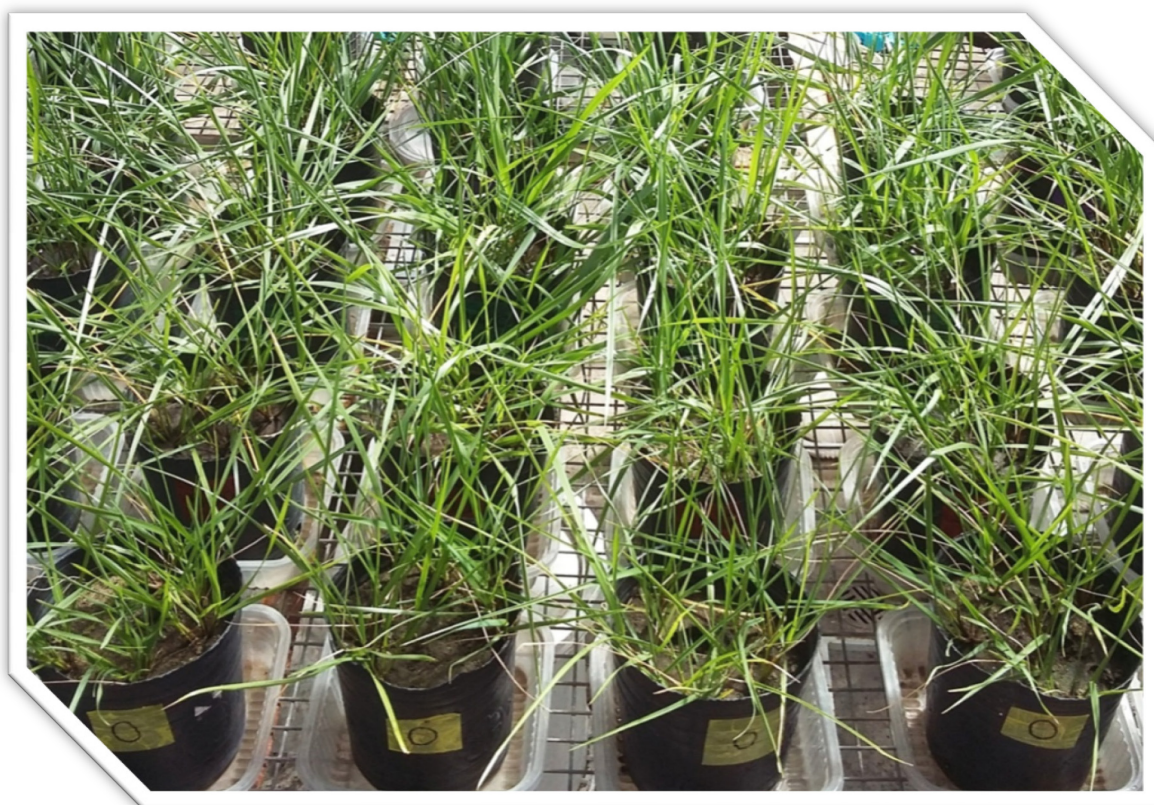




Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

## Trabajo Final



### **Estrategia de adaptación al exceso de Zn (II). Estudio sobre germinación y crecimiento de *Festuca arundinacea* Schreb. en invernáculo**

**Alumno:** Matías Alberto González.

**Directora:** Dra. Ing. Ftal. Marcela Ruscitti (INFIVE FCAyF- UNLP).

**Co-directora:** Dra. Ing. Amb. Josefina Plaza Cazón (CINDEFI FCEX – UNLP).

**La Plata, 2018**

# Índice

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
2.1. La contaminación ambiental .....	4
2.2. Los contaminantes y los metales pesados .....	5
2.3 Efectos tóxicos de los metales pesados .....	9
2.4 Fitorremediación .....	10
2.3 El zinc como micronutriente y contaminante .....	11
2.4 <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. como especie remediadora.....	12
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>6.1. Ensayos de germinación</b> .....	<b>18</b>
<b>6.1.1. Longitud de la radícula</b> .....	<b>18</b>
<b>6.1.2. Porcentaje de germinación</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1.3. Peso seco de las plántulas</b> .....	<b>23</b>
<b>6.2. Ensayos de crecimiento</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2.1. Peso seco de las plantas</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2.2. Área Foliar</b> .....	<b>26</b>
<b>6.2.3. Conductividad relativa de las membranas celulares</b> .....	<b>26</b>
<b>6.2.4. Contenido de malondialdehído(MDA)</b> .....	<b>27</b>
<b>6.2.5. Contenido de clorofila y carotenoides</b> .....	<b>29</b>
<b>6.2.6. Contenido de proteínas</b> .....	<b>31</b>
<b>6.2.7. Contenido de prolina</b> .....	<b>34</b>
<b>6.2.8. Contenido de zinc</b> .....	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
7.1. Conclusión General.....	38
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>
<b>8. ANEXO. TABLAS DE ESTADÍSTICA</b> .....	<b>46</b>

# 1. RESUMEN

Los metales pesados son contaminantes no biodegradables, ampliamente utilizados en la industria y actividades mineras, relativamente abundantes que ocasionan graves perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos y ecosistemas, contaminando el suelo, el aire y el agua. El zinc, a pesar de ser un micronutriente, en altas concentraciones se considera un metal pesado que puede originar serios problemas en la salud humana y animal, que en casos de intoxicación grave causan la muerte. Existen técnicas viables para la restauración de suelos, entre ellas la fitorremediación que se basa en el empleo de especies vegetales para descontaminar suelos y recuperar los ecosistemas afectados. El objetivo de este trabajo fue estudiar, en condiciones controladas, las estrategias fisiológicas empleadas por plantas de *Festuca arundinacea* Schreb. 'Malma' que son capaces de crecer en ambientes con alta concentración de zinc, para determinar si esta especie podría ser utilizada como fitorremediadora. Se evaluaron parámetros de germinación (porcentaje de germinación, longitud radicular y peso seco de plántulas) y de crecimiento (biomasa total, área foliar, conductividad relativa de las membranas, contenido de malondialdehído (MDA), clorofila, carotenos, proteínas, prolina y contenido de zinc en parte aérea y raíz). Se observó una marcada disminución de la longitud y el peso seco radicular a concentraciones crecientes de zinc, sin que haya modificaciones en el porcentaje de germinación. La biomasa, el área foliar, el contenido de clorofila, carotenos y proteínas en la parte aérea presentaron una disminución con el aumento de la concentración de zinc mientras que sucedió lo contrario con el contenido de MDA, conductividad relativa de las membranas, proteínas en las raíces y prolina. Se evidenció que esta especie tiene la capacidad de absorber y acumular gran cantidad de zinc en su biomasa sin afectar significativamente su crecimiento por lo que esta especie podría ser utilizada como fitoestabilizadora en programas de fitorremediación para zinc.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. La contaminación ambiental

