando la composición de los volátiles en esta especie. En un estudio realizado en Argentina por Gil y col. (2000) con poblaciones de la especie

*T.minuta* seleccionadas de Río Negro, Salta, Jujuy, Mendoza y Buenos Aires, se reportaron variaciones intra-específicas que permitieron agrupar los aceites de *T. minuta* en subtipos, establecieron así la existencia de tres quimiotipos de aceites esenciales de esta especie. El quimiotipo 1: relacionado con  $\beta$ -ocimeno, dihidrotagetona, Z-tagetona, E- y Z-tagetenonas y limoneno; quimiotipo 2: con dihidrotagetona y quimiotipo 3: con  $\alpha$ -fenandreno y E-  $\beta$ -ocimeno. De acuerdo a esta clasificación, la población de Bouwer podría encuadrarse en el quimiotipo 2, donde predomina el compuesto dihidrotagetona, pero ninguno de estos quimiotipos representa a la población de Intiyaco.

Figura 8. Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles. Los datos fueron agrupados por población de origen y exposición a Pb.



Los indicadores azules presentan la ubicación media de cada tratamiento en el PCA. Los indicadores Intiyaco y Bouwer hacen referencia al tratamiento con suelo contaminado.

Las figuras 9 y 10 muestran los perfiles individuales de composición de volátiles de los aceites esenciales, estando ordenados los individuos de izquierda a derecha de manera creciente para la concentración de Pb en hoja, esta variable también está representada en el gráfico.

Los individuos de la población de Bouwer presentaron muy poco sabineno, incluso algunos no lo produjeron, lo mismo ocurre con  $\beta$ -linalol,  $\alpha$ -thujona, 2,4 dimetil 2,6 octadieno, y trans-tagetona. Todos tienen limoneno y  $\beta$ -ocimeno. El compuesto dihidrotagetona es el que predomina en todos los individuos y en gran proporción.

Todos tienen una pequeña porción de  $\beta$ -citral. Cis-ocimenona, cis-tagetona, cis-epoximeno y verbenona están presentes en la mayoría de los individuos aunque en proporciones variables. Puede observarse que el único individuo que presentó una concentración elevada de Pb en hoja (cerca de  $200 \mu\text{g g}^{-1}$ ) muestra un perfil de composición de volátiles muy diferente al resto de los individuos de su misma población (Bouwer), presentando un porcentaje mayor de verbenona,  $\beta$ -ocimeno y limoneno en detrimento de dihidrotagetona.

En la población de Intiyaco, comparado a la de Bouwer, se ve una composición diferente de los compuestos volátiles, una menor presencia de dihidrotagetona, y mayor porcentaje de cis-tagetona y verbenona. También tienen una presencia importante cis-ocimenona, cis-epoximeno presentes en todos los individuos. La composición de los aceites esenciales de esta especie es variable, como ya se expuso, y está comprobado que las variaciones genéticas y fenotípicas contribuyen a la diferencia en la concentración de terpenos volátiles y la magnitud de estas diferencias varía entre poblaciones (Mihaliak y col., 1989). Incluso, como se pudo ver en el trabajo de Gil y col., 2000, la composición de aceites esenciales puede variar en una misma población de un año a otro, demostrándose así una gran plasticidad fenotípica para esta especie.



Figura 9. Contenido porcentual de cada uno de los compuestos volátiles y la concentración de Pb en Hoja de los individuos de la población de Bouwer expuestos a Pb, ordenados según la concentración de Pb en hoja de manera creciente de izquierda a derecha, la primera barra muestra el valor promedio de los individuos que crecieron en suelo control como referencia.