En los últimos años la contaminación se ha convertido uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro planeta. Esta se genera por la introducción de sustancias que pueden ejercer un efecto dañino sobre los organismos vivos en los ecosistemas. Generalmente se relaciona a la actividad antrópica que dispersa sustancias; algunas de las cuales pueden ser transformadas por organismos vivos (biodegradables) mientras que otras son persistentes (no biodegradables). Zúñiga (1999) destaca que las biodegradables pueden causar daños ecológicos importantes, sin embargo a corto plazo serán degradadas; en cambio las no biodegradables ingresarán en la red trófica y a lo largo de los niveles se incrementará su concentración lo que puede causar problemas al ecosistema y finalmente afectar la salud. Navarro Aviñó *et al.* (2007) distinguen que a pesar de que la contaminación se relaciona a la actividad antrópica hay causas naturales que la provocan como la actividad volcánica, los procesos de formación de los suelos, la erosión de las rocas, los terremotos, tsunamis, entre otros.

Dentro de las causas antropogénicas cabe destacar la explotación de minerales metalíferos que constituye una actividad económica relevante en Latinoamérica desde la colonización española en el siglo XVI con un desarrollo discontinuo y variable en Argentina. Kirschbaum *et al.* (2012) señalan los numerosos pasivos mineros que se generaron, en el siglo XX, especialmente en el noroeste de nuestro país, producto de operaciones discontinuadas y sin una clausura adecuada. En la Figura 1 se observa uno de estos pasivos y como sus efluentes se diseminan e impactan en el medio ambiente a través de la dispersión del polvo y/o la lixiviación del mineral, afectando negativamente la calidad del agua, de los suelos y alterando los ecosistemas que los contienen.



**Figura 1.** Contaminación en San Antonio Oeste, Río Negro, causada por los residuos de la Fundición Geotecnia que operó entre 1960 y 1984. Se extraía Zn y Ag de los minerales provenientes de la Mina Gonzalito.

**Fuente:** Cipolletti Digital, mayo 2018.

Otra causa importante de contaminación antropogénica es la expansión demográfica que provoca la cercanía de la frontera urbana a las zonas agrícolas, como se observa en la Figura 2A, lo que conlleva a la contaminación de las mismas. Schnitzler *et al.* (1999) afirman que, debido al crecimiento de las poblaciones urbanas, la horticultura en suelos urbanos y periurbanos aparece como una alternativa para proveer alimentos y como medio de empleo de los emigrantes de áreas agrícolas. Madaleno (2001) aporta que la agricultura urbana existe desde hace mucho tiempo en países en desarrollo, y en América Latina es en la actualidad una estrategia de supervivencia. En Argentina, existen políticas de promoción de la agricultura pública urbana a nivel nacional y a nivel local. En las investigaciones realizadas por Ratto *et al.* (1999), Marbán *et al.* (1999) y Giuffré *et al.* (1999) se alertó sobre la presencia de metales pesados en suelos urbanos y suburbanos de Buenos Aires. Estos pueden provenir de los residuos generados por las ciudades que no son correctamente tratados, sino que son desechados, junto a residuos de industrias, en cursos de agua como se observa en la Figura 2B, causando, no solo la contaminación de los mismos, sino también de los suelos y de los acuíferos, los que son fuente de abastecimiento de agua de consumo de diversas poblaciones (Bidegain y Jurado, 2011). Gbadegesin y Olabode (2000) explican que los suelos destinados a este uso pueden considerarse de “*uso sensible*” desde el punto de vista ecotoxicológico, por lo que la acumulación de metales pesados en suelos de ambientes urbanos requiere la atención de urbanistas y ambientalistas, para prevenir su lixiviación a las napas de agua y minimizar el riesgo para la salud.



**Figura 2.A.** En el fondo, el Country “La Cascada” en Pilar; delante, una mujer trabajando en cultivos de hojas a campo. **2.B.** Visible contaminación del Arroyo “El Gato”. Es un curso de agua de Buenos Aires, que forma parte de la cuenca del Río Santiago, que a su vez es tributario del Río de La Plata.

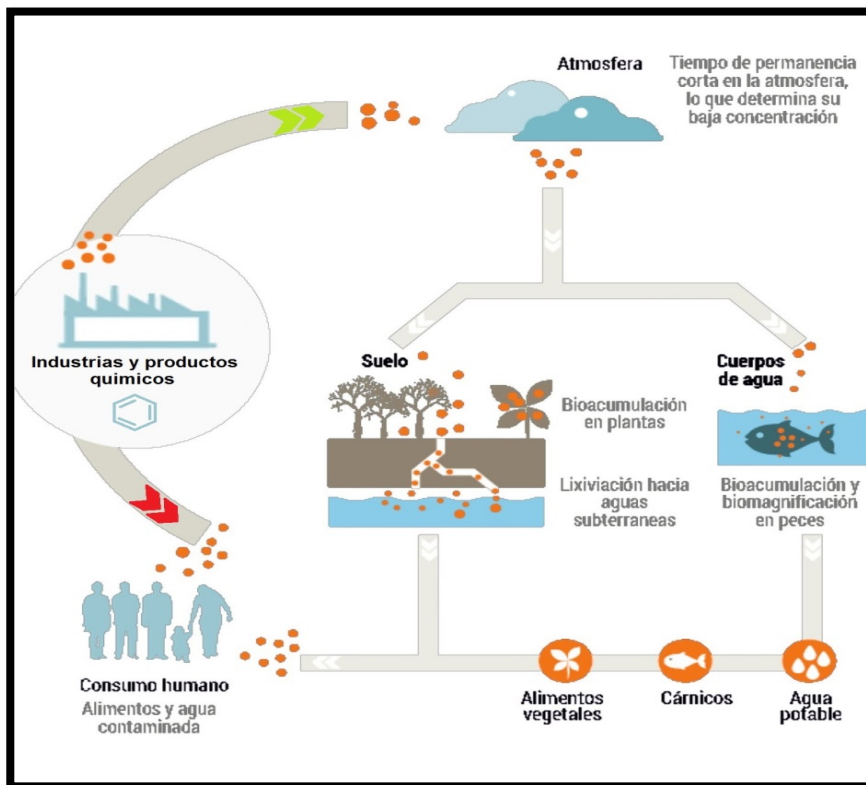
**Fuente:** Reestructuraciones en la Horticultura del AMBA, noviembre 2017.

## 2.2. Los contaminantes y los metales pesados

La contaminación ambiental puede estudiarse atendiendo a tres elementos básicos de los ecosistemas: agua, aire y suelo. Los contaminantes pueden generarse o depositarse en cualquiera de los tres y moverse de un elemento a otro hasta llegar a la biota donde ocasionan daños e ingresan a las redes tróficas. La situación del suelo es destacable, ya que a él llegan generalmente los contaminantes que provienen del aire

y del agua. El exceso de productos nocivos en el suelo puede ser atemperado por la función amortiguadora del mismo. Sin embargo tanto Felipó y Garau (1987) como Ritchie y Sposito (1995) afirman que dicha capacidad no es ilimitada, sino que depende de las propiedades físico-químicas de las sustancias introducidas y almacenadas, de las propiedades y características edáficas y de las condiciones ambientales imperantes en el medio. La contaminación del aire y del agua es la más evidente y la más estudiada. Actualmente se han desarrollado tecnologías para disminuir y controlar la contaminación tanto del aire como del agua. A pesar de que hay gran cantidad de métodos para remediar los suelos como demuestra la recopilación de Zúñiga (1999) en la actualidad los estudios sobre los mismos y su utilización son aún escasos.

Entre los distintos tipos de contaminantes del suelo se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los metales pesados, estos últimos son especialmente peligrosos dado que tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. En la Figura 3 se grafica el ciclo de los contaminantes y cómo logran incorporarse al consumo humano. Angelova *et al.* (2004) explican este fenómeno con la bioacumulación que es un aumento en la concentración de un producto químico dentro de un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente. Lucho *et al.* (2005) mencionan que los productos químicos se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por vía del alimento, el agua o el aire. No pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas en los seres vivos (Abollino *et al.*, 2002) concluyen que los metales pesados pueden incorporarse a un sistema por medio de residuos industriales o mineros que son vertidos sin previos tratamientos, los que



**Figura 3.** Ciclo y bioacumulación de metales pesados a lo largo de la cadena trófica.

**Fuente:** Conciencia, Salud y Ambiente, marzo 2016.

posteriormente se depositan en lagos, ríos y distintos sistemas acuíferos (García y Dorronsoro, 2005).

Cuando se menciona el término metal pesado se lo interpreta como un elemento tóxico, lo cual es, en cierta parte, incorrecto, ya que no todos los metales pesados son tóxicos ni todos los elementos tóxicos son metales pesados. Según la definición de Passow *et al.* (1961) “*los metales pesados constituyen un grupo cercano a 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm<sup>3</sup>*”. Cañizares-Villanueva (2000) destaca que alguno de los elementos considerados como metales pesados son esenciales para el crecimiento de las plantas como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Zn y Mo pero que, en altas concentraciones, se han reportado que tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar proteínas. Kabata-Pendias (2000) concuerda en que ciertos elementos, considerados metales pesados como el Cu, Se y Zn son esenciales para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos y en particular en el cuerpo humano. Sin embargo, en altas concentraciones pueden conducir al envenenamiento. Otra definición propuesta por Fergusson (1990) los categorizan como “elementos pesados” (Pb, As, Se, Cd, Hg, Sb, Tl, In, Bi, Te, U, etc.) que son tóxicos para los humanos. Son ampliamente utilizados en la industria, relativamente abundantes y ocasionan graves perturbaciones a los ciclos biogeoquímicos. Clemens (2001) concluye que la causa primaria del elevado nivel de toxicidad química se debe a que los metales pesados tienen afinidad con moléculas orgánicas a las que se unen estrechamente, a través de grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. A través de estas uniones ligando-metal alteran funciones biológicas esenciales.

Diversos trabajos han demostrado la contaminación por metales pesados en nuestro país, a continuación se citan algunos. En el área metropolitana y suburbana de Buenos Aires, Llosa *et al.* (1990) estimaron el grado de contaminación por Pb, Cd, Zn y Cu en muestras de suelo situadas en las cercanías de industrias que procesan dichos elementos encontrando concentraciones de Pb de 237-12418 mg.kg<sup>-1</sup>, de Cd de 0,7-3,4 mg.kg<sup>-1</sup>, de Zn de 205-3400 mg.kg<sup>-1</sup> y de Cu de 19,6-1467,5 mg.kg<sup>-1</sup>. En Ensenada, provincia de Buenos Aires, Labunska *et al.* (2000) tomaron muestras de agua y de sedimentos de canales y arroyos donde se vierten desechos industriales que desembocan en el Río de la Plata. El análisis reflejó contaminación por una gama de contaminantes orgánicos (principalmente relacionados con el petróleo) y metales pesados (Pb 236 mg.kg<sup>-1</sup>, Mn 389 mg.kg<sup>-1</sup>, Cu 143 mg.kg<sup>-1</sup>, Zn 626 mg.kg<sup>-1</sup>, entre otros). En las localidades Cordobesas de Yocsina y Río Tercero Bermudez *et al.* (2011) examinaron en granos de trigo y su rastrojo las concentraciones de metales pesados encontrando que las concentraciones medias de Cr, Cu, Fe, Mn y Zn sobrepasaron los límites de tolerancia establecidos en la legislación internacional para granos de trigo y productos alimenticios. Cuando las concentraciones de Ba, Co, Cr y Zn en la capa superior del suelo fueron mayores que los umbrales de la legislación para suelos agrícolas y residenciales, las concentraciones en granos de trigo también aumentaron. En la Laguna de Chascomús, provincia de Buenos Aires, Barla *et al.* (2005) analizaron la contaminación por Cu, Zn y Cr y se consideró su