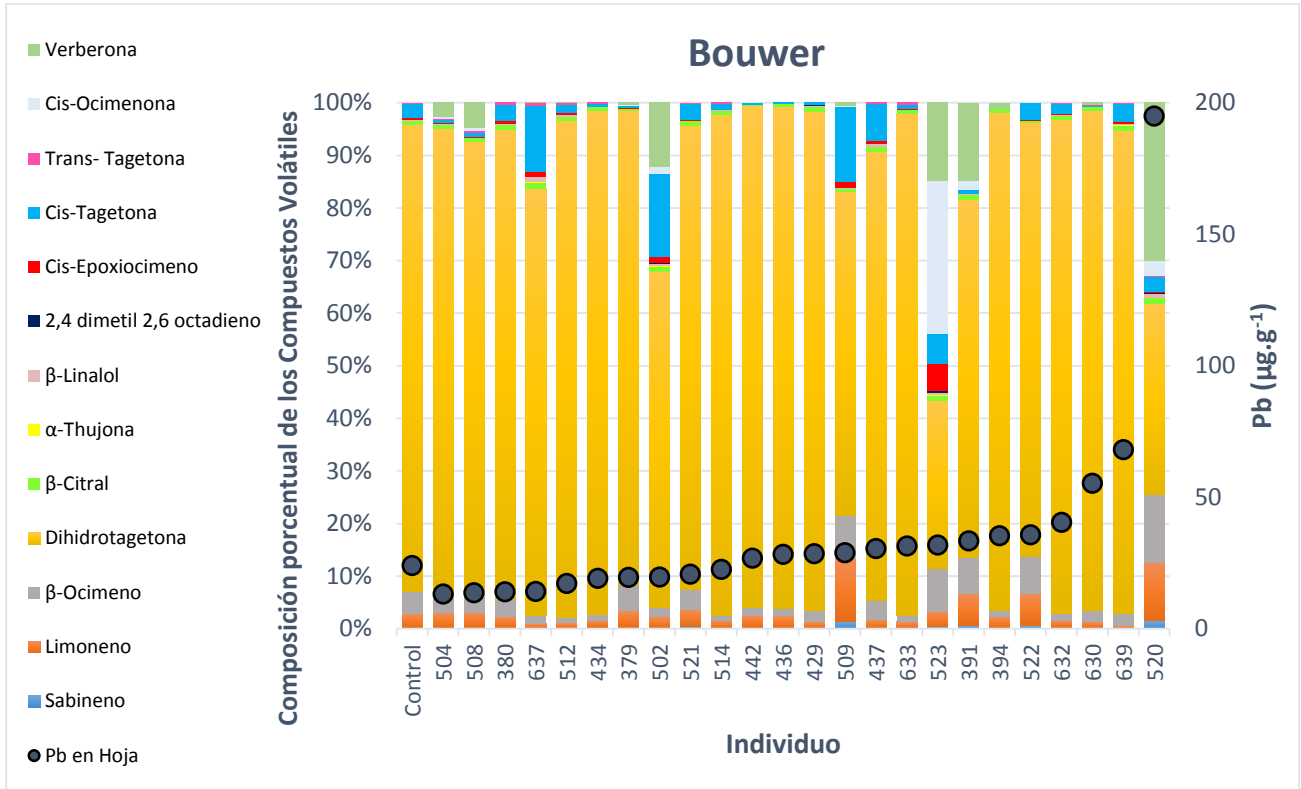
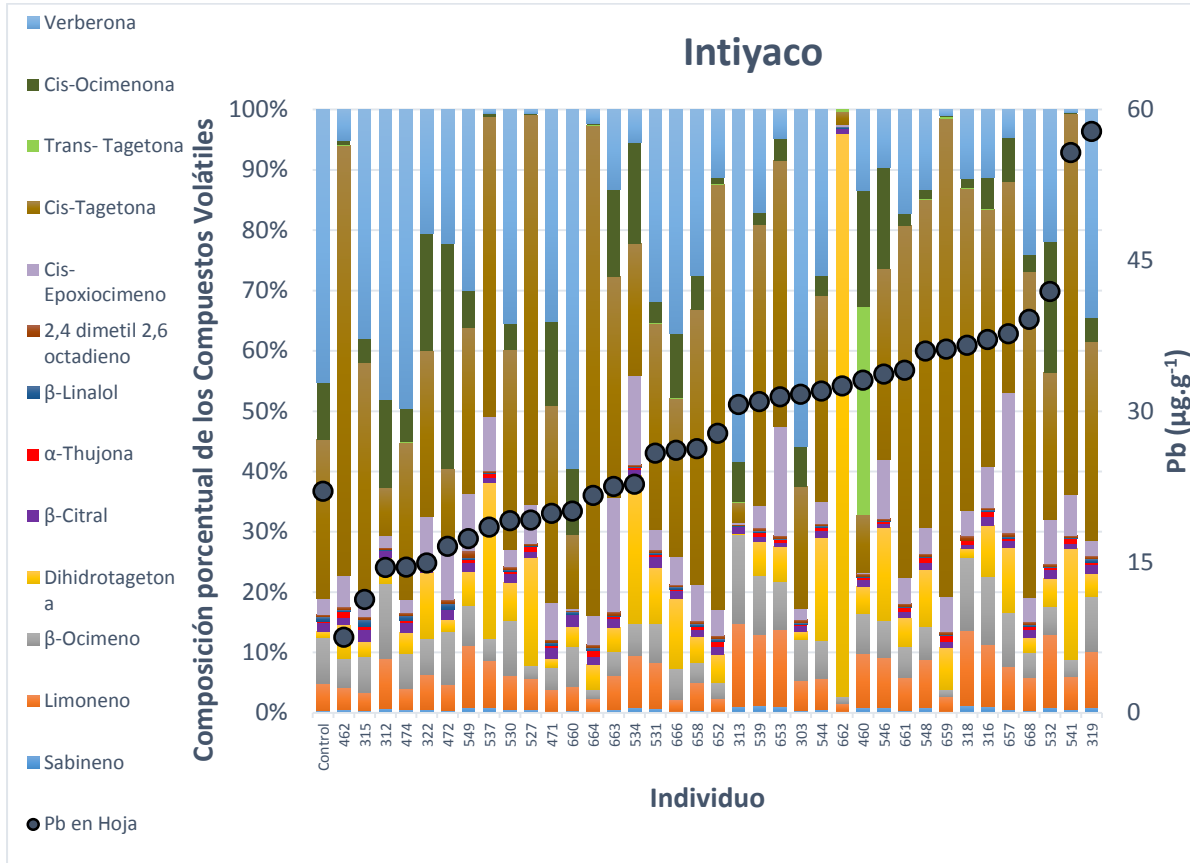