biomagnificación, estos elementos se midieron en agua, sedimentos de la laguna, músculos y vísceras de peces, músculos de almejas, en fitoplancton y zooplancton donde se encontraron valores elevados para los tres elementos analizados, superando los valores límites para la vida acuática. En el agua los valores fueron de 1,78 mg.l<sup>-1</sup> de Cu, 0,19 mg.l<sup>-1</sup> de Zn y 0,12 mg.l<sup>-1</sup> de Cr, en los sedimentos las concentraciones eran mayores y en la cadena trófica la concentración aumentó a medida que se avanzó en el nivel trófico. En la zona costera de Sarandí, provincia de Buenos Aires, se encuentra asentado un pulmón verde de aproximadamente 420 ha donde funciona un conjunto de establecimientos frutihortícolas. Machalec *et al.* (2011) determinaron la calidad de los productos cosechados demostrando que poseen concentraciones de As, Pb y Cd por encima de los niveles de referencia indicados por el Código Alimentario Argentino en diferentes variedades vegetales, que en algunos casos coinciden con las elevadas concentraciones de los mismos analitos en suelo, de acuerdo a las especificaciones del Decreto 831/93 para suelo de uso agrícola. En la ciudad de Mendoza, Martí *et al.* (2011) determinaron los contenidos totales de Pb, Cd, Zn y Cu en la capa superficial de suelos diferentes entre los cuales se encontraban suelos de agricultura intensiva encontrando niveles elevados de Cu y Cd con medias de 39,3 y 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> respectivamente. En la zona del Oasis Norte, también en Mendoza, se encuentra el llamado “Cinturón Verde”, en el que se demandan cantidades importantes de agua para riego y hay un gran uso de agroquímicos, cuyos excesos se lixivian hacia los acuíferos, provocando un impacto negativo en zonas aguas abajo, donde el recurso se usa para riego y consumo humano. Esta zona es monitoreada por un grupo de investigación desde el año 1999. Zuluaga *et al.* (2013) evaluaron parámetros de calidad del agua de riego, superficial, subterránea y de drenaje a lo largo del ciclo agrícola encontrando cadmio, prácticamente en todos los muestreos. Sus valores superaron los tenores máximos permitidos de 0,01 mg.l<sup>-1</sup> que establece la Resolución 778, así como el valor establecido por el Anexo 3 del EPAS para aguas de riego. Desde el año 2003, Chaca *et al.* (2014), en la provincia de San Luis, estudian como la contaminación por Cd y As influye en la producción de *Glycine max* L. (soja) observándose en la Figura 4 la disminución de la biomasa de la misma. Esta contaminación proviene del uso por largos períodos de tiempo de pesticidas o fertilizantes fosfatados que contienen trazas de Cd y a la alta radicación industrial con falta de controles ambientales lo que contribuye al aumento de su concentración en el ambiente, incrementando el riesgo ecotoxicológico. También, la presencia de As en suelos volcánicos produce una considerable preocupación respecto de la captación por parte de las plantas y la subsiguiente entrada en la cadena alimentaria humana y animal. Los ensayos encontraron altos valores de Cd en la parte aérea de plántulas (1454 mg.kg<sup>-1</sup> MS). En muestreos de suelo realizados en el pasivo minero “La Concordia” localizada a 15 km al ONO de la localidad de San Antonio de los Cobres, provincia de Salta, se detectó la presencia de elevadas concentraciones de Zn (98 mg.kg<sup>-1</sup>), Pb (105 mg.kg<sup>-1</sup>), Fe (12000 mg.kg<sup>-1</sup>) y Cu (37 mg.kg<sup>-1</sup>) (Guisande-Donadio *et al.*, 2016).





**Figura 4.** Ensayo comparativo del crecimiento de *Glycine max* L. con contaminación por cadmio (Izquierda).  
*Fuente:* Argentina Investiga, Noviembre 2013.

### **2.3 Efectos tóxicos de los metales pesados**

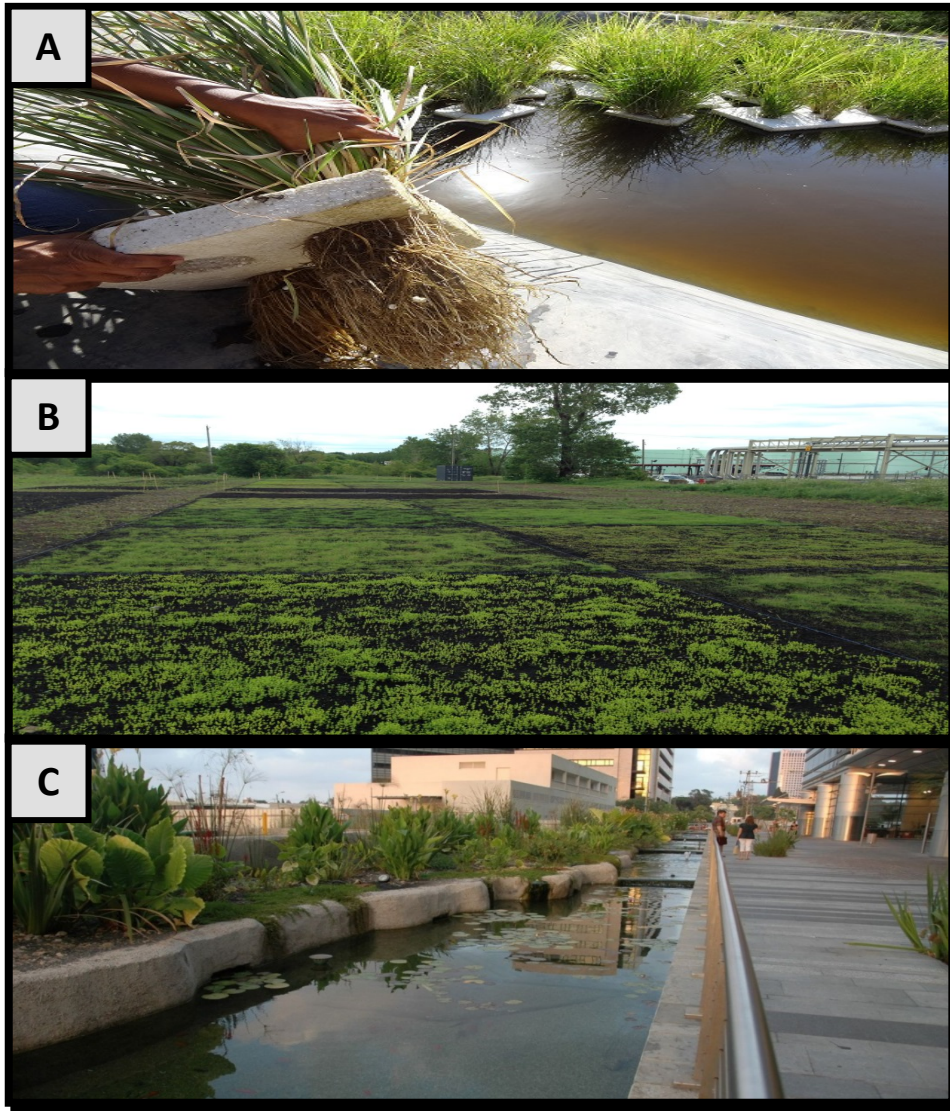
Sarmiento *et al.* (1999), Margas Marcos (2005) y Franco *et al.* (2016), concuerdan en que el exceso de metales pesados puede originar serios problemas en la salud humana y animal, que en casos de intoxicación grave puede causar la muerte. Diversos trabajos como los de De Vos *et al.* (1989), Lidon y Henriques (1992), Murphy y Taiz (1997), Shen *et al.* (1998) y Murphy *et al.* (1999) refieren que en plantas pueden producir diversos efectos tóxicos, como clorosis de hojas, alteración de procesos fisiológicos fundamentales como la fotosíntesis y la transpiración, y/o el incremento de electrolitos libres en las células debido al daño en las membranas celulares. En definitiva acontece la inhibición del crecimiento de las plantas y, en consecuencia, de su rendimiento. No obstante contrastan que hay plantas que han desarrollado mecanismos para atemperar los efectos adversos de los metales pesados, usando diferentes estrategias como la exclusión, mecanismo que consiste en evitar la absorción excesiva y el posterior transporte de los iones metálicos (Wei *et al.*, 2008). Estas plantas usualmente acumulan concentraciones relativamente bajas de metales en sus tejidos aunque crezcan en suelos altamente contaminados. Hall (2002) aporta a esta idea afirmando que en otros casos, las raíces de algunas especies secretan compuestos orgánicos que pueden ligar los metales pesados en el suelo y reducir su absorción a través de las células radicales. Neumann *et al.* (1995), Lou *et al.* (2004), Konno *et al.* (2005) añaden que otras plantas pueden retener los metales en las paredes celulares, reduciendo así su translocación a la parte aérea. Por otro lado tanto Clemens (2001) como Hall (2002), afirman que algunas raíces pueden absorber cantidades elevadas de metales y transportarlos a los tallos, de manera que los iones metálicos son detoxificados por compartimentalización vacuolar o acomplejados con ligandos orgánicos, como ácidos orgánicos, aminoácidos y péptidos que pueden reducir la toxicidad.