Figura 10. Contenido porcentual de cada uno de los compuestos volátiles y la concentración de Pb en Hoja, de los individuos de la población de Intiyaco expuestos a Pb, ordenados según la concentración de Pb en hoja de manera creciente de izquierda a derecha, la primera barra muestra el valor promedio de los individuos que crecieron en suelo control como referencia.



Adicionalmente, se realizaron correlaciones entre la concentración de Pb en hoja y los compuestos volátiles como se pueden ver en la tabla 12. Para la población de Bouwer, los compuestos volátiles se encuentran más relacionados con la concentración de Pb en hoja que para la de Intiyaco, donde sólo tres compuestos se correlacionaron (limoneno,  $\beta$ -citral,  $\beta$ -linalol). En la población de Bouwer se correlacionó positivamente  $\beta$ -ocimeno con la concentración de Pb en hoja coincidiendo con los hallazgos de Sosa y col. (2016), sugiriendo que el incremento de Pb en *T. minuta* aumentaría la síntesis de este compuesto volátil. Se conoce que este compuesto participa en la activación de genes para la defensa en plantas (Arimura y col., 2002). Por otro lado,  $\beta$ -ocimeno se encuentra en la vía metabólica de formación de otros compuestos como tagetonas, tagetonas y dihidrotagetona (Singh y col., 2016), esto es de suma importancia ya que el compuesto dihidrotagetona, que es el más abundante en los individuos de Bouwer, se

correlacionó negativamente con la concentración de Pb en hoja, indicando que a medida que aumenta este metal en la hoja, la planta producirá menos dihidrotagetona. Esto puede interpretarse de dos formas, por un lado, el Pb puede interrumpir la biosíntesis de dihidrotagetona inhibiendo alguna enzima requerida en los pasos que permiten llegar a este compuesto a partir de  $\beta$ -ocimeno, por lo cual este aumenta su presencia. Por otro lado, el aumento de  $\beta$ -ocimeno en detrimento de dihidrotagetona puede ser una estrategia de la planta para activar genes relacionados a la defensa.

En un trabajo realizado por Sánchez-Osorio y col. (2013) se observó la composición de volátiles foliares sobre hojas infestadas por *C. welensii* en comparación con no infestadas, se pudo ver que estas liberaban grandes cantidades de limoneno cuando se encontraban infestadas, dando indicio de la presencia de este compuesto en una situación de estrés. Este dato coincide con los resultados para la población de Intiyaco, en la que limoneno se correlacionó positivamente con la concentración de Pb en hoja, pudiendo ser una respuesta al estrés generado. La acumulación de metabolitos secundarios es, generalmente, un mecanismo de defensa y juega un papel principal en la adaptación de las plantas a variaciones ambientales. Según esto, las situaciones de estrés normalmente favorecen la producción de estos compuestos. A pesar de que en muchos estudios se ha demostrado la influencia que tienen los factores ambientales en la composición química de los aceites esenciales, su control primario en relación al quimiotipo que expresan está mayoritariamente bajo control genético (Figueiredo y col., 2008). Esto quiere decir que, aunque las condiciones ambientales perfilan ciertos patrones químicos, éstos son característicos de cada planta o grupo de plantas.

Tabla 12. Correlaciones de Pearson para la concentración de Pb en Hoja con los compuestos volátiles y comparación entre poblaciones. Composición porcentual de los compuestos volátiles para cada población.