## 2.4 Fitorremediación

Con el objetivo de disminuir la lixiviación de los metales y la contaminación de acuíferos, la inmovilización se realiza mediante técnicas que pueden clasificarse en químicas, biológicas y físicas. Dentro de las biológicas, Zúñiga (1999) destaca a las plantas acumuladoras de metales pesados que absorben metales en altas concentraciones sin sufrir grandes daños y constituyen una opción de bajo costo para la descontaminación del suelo, sin embargo la restauración del suelo por esta técnica es de largo plazo.

En las últimas décadas del siglo XX las tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar suelos y recuperar los ecosistemas afectados fueron mejorando. Cuando se basan en el uso de plantas, reciben el nombre de fitorremediación, definida como el uso de plantas vivas para eliminar los contaminantes del entorno o para reducir su peligrosidad (Cunningham *et al.*, 1995). Salt *et al.* (1998) mencionan ventajas que reúnen este grupo de fitotecnologías, especialmente la limpieza y el bajo costo; no utilizan reactivos químicos peligrosos, ni afectan negativamente a la estructura del suelo, sólo aplican prácticas agrícolas comunes; además, el proceso se realiza 'in situ' evitando costosos transportes. Cuando las plantas han absorbido contaminantes inorgánicos, como metales pesados, pueden ser cosechadas y desechadas. La incineración controlada es el método más común para disponerlas. Posteriormente las cenizas pueden ser apartadas y depositadas en sitios donde no contaminen o reutilizadas para diversos fines como es la fabricación de bloques para la construcción. Cañizares-Villanueva (2000) y Cuizano y Navarro (2008) proponen el uso de la biosorción de los metales por bacterias y algas como método para recuperarlos y reutilizarlos. En las Figuras 5A, B y C se aprecian ejemplos del uso práctico de esta tecnología en diversos lugares. A continuación se distinguen algunas de las variables con las cuales las plantas regulan o controlan los niveles de contaminantes:

- **Fitoextracción:** uso de plantas acumuladoras de contaminantes para retirarlos del suelo mediante su absorción y concentración en las partes cosechables.
- **Fitoestabilización:** uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, mejorando sus propiedades físicas y químicas.
- **Fitoinmovilización:** uso de las raíces para la fijación o inmovilización de los contaminantes en el suelo.
- **Fitovolatilización:** uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio mediante su volatilización, y para eliminar contaminantes del aire.
- **Fitodegradación:** uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.



**Figuras 5.A.** Aplicación del Sistema Vetiver en el Proyecto de la Universidad de Tarapacá (Chile, 2015). **5.B.** Uso de la fitorremediación para recuperar sitios industriales para futuro uso agrícola (Canadá, 2016). **5.C.** Agua gris de un edificio de apartamentos tratada a través de fitorremediación para su reutilización (Israel, 2015).

**Fuente:** Agriculturers, junio 2015, Institut de recherche en biologie végétale, enero 2016, Israel 21c, noviembre 2015.

### 2.3 El zinc como micronutriente y contaminante

El zinc, en particular, es un microelemento esencial para el normal crecimiento de las plantas, interviniendo sobre los procesos fotosintéticos, la regulación y la síntesis de aproximadamente 2800 proteínas y el mantenimiento de la integridad de las membranas de la raíz. Se requiere para la síntesis de carbohidratos durante la fotosíntesis y en la transformación de los azúcares en almidón. Webb (1994) agrega que este elemento tiene un papel en la resistencia/tolerancia a organismos patógenos. Existen tres enzimas en las cuales el Zn(II) participa activamente como cofactor: la deshidrogenasa alcohólica, la anhidrasa carbónica y la dismutasa de superóxidos. Taiz y Zeiger (2002) y Cakmak (2015) aportan que participa en el metabolismo de hormonas al regular el nivel de auxinas a través de la síntesis del aminoácido triptófano. Sin embargo, a pesar de ser un nutriente esencial, en elevadas concentraciones resulta fitotóxico. Algunos síntomas de toxicidad por efecto del Zn(II), descritos por Sagardoy *et al.* (2009), Efroymson *et al.* (1997) y Marschner (1998)

incluyen la clorosis y daños al sistema radicular, crecimiento reducido de la planta, inhibición de la fijación del CO<sub>2</sub>, transporte de los hidratos de carbono en el floema y la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares. Además Yang *et al.* (2004) han encontrado que los iones zinc interfieren en los movimientos estomáticos, perturbando el flujo del agua a través de las membranas.

#### **2.4 *Festuca arundinacea* como especie remediadora**

En la bibliografía se describen diversos relevamientos en zonas contaminadas con metales pesados que fueron realizados con el objetivo de identificar especies para un posible uso en fitorremediación. Malignani (2017) realizó un relevamiento en 88 sitios de cuencas urbanas y periurbanas de Buenos Aires sometidos a contaminación mixta (río Matanza-Riachuelo, frente estuarial del Río de la Plata, río Reconquista y arroyo Buñirigo). Se identificaron 248 especies en el total de los sitios relevados. Más de la mitad de las especies correspondieron al grupo funcional de plantas herbáceas. Una de las especies dominantes entre las herbáceas, fue *Festuca arundinacea*. En el pasivo minero “La Concordia” en Salta (Guisande-Donadio *et al.*, 2016) se encontró un total de ocho especies vegetales diferentes adaptadas a rigurosas condiciones, tanto climáticas como relacionadas a la contaminación. Uno de los géneros identificados fue *Festuca* (Figura 6). Este género comprende aproximadamente unas 450 a 600 especies, muchas de las cuales se consideran excelentes forrajeras y se las cultiva para tal fin. Son gramíneas muy difundidas y capaces de adaptarse a los más diversos tipos de suelos y climas, muy resistentes al pisoteo, agresivas, invasivas y persistentes. Ben Naceur (1994) destaca que son plantas pioneras que sobreviven donde muchas especies leñosas no son capaces de hacerlo y constituyen en algunas áreas el único alimento disponible. Algunas especies están adaptadas a suelos áridos, calizos, arenosos, yesosos, salobres o tóxicos, con exceso de aluminio, cobre, mercurio y otros metales. Investigaciones realizadas por Li *et al.* (2000), Qu *et al.* (2003) y Soleymani *et al.*