Compuesto	Correlación con Pb en Hoja				Composición porcentual		
	Bouwer		Intiyaco		Bouwer	Intiyaco	p
	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p			
<b>Sabineno</b>	<b>0,62</b>	<b>0,001</b>	0,08	0,286	0,33 ± 0,07 b	0,59 ± 0,05 a	0,004
<b>Limoneno</b>	<b>0,53</b>	<b>0,007</b>	<b>0,32</b>	<b>0,051</b>	3,0 ± 0,6 b	6,5 ± 0,5 a	0,0001
<b>β-Ocimeno</b>	<b>0,61</b>	<b>0,001</b>	0,05	0,766	3,6 ± 0,6 b	6,2 ± 0,5 a	0,002
<b>Dihidrotagetona</b>	<b>-0,51</b>	<b>0,01</b>	0,10	0,564	83 ± 4 a	10 ± 3 b	0,0001
<b>β-Citral</b>	<b>0,40</b>	<b>0,050</b>	<b>-0,38</b>	<b>0,018</b>	0,77 ± 0,06 b	1,25 ± 0,05 a	0,0001
<b>α-Thujona</b>	0,11	0,594	0,13	0,434	0,04 ± 0,01 b	0,50 ± 0,04 a	0,0001
<b>β-Linalol</b>	0,28	0,175	<b>-0,38</b>	<b>0,02</b>	0,21 ± 0,05 b	0,35 ± 0,04 a	0,003
<b>2,4 dimetil 2,6 octadieno</b>	0,19	0,366	-0,07	0,699	0,05 ± 0,01 b	0,43 ± 0,03 a	0,0001
<b>Cis-Epoxiocimeno</b>	-0,03	0,888	0,03	0,882	0,5 ± 0,5 b	6,8 ± 0,8 a	0,001
<b>Cis-Tagetona</b>	-0,07	0,75	0,12	0,459	3,34 ± 0,9 b	37,7 ± 0,3 a	0,0001
<b>Trans- Tagetona</b>	-0,10	0,652	0,08	0,634	0,14 ± 0,03	0,97 ± 0,9	ns
<b>Cis-Ocimeno</b>	0,07	0,735	-0,20	0,225	1,45 ± 1,15 b	7 ± 1 a	0,0001
<b>Verberona</b>	<b>0,71</b>	<b>0,001</b>	-0,23	0,165	3 ± 1 b	22 ± 3 a	0,0001

También se comparó la composición porcentual de los compuestos en ambas poblaciones (tabla 12). Bouwer presentó un 83 % de dihidrotagetona reafirmando su predominancia, en cambio para Intiyaco los valores más altos fueron de cis-tagetona con 37 % y verberona con 22 %. Los componentes mayoritarios de ambos orígenes fueron encontrados simultáneamente en la población de Bouwer en el estudio a campo realizado por Sosa y col. (2016), donde los datos de concentración fueron cis-tagetona (39,54 %), dihidrotagetona (30,67 %) y verberona (16,03 %). En el presente estudio cis-tagetona y verberona no fueron mayoritarios para Bouwer, pudiendo ser esto consecuencia de la condición experimental de invernadero (diferente a la de campo) o por las variaciones anuales propias de la especie (Gil y col., 2000). Particularmente los valores aquí presentes para la población de Bouwer coincidieron con los obtenidos en un estudio realizado en la provincia de Chaco donde preponderaba dihidrotagetona (42,9 %) y cis-tagetona (16,8 %), cuyas proporciones se mantenían relativamente constantes en todas las muestras que fueron estudiadas en las distintas localidades de dicha provincia (Chamorro y col., 2008). En otro estudio realizado en la provincia de

Córdoba por Zygadlo y col. (1990), se encontró una gran variación en la composición de los volátiles de poblaciones de *T. minuta* proveniente de una misma región, que fue adjudicado a la composición de los suelos y la constitución genética. Por otro lado en un trabajo de revisión (Singh y col., 2016) se reportó la composición de los aceites de *T. minuta* producidos en distintos países, atribuyéndose su variabilidad a las diferencias alélicas entre poblaciones de los genes implicados en la vía metabólica de los aceites.

En el presente estudio se encontró una variabilidad a nivel interpoblacional en la composición de los aceites que puede estar relacionada con las características genéticas de cada una. Para atribuir estas diferencias a la historia de exposición a Pb en suelo y fenómenos de adaptación, sería necesario un estudio adicional, con análisis genéticos y un mayor número de poblaciones involucradas. No obstante, los resultados encontrados muestran una variabilidad intrapoblacional (entre individuos), relacionada no solo a la exposición de la planta a suelos contaminados, sino también a la capacidad de acumular Pb en las partes aéreas.

### **3.5. Integración de los resultados**

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos sobre la acumulación de metales pesados por parte de la especie *T. minuta* (Nawab y col., 2015; Salazar y Pignata, 2014; Salazar y col., 2016a; Salazar y col., 2016b; Sun y col., 2011), y también sobre la producción de aceites esenciales de esta especie y sus aplicaciones (Kumar y col., 2014; López y col., 2011; Negahban y col., 2013; Zygadlo y col., 1990), sin embargo muy pocos trabajos relacionan estos aspectos entre sí (Sosa y col., 2016) y con la respuesta fisiológica de la planta (Patel y Patra, 2014). En este contexto, el presente trabajo constituye un aporte novedoso al cuerpo de conocimiento en este tema de estudio.