**Figura 6.** *Festuca arundinacea* Schreb. en su hábitat.

**Fuente:** Plant Sciences and Plant Pathology, septiembre 2011.

(2009) demostraron que *Festuca arundinacea* es capaz de absorber y tolerar altas concentraciones de metales, como plomo, níquel, cadmio y zinc. Además se la ha propuesto en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Parrish *et al.*, 2004, Ho *et al.*, 2007), de metales pesados en el compost de residuos sólidos municipales o barros cloacales contaminados (Boswel, 1975, Zhao *et al.*, 2013) y de metales pesados en suelos contaminados por la filtración de los desechos de minas (Zhu *et al.*, 1999), entre otros ejemplos. Dada esta capacidad para extraer los metales

del suelo es considerada y evaluada para programas de fitorremediación de suelos contaminados.

### 3. HIPÓTESIS

*Festuca arundinacea* es capaz de tolerar y absorber en su biomasa concentraciones elevadas de zinc sin afectar significativamente su crecimiento, pudiendo ser utilizada para programas de fitorremediación.

### 4. OBJETIVO

#### 4.1. Objetivo general

Caracterizar, en condiciones controladas, las estrategias fisiológicas por medio de las cuales *Festuca arundinacea* es capaz de crecer en ambientes extremos con alta concentración de Zn (II).

#### 4.2. Objetivos particulares

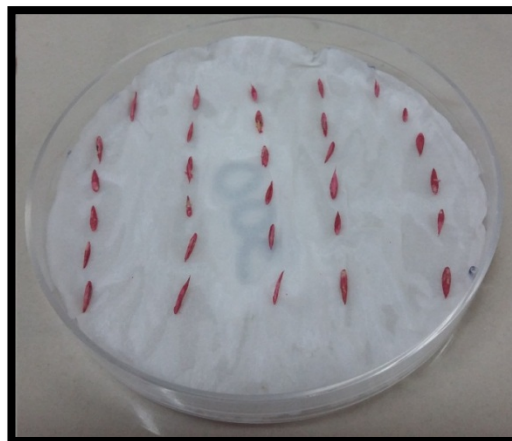
- ✚ Evaluar la germinación y el crecimiento de plantas de *Festuca arundinacea* de tres cultivares ('Malma', 'Baralta' y 'Flexible') en presencia de distintas concentraciones de Zn(II).
- ✚ Determinar las respuestas morfológicas (biomasa de raíz y de parte aérea), fisiológicas (conductancia estomática, permeabilidad de membranas celulares), y bioquímicas (contenido de clorofila y carotenos, proteínas solubles, prolina, malondialdehído) producidas ante esta situación de estrés
- ✚ Identificar las estrategias desarrolladas por esta especie ante la presencia en el suelo de exceso de Zn(II), en función de donde se acumule el metal en la planta.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en condiciones controladas en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas (UNLP). Se realizaron dos ensayos, uno de germinación y otro de crecimiento, que se detallan a continuación:

#### 5.1. Ensayo de germinación

Las semillas de *Festuca arundinacea* de 3 cultivares distintos ('Malma', 'Baralta' y 'Flexible') fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y colocadas en cajas de Petri (14 cm de diámetro), sobre papel de filtro humedecido con 2 ml de agua o de las diferentes soluciones de zinc a evaluar como se observa en la Figura 7. Posteriormente se colocaron en estufa de germinación a 28°C y oscuridad. Se seleccionaron estos tres cultivares por la disponibilidad de semilla de los mismos y con el objetivo de realizar ensayos comparativos. Una vez emergidas se llevaron a una cámara de crecimiento con luz y temperatura controlada. Se utilizaron 30 semillas por caja y 3 repeticiones (cajas) por tratamiento (Ruscitti *et al.*, 2011). El zinc fue aplicado en forma de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y las concentraciones fueron elegidas en función a determinaciones realizadas in situ, en ensayos previos, quedando determinados los siguientes tratamientos:



**Figura 7.** Disposición de las semillas de *Festuca arundinacea* Schreb en la caja de Petri.

- 1) Control (agua destilada).
- 2) Solución 300  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 3) Solución 600  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 4) Solución 900  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 5) Solución 1200  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 6) Solución 1500  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 7) Solución 1800  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 8) Solución 2100  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 9) Solución 2400  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 10) Solución 2700  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .
- 11) Solución 3000  $\mu M$  de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .

Se contó semanalmente la cantidad de semillas germinadas por caja de Petri con el objetivo de determinar el porcentaje de germinación y al finalizar el ensayo, 28-30 días después aproximadamente, se midió la longitud de la radícula y el peso seco de la parte aérea y radicular.

El diseño del experimento fue completamente aleatorizado. El número de repeticiones (n) fue 3 por tratamiento y 30 semillas por repetición. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5% (Statgraphics Centurion). Los datos porcentuales de germinación se transformaron previamente en arcoseno para su análisis estadístico y así aumentar la homogeneidad.

## 5.2. Ensayo de crecimiento

Diez semillas de *Festuca arundinacea* 'Malma' fueron desinfectadas superficialmente con NaClO (10%) durante 5 minutos, enjuagadas con agua estéril y sembradas en macetas de 500 cm<sup>3</sup> de capacidad, con una mezcla tierra-arena (1:1) como se observa en la Figura 8. Posteriormente se raleó hasta que quedaron 5 plantas por maceta. Cuando presentaron dos hojas expandidas se comenzaron los tratamientos con aplicación de 100 ml de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, semanalmente, en las distintas concentraciones a ensayar observadas en el Cuadro 1. De esta forma quedaron definidos los siguientes tratamientos:

**Cuadro 1.** Concentraciones de Zn (II) en los distintos tratamientos.

Soluciones (µM)	Zn (II) por maceta	Zn (II) por aplicación
Control (0 µM)	-	-
500 µM	234 mg.kg <sup>-1</sup>	32,7 mg.l <sup>-1</sup>
1000 µM	332 mg.kg <sup>-1</sup>	65,4 mg.l <sup>-1</sup>
1500 µM	430 mg.kg <sup>-1</sup>	98,07 mg.l <sup>-1</sup>

Las concentraciones en mg.kg<sup>-1</sup> fueron estimadas mediante las concentraciones por aplicación, el peso aproximado del sustrato en la maceta y el número de aplicaciones.



**Figura 8.** Disposición de las macetas de las repeticiones de los distintos tratamientos (Derecha). Disposición de las 10 semillas en la maceta (Izquierda).

Después de 90 días se concluyeron las aplicaciones y se cosechó el ensayo para realizar las siguientes determinaciones:

- ✚ **Peso seco por planta (PS)** distinguiendo parte aérea y raíces, mediante secado en estufa a 80°C hasta peso constante.
- ✚ **Área foliar (AF)** con un medidor de área foliar Licor Li-3000.
- ✚ **Conductividad relativa (CR) de las membranas celulares de hojas y raíces:** se realizó a partir de 4 discos de material fresco de hojas y peso equivalente de raíces, de los distintos tratamientos, según el método de Lutts *et al.* (1996). Inmediatamente después del muestreo, los tejidos se lavaron tres veces con agua bidestilada durante 15 segundos, para eliminar los electrolitos

adheridos a la superficie y aquellos liberados por las heridas producidas por el corte. Posteriormente, cada muestra se sumergió en un tubo con 10 ml de agua bidestilada donde permanecieron durante cuatro horas a temperatura ambiente. Seguido a esto, se determinó la conductividad eléctrica (dS/m) empleando un conductímetro Jenco modelo 3173. Luego, los tubos se taparon y se llevaron a autoclave donde se mantuvieron por 20 minutos a una sobrepresión de 1 atmósfera y 120°C, con el objetivo de afectar totalmente la integridad de las membranas. Finalmente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvió a medir la conductividad eléctrica del medio. En base a los datos obtenidos, se estimó la conductividad relativa de las membranas celulares a partir de la siguiente fórmula:

$$CR (\%) = (L_1 / L_2) \times 100$$

Donde,  $L_1$  y  $L_2$  son las lecturas de conductividad eléctrica antes y después del autoclavado respectivamente.

- ✚ **Contenido de malondialdehído (MDA):** se realizó a partir de 200 mg de hojas y de raíces a partir de la reacción con el ácido thiobarbitúrico (TBA), según el método de Heathy Packer (1968), como indicador de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares. Se molieron 0,25 g de tejido fresco, se agregaron 5 ml de TBA 0,5% en 20% de ácido tricloroacético (TCA). La mezcla se calentó a 95°C durante 30 minutos y luego se enfrió rápidamente en un baño frío. Se centrifugó a 10000 g por 10 minutos, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 UV/V. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>:

$$\text{Equivalentes de MDA (n x mol x ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$$

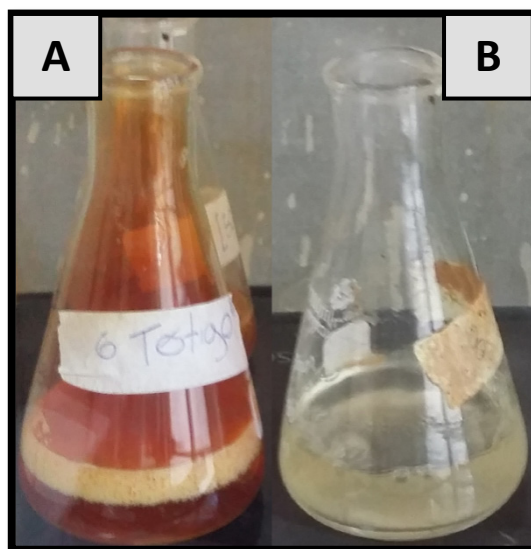
- ✚ **Contenido de clorofila y carotenoides:** se determinó a partir de un disco de hoja de 1 cm de diámetro. Se utilizó N, N-Dimetilformamida como solvente de extracción, determinando la absorbancia de la solución a las longitudes de onda 647, 664 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A (Kyoto, Japón). El cálculo del contenido de pigmentos se realizó de acuerdo a Wellburn (1994).
- ✚ **Contenido de proteínas solubles:** se determinó a partir de 200 mg de hojas y de raíces mediante el método de Bradford (1976). Los tejidos se homogeneizaron en un mortero con 1 ml del buffer de extracción (TRIS 50 mM, EDTA 1mM, PVPP insoluble 1%, MeSH 0,1% a pH 7,5) a 4°C. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 20 µl del sobrenadante y se le agregó 1ml del reactivo Bradford (Azul Brillante de Coomassie G-250 0,021% (p/v) etanol 4,7% (p/v) y ácido fosfórico 8,5% (p/v)) se agitó en vórtex y se leyó la absorbancia a 595 nm. El cálculo de la concentración de proteínas se efectuó empleando una curva patrón preparada con distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, SiFMaChemical Co).



- ✚ **Contenido de prolina:** se determinó a partir de 100 mg de hojas y de raíces, según el método de Bates *et al.* (1973), como indicador de estrés. Para esto se homogeneizó el material fresco de hoja y de raíz con 2 ml de una solución en agua al 3% de ácido sulfosalicílico. El homogeneizado se centrifugó a 12000 g por 15 minutos y se tomó 1 ml del extracto obtenido. Se lo hizo reaccionar con 1 ml del reactivo Ninhydrina ácida y 1 ml de ácido acético glacial en un tubo de 15 ml, en baño maría a 100°C durante una hora. Al cabo de ese lapso la reacción se interrumpió enfriando el tubo rápidamente. A la mezcla reaccionante anterior se le agregó 2 ml de tolueno y se agitó durante 15 a 20 segundos en vórtex. Se dejaron separar las fases y se tomó la fase acuosa conteniendo el cromóforo tolueno-prolina y se leyó la absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco. Se calculó el contenido de prolina por unidad de peso fresco según la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol prolina.g}^{-1}\text{PF}=[(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{moles}]/[(\text{g PF})/5]$$

- ✚ **Contenido de Zn(II) en parte aérea, raíz y sustrato:** se realizó siguiendo la metodología de Bonfranceschi *et al.* (2009) para lo cual se efectuó una digestión ácida con  $\text{HNO}_3(\text{c})/\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$  (relación de volumen inicial 4:1) de 0,5 g de la parte aérea, 0,5 g de raíz y 1 g de suelo por repetición, y se agregaron volúmenes posteriores de  $\text{HNO}_3(\text{c})$  hasta la oxidación completa de la materia orgánica visibilizada por el cambio de color y la liberación y posterior cese de humo de color marrón óxido como se observa en la Figura 9. Las muestras de parte aérea y raíz fueron trituradas para facilitar su digestión mientras que las muestras de suelo fueron tamizadas con un tamiz de 16 mesh para eliminar impurezas y posteriormente se molieron en un mortero. El tiempo que llevó la digestión varió según el material que se utilizó. Mayor tiempo fue requerido para las raíces y el suelo que para la parte aérea, llegando a durar entre 3 a 7 horas respectivamente. Los extractos ácidos obtenidos se filtraron con jeringa y membrana de 0,45 micrones y posteriormente se analizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (Shimadzu AA6650F Espectrofotómetro de Absorción Atómica). Con las medidas de zinc se calcularon los índices de biodisponibilidad, acumulación, traslocación y bioacumulación.