Los resultados encontrados mostraron que la presencia de Pb en los suelos en los que crece *T. minuta*, independientemente de su población de origen, provoca un incremento en la incorporación de otros metales que son nutrientes esenciales, como así también un incremento de los pigmentos fotosintéticos y carotenoides (que para la población de Bouwer se reflejó también en un aumento de la biomasa aérea). Paralelamente se produjo un cambio en la composición de aceites esenciales asociado al

incremento de Pb en hoja; incrementándose la proporción de sabineno, limoneno,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -citral y verbenona para la población de Bouwer y de limoneno para la población de Intiyaco. Para el caso de la población de Bouwer también se vio reducida la proporción de dihidrotagetona. Resultados similares fueron reportados por Patel y Patra (2014). Estos autores hicieron crecer plantas de *T. minuta* en suelos enmendados, en una medida creciente de 0 a 100 %, con lodos residuales de curtiembres, los cuales estaban enriquecidos con diversos metales pesados, destacándose el Cr por presentar las concentraciones más elevadas. Observaron que a medida que aumentó el porcentaje de lodo hasta un 50%, la planta respondió incrementando clorofilas a y b, carotenos, actividad y concentración de enzimas antioxidantes, concentración de todos los metales en la parte aérea, producción de aceites esenciales; a su vez, dichos aceites aumentaron su composición porcentual de limoneno, cis-ocimeno (una forma de  $\beta$ -ocimeno) y tagetona. A partir de enmiendas superiores al 50%, todos estos parámetros comenzaron a reducirse perdiéndose la capacidad de acumular los contaminantes en la parte aérea. Por su parte, el contenido porcentual de dihidrotagetona fue reduciéndose a medida que aumentó el porcentaje de lodo, incluso desde los porcentajes de enmienda más bajos. Los resultados de Patel y Patra (2014) muestran que la respuesta fisiológica y la composición de aceites no estuvo relacionada con el ingreso del plomo a la raíz; pero mientras la concentración de metal en suelo esté por debajo de cierto umbral, la planta tiene la capacidad de dar una respuesta fisiológica y aumentar el contenido de algunos compuestos volátiles de manera tal que favorece la traslocación del metal a la hoja.

En el presente estudio se estaría corroborando esta misma estrategia para la misma especie, pero siendo Pb el metal contaminante en lugar del Cr. A los fines de determinar la concentración umbral de Pb para la cual este mecanismo deja de ser útil sería necesario realizar experimentos utilizando diferentes concentraciones de Pb en suelo.

#### **4. CONCLUSIÓN**

La variabilidad intrapoblacional de *T. minuta* para la capacidad de acumulación, traslocación y extracción neta de Pb es elevada en ambas poblaciones, sin existir una diferencia importante en la eficiencia fitoextractiva entre ellas. Sin embargo, el análisis

individuo por individuo de las poblaciones estudiadas mostró que cuando ocurre la traslocación del contaminante, hay una tendencia a acumularlo en el tallo para la población de Intiyaco y en hoja para la de Bouwer.

En cuanto a la supervivencia y producción de biomasa, la población de Intiyaco presentó un mejor rendimiento en términos de supervivencia, mientras que la población de Bouwer se destacó por la capacidad de incrementar la biomasa en respuesta a la presencia de Pb en suelo.

La especie estudiada, independientemente de su historia de exposición, responde ante la presencia de Pb en suelo modificando los exudados radicales, de manera tal que aumenta la solubilidad de otros elementos, los cuales son incorporados en los órganos de la planta en mayor medida que cuando el suelo está libre de Pb. La respuesta general observada para los exudados radicales y la incorporación de otros elementos a la planta estaría asociada a una estrategia para la reducción de los efectos tóxicos del Pb.

En cuanto a la respuesta fisiológica de la especie, se comprobó que ambas poblaciones responden de modo similar cuando crecen en suelos contaminados con Pb, mientras que pueden presentar diferencias cuando crecen en suelo control, indicando que la respuesta fisiológica frente al Pb en suelo es propia de la especie y no de la población previamente expuesta. La respuesta fisiológica frente a la exposición a Pb en suelo se destacó por consistir en un aumento de los pigmentos fotosintéticos y carotenos, con una disminución de la capacidad reductora no enzimática, mostrando que la especie no se ve estresada por la presencia del contaminante.

Si bien las poblaciones se comportaron fisiológicamente de la misma manera ante la presencia de Pb en suelo, al relacionar dicho comportamiento con la acumulación del metal dentro de la planta se encontraron algunas diferencias. La respuesta fisiológica de los individuos de Bouwer se asocia a la presencia del metal en la hoja, mientras que los de Intiyaco lo hacen ante la presencia del metal en la raíz. Ambas poblaciones mostraron un incremento de la capacidad reductora no enzimática a medida que acumulaban más Pb, sin embargo la población de Bouwer mostró ser más eficiente en la defensa contra el estrés oxidativo ya que no se incrementaron los valores de MDA, mientras que los de Intiyaco aumentaron.

En cuanto a la composición de aceites esenciales, ambas poblaciones mostraron quimiotipos muy diferentes. La población de Bouwer no modificó su composición frente a la exposición de Pb en suelo, mientras que la composición de los aceites de la población de Intiyaco si experimentó cambios en respuesta a dicho factor. No obstante, sí se encontraron relaciones entre la acumulación de Pb en la hoja y la composición de los aceites, incrementándose la proporción de sabineno, limoneno,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -citral y verbenona para la población de Bouwer y de Limoneno para la población de Intiyaco. Para el caso de la población de Bouwer también se vio reducida la proporción de dihidrotagetona. Si bien cada población respondió con cambios diferentes, esto puede deberse a la diferencia original de quimiotipos, estando ambas respuestas orientadas a incrementar la capacidad de tolerar y traslocar Pb.

En conclusión, *T. minuta* muestra características favorables para su uso en suelos contaminados con Pb y valores de efectividad fitoextractiva que son propios de la especie independientemente del historial de exposición al metal. No obstante, la población expuesta históricamente mostró algunas diferencias relacionadas a los mecanismos fisiológicos y de composición de aceites volátiles que alivian el estrés causado por la toxicidad del Pb.

El presente estudio sugiere que para la aplicación de un proyecto de fitoextracción de Pb utilizando *T. minuta* sería necesario seleccionar y desarrollar una línea de semillas que asegure un elevado porcentaje de individuos acumuladores, ya que la recolección a partir de poblaciones expuestas no es suficiente para garantizar un rendimiento superior. De todos modos, aunque se tuvieran individuos de bajo rendimiento, reemplazar en suelos agrícolas contaminados el cultivo de productos comestibles por el cultivo de esta especie aromática a fines de extraer sus aceites puede ser una óptima solución para el productor sin poner en riesgo al consumidor y llevar a cabo paralelamente una fitorremediación a largo plazo.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez PJJ, Illman WA (2006). Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models. Editorial Wiley.
- Andra SS, Datta R, Sarkar D, Saminathan SK, Mullens CP, Bach SB (2009). Analysis of phytochelatin complexes in the lead tolerant vetiver grass [*Vetiveria zizanioides*



- (L.)] using liquid chromatography and mass spectrometry. *Environmental Pollution*. 157:2173-2183.
- Arias M, Lenardon S, Taleisnik E (2003). Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the Sunflower chlorotic mottle virus. *Journal of Phytopathology*. 151:267-273.
- Arimura G-i, Ozawa R, Nishioka T, Boland W, Koch T, Kühnemann F, Takabayashi J (2002). Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*. 29:87-98.
- Becerril Soto JM, Barrutia Sarasua O, García Plazaola JI, Hernández A, Olano Mendoza JM, Garbisu Crespo C (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación.
- Blaylock MJ, Huang JW (2000). Phytoextraction of metals. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*. Editorial John Wiley & Sons, Inc:53-70
- Bu-Olayan AH, Thomas BV (2009). Translocation and bioaccumulation of trace metals in desert plants of Kuwait governorates. *Research Journal of Environmental Sciences*. 3:581-587
- Cecchi M, Dumat C, Alric A, Felix-Faure B, Pradère P, Guiesse M (2008). Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma*. 144:287-298
- Chamorro ER, Ballerini G, Sequeira AF, Velasco GA, Zalazar MF (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *The Journal of Argentine Chemical Society*. 96:80-86
- Cid CV, Rodriguez JH, Salazar MJ, Blanco A, Pignata ML (2016). Effects of co-cropping *Bidens pilosa* (L.) and *Tagetes minuta* (L.) on bioaccumulation of Pb in *Lactuca sativa* (L.) growing in polluted agricultural soils. *International journal of phytoremediation*. 18:908-917.
- Deng B, Du W, Liu C, Sun W, Tian S, Dong H (2012). Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *Plant Growth Regulation*. 66:37-47.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23:213-226
- Foyer CH, Harbinson J (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants:1-42
- Gil A, Ghersa C, Leicach S (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28:261-274
- Grover P, Rekhadevi P, Danadevi K, Vuyyuri S, Mahboob M, Rahman M (2010). Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *International journal of hygiene and environmental health*. 213:99-106
- Gupta AK, Verma SK, Khan K, Verma RK (2013). *Phytoremediation Using Aromatic Plants: A Sustainable Approach for Remediation of Heavy Metals Polluted Sites*. *Environmental Science & Technology*. 47:10115-10116

- Gupta D y col. (2009). Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown Zea mays seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials*. 172:479-484
- Gupta D, Huang H, Yang X, Razafindrabe B, Inouhe M (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione. *Journal of Hazardous Materials*. 177:437-444
- Hamid N, Bukhari N, Jawaid F (2010). Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. *Pak J Bot*. 42:239-246
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125:189-198
- Islam E y col. (2008). Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*. 154:914-926
- John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S (2012). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*. 3:65-76.
- Jones DL, Darrah PR (1994). Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*. 166:247-257.
- Kabata Pendias A (2011). Trace elements in soils and plants. Fourth edn. Editorial CRC Press, Boca Ratón, United States.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1979). Trace elements in the biological environment. Editorial Wyd Geol Warsaw (Po).
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001). Trace elements in soils and plants. Editorial CRC Press, Boca Ratón, United States.
- Karimian P, Kavooosi G, Amirghofran Z (2014). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4:219-227.
- Krzyszowska M, Lenartowska M, Samardakiewicz S, Bilski H, Woźny A (2010). Lead deposited in the cell wall of *Funaria hygrometrica* protonemata is not stable—A remobilization can occur. *Environmental Pollution*. 158:325-338.
- Kumar R, Sharma S, Ramesh K, Pathania V, Prasad R (2014). Irradiance stress and plant spacing effect on growth, biomass and quality of wild marigold (*Tagetes minuta* L.)—an industrial crop in western Himalaya. *Journal of Essential Oil Research*. 26:348-358.
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtílek M, Šetlík I (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*. 175:655-674.
- Lanaras T, Moustakas M, Symeonidis L, Diamantoglou S, Karataglis S (1993). Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiologia Plantarum*. 88:307-314.
- Larsen PB, Degenhardt J, Tai C-Y, Stenzler LM, Howell SH, Kochian LV (1998). Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant physiology*. 117:9-17.
- Leyva A, Quintana A, Sánchez M, Rodríguez EN, Cremata J, Sánchez JC (2008). Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify

- carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation. *Biologicals*. 36:134-141.
- Lichtenthaler HK (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. vol Volume 148. Academic Press, pp 350-382.
- López SB y col. (2011). Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes L.* species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitidis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59:5286-5292
- Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275
- Maestri E, Marmiroli M, Visioli G, Marmiroli N (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*. 68:1-13
- Maiz I, Esnaola MV, Millan E (1997). Evaluation of heavy metal availability in contaminated soils by a short sequential extraction procedure. *Science of the total environment*. 206:107-115
- Maldonado-Magaña A, Favela-Torres E, Rivera-Cabrera F, Volke-Sepulveda TL (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil*. 339:377-389
- Meyer CL, Kostecka AA, Saumitou-Laprade P, Créach A, Castric V, Pauwels M, Frérot H (2010). Variability of zinc tolerance among and within populations of the pseudometallophyte species *Arabidopsis halleri* and possible role of directional selection. *New Phytologist*. 185:130-142
- Mico C, Recatala L, Peris M, Sanchez J (2006). Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*. 65:863-872.
- Mihaliak CA, Couvet D, Lincoln DE (1989). Genetic and environmental contributions to variation in leaf mono- and sesquiterpenes of *Heterotheca subaxillaris*. *Biochemical systematics and ecology*. 17:529-533
- Mlala S (2015). Chemical Constituents and Biological Studies of *Tagetes minuta* L. and *Rauvolfia caffra* Sond. Master of Science, Chemistry Department, University of Fort Hare
- Moustakas M, Lanaras T, Symeonidis L, Karataglis S (1994). Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica (Czech Republic)*
- Nawab J, Khan S, Shah MT, Khan K, Huang Q, Ali R (2015). Quantification of heavy metals in mining affected soil and their bioaccumulation in native plant species. *International journal of phytoremediation*. 17:801-813
- Negahban M, Msaada K, Tafazoli E, Zakerin A (2013). Effect of Foliar Application of Diammmonium Phosphate on Morphological Characteristics and Constituents of Essential Oil of Mexican Marigold (*Tagetes minuta* L.). *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 7:11-18
- Neumann G (2007). Root exudates and nutrient cycling. In: Marschner P, Rengel Z (eds) *Soil biology. Nutrient cycling in terrestrial ecosystem*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Palma JM, Sandalio LM, Javier Corpas F, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:521-530.
- Palta JP (1990). Leaf chlorophyll content. *Remote sensing reviews*. 5:207-213.
- Parola R (2016). Expansión y senescencia foliar en soja (*Glycine max* L.): cambios redox y su modulación por condiciones de estrés. Doctorado en Ciencias Biológicas, IFRGV-CIAP-INTA, Universidad Nacional de Córdoba
- Patel A, Patra DD (2014). Influence of heavy metal rich tannery sludge on soil enzymes vis-à-vis growth of *Tagetes minuta*, an essential oil bearing crop. *Chemosphere*. 112:323-332
- Pinto AP, Mota AM, de Varennes A, Pinto FC (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of The Total Environment*. 326:239-247
- Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Żyłkiewicz B, Czerpak R, Kamińska M (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and experimental botany*. 66:507-513
- Posthuma L, Hogervorst RF, Joosse EN, Van Straalen NM (1993). Genetic variation and covariation for characteristics associated with cadmium tolerance in natural populations of the springtail *Orchesella cincta* (L.). *Evolution*:619-631
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213*. Springer, pp 113-136
- Prado C, Rodríguez-Montelongo L, González JA, Pagano EA, Hilal M, Prado FE (2010). Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *Journal of Hazardous Materials*. 177:546-553
- Punamiya P, Datta R, Sarkar D, Barber S, Patel M, Das P (2010). Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. *Journal of hazardous materials*. 177:465-474
- Rai R, Agrawal M, Agrawal SB (2016). Impact of Heavy Metals on Physiological Processes of Plants: With Special Reference to Photosynthetic System. In: Singh A, Prasad SM, Singh RP (eds) *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer Singapore, Singapore, pp 127-140.
- Ralph P, Burchett M (1998). Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*. 103:91-101
- Ríos JJ, Rosales MA, Blasco B, Cervilla LM, Romero L, Ruiz JM (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*. 116:248-255.
- Robert G, Muñoz N, Melchiorre M, Sánchez F, Lascano R (2014). Expression of Animal Anti-Apoptotic Gene Ced-9 Enhances Tolerance during *Glycine max* L.–*Bradyrhizobium japonicum* Interaction under Saline Stress but Reduces Nodule Formation. *PloS one*. 9:e101747
- Rodriguez E, da Conceição Santos M, Azevedo R, Correia C, Moutinho-Pereira J, Ferreira de Oliveira JMP, Dias MC (2015). Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. *Environmental Science and Pollution Research*. 22:574-585.

- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling & behavior*. 4:388-393
- Salazar MJ, Pignata ML (2014). Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration*. 137:29-36
- Salazar MJ, Rodriguez JH, Cid CV, Bernardelli CE, Donati ER, Pignata ML (2016a). Soil variables that determine lead accumulation in *Bidens pilosa* L. and *Tagetes minuta* L. growing in polluted soils. *Geoderma*. 279:97-108
- Salazar MJ, Rodriguez JH, Cid CV, Pignata ML (2016b). Auxin effects on Pb phytoextraction from polluted soils by *Tagetes minuta* L. and *Bidens pilosa* L.: Extractive power of their root exudates. *Journal of Hazardous Materials*. 311:63-69.
- Sánchez-Osorio I, López-Pantoja G, Tapias R, Pareja E, Domínguez L (2013) Emisión de monoterpenos foliares en alcornoques afectados por *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera: Cerambycidae). Paper presented at the 6to Congreso Forestal Español, España.
- Sánchez-Rodríguez E y col. (2010). Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*. 178:30-40
- Shahid M, Pinelli E, Pourrut B, Silvestre J, Dumat C (2011). Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74:78-84
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 2012
- Shirazi MT, Gholami H, Kavooosi G, Rowshan V, Tafsiry A (2014). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food science & nutrition*. 2:146-155
- Singh P, Krishna A, Kumar V, Krishna S, Singh K, Gupta M, Singh S (2016). Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* Species: a review. *Journal of Essential Oil Research*. 28:1-14
- Singh RP, Agrawal M (2007). Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere*. 67:2229-2240
- Sosa MdC, Salazar MJ, Zygadlo JA, Wannaz ED (2016). Effects of Pb in *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) leaves and its relationship with volatile compounds. *Industrial Crops and Products*. 82:37-43
- Sterckeman T, Duquène L, Perriguet J, Morel J-L (2005). Quantifying the effect of rhizosphere processes on the availability of soil cadmium and zinc. *Plant and soil*. 276:335-345
- Sun Y, Zhou Q, Xu Y, Wang L, Liang X (2011). Phytoremediation for co-contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals using ornamental plant *Tagetes patula*. *Journal of Hazardous Materials*. 186:2075-2082
- Szczodrowska A, Kulbat K, Leszczynska J (2013). Biosynthesis of defensive secondary metabolites of spice plants in answer to heavy metal stress condition.

- BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology. 94
- Szóllósi R, Varga IS, Erdei L, Mihalik E (2009). Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72:1337-1342.
- Trudic B, Kebert M, Popovic M, Štajner D, Orlovic S, Galovic V (2012). The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. *Bal For*. 18:214-227
- Vasudevan P, Kashyap S, Sharma S (1997). *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*. 62:29-35
- Vázquez AM, Demmel GI, Criado SG, Aimar ML, Cantero JJ, Rossi LI, Velasco MI (2011). Phytochemistry of *Tagetes minuta* L.(Asteraceae) from Córdoba, Argentina: Comparative study between essential oil and HS-SPME analyses. *Bol Latinoamer Caribe Plant Med Aromat*. 10:351-362
- Wannaz ED, Carreras HA, Abril GA, Pignata ML (2011). Maximum values of Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in the biomonitor *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae): Relationship with cell membrane damage. *Environmental and Experimental Botany*. 74:296-301
- Wenzel W, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O (2003). Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*. 123:131-138
- Wienhold B, Andrews S, Karlen D (2004). Soil quality: a review of the science and experiences in the USA. *Environmental Geochemistry and Health*. 26:89-95
- Wu G, Kang H, Zhang X, Shao H, Chu L, Ruan C (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*. 174:1-8
- Xu W, Li W, He J, Singh B, Xiong Z (2009). Effects of insoluble Zn, Cd, and EDTA on the growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*. *Journal of Environmental Sciences*. 21:186-192.
- Zhu XF y col. (2011). Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*. *Plant, cell & environment*. 34:1055-1064
- Zygadlo JA, Grosso NR, Abburra RE, Guzman CA (1990). Essential oil variation in *Tagetes minuta* populations. *Biochemical systematics and ecology*. 18:405-407