**Figura 9.** Variación visual que determina el fin de la digestión del material orgánico **A.** Inicio de la digestión. **B.** Fin de la digestión.

**Índice de biodisponibilidad (FD)**= mg Zn.kg<sup>-1</sup> en raíz/mg Zn.kg<sup>-1</sup> en suelo.

**Índice de acumulación (FA)**= mg Zn.kg<sup>-1</sup> en parte aérea/mg Zn.kg<sup>-1</sup> de suelo.

**Índice de traslocación (FT)**= mg Zn.kg<sup>-1</sup> en parte aérea/mg Zn.kg<sup>-1</sup> en raíz.

**Índice de bioacumulación (FB)**= mg Zn.kg<sup>-1</sup> en biomasa/mg Zn.kg<sup>-1</sup> en suelo.

Todos los valores están expresados sobre peso seco de la respectiva muestra.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. El número de repeticiones (n) fue 7 por tratamiento y 5 plantas por repetición. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de LSD al 5%(Statgraphics Centurion).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

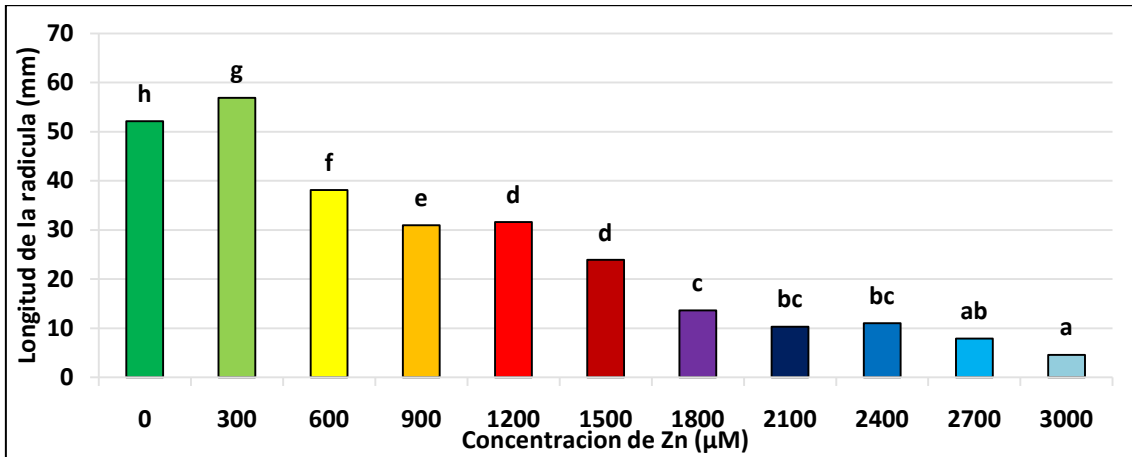
### 6.1. Ensayos de germinación

#### 6.1.1. Longitud de la radícula

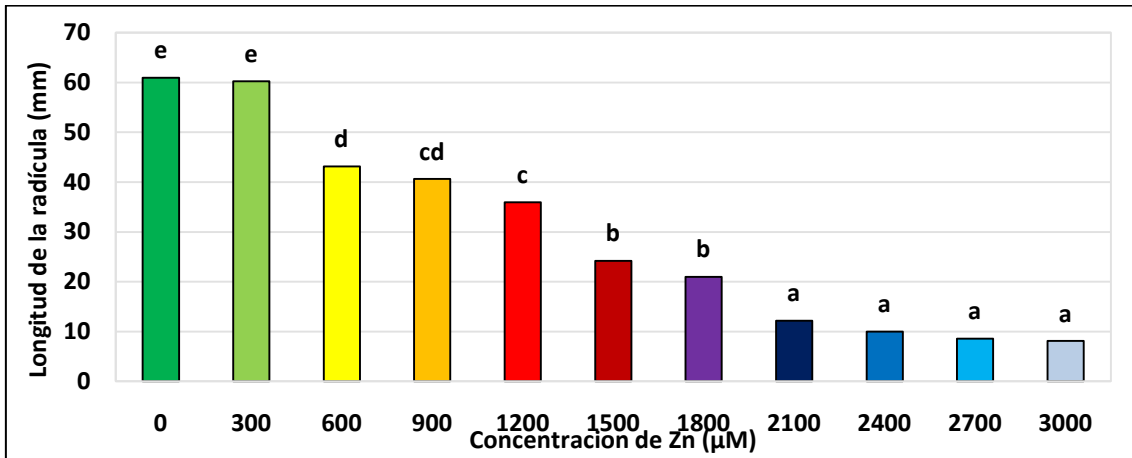
La longitud varió significativamente en las distintas concentraciones de zinc, pero no en los distintos cultivares como se observa en las Tablas 1, 2 y 3 (Anexo) y los Gráficos 1, 2 y 3. Todos los cultivares presentaron la misma tendencia; a mayor concentración de zinc, mayor fue la disminución en la longitud de la radícula. Esto se advierte mejor en la Figura 10 donde se observa una marcada disminución en la elongación hacia las mayores concentraciones de zinc. También hubo una escasa presencia de pelos radiculares en las concentraciones mayores de Zn(II) ensayadas (Figura 10).

Similares resultados se han reportado por Davies *et al.* (1991) quienes evaluaron distintos parámetros de crecimiento, entre ellos la longitud radicular, en plántulas de tres cultivares de *Festuca rubra* L. ('Merlin', 'Hawk' y 'S59') con distinto grado de tolerancia al exceso de zinc creciendo en sustratos nutritivos y encontraron que a concentraciones superiores a 3µM (0,2 µg Zn.cm<sup>-3</sup>) disminuyó la longitud radicular. También Abud *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares en plántulas de *Nicotiana tabacum* L. donde se evaluó el crecimiento de las mismas en sistema in vitro con medio MS (Murashige y Skoog) a concentraciones crecientes de zinc encontrando menor crecimiento de la raíz primaria e inhibición del crecimiento de raíces secundarias en las concentraciones mayores. Precisamente Ren *et al.* (1993) destacaron que los síntomas más característicos de la toxicidad por metales pesados son menor elongación de la raíces principales y secundarias, menor cantidad de estas últimas y necrosamiento de las mismas, dado que la mayoría de las plantas que tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de metales lo hacen en la raíz. Vázquez *et al.* (1992) aportaron que en muchas especies, se ha comprobado una compartimentación subcelular, especialmente en vacuola y pared celular de las raíces. "Las membranas y la pared celular son potencialmente el blanco de acciones que generan cambios en las propiedades de semipermeabilidad, de transporte, de extensibilidad y crecimiento que comprenden una multiplicidad de procesos fisiológicos que secundariamente se verán modificados" (Foy *et al.*, 1978). Otro cambio, documentado por Routy Das (2009), en el núcleo de las células apicales de la raíz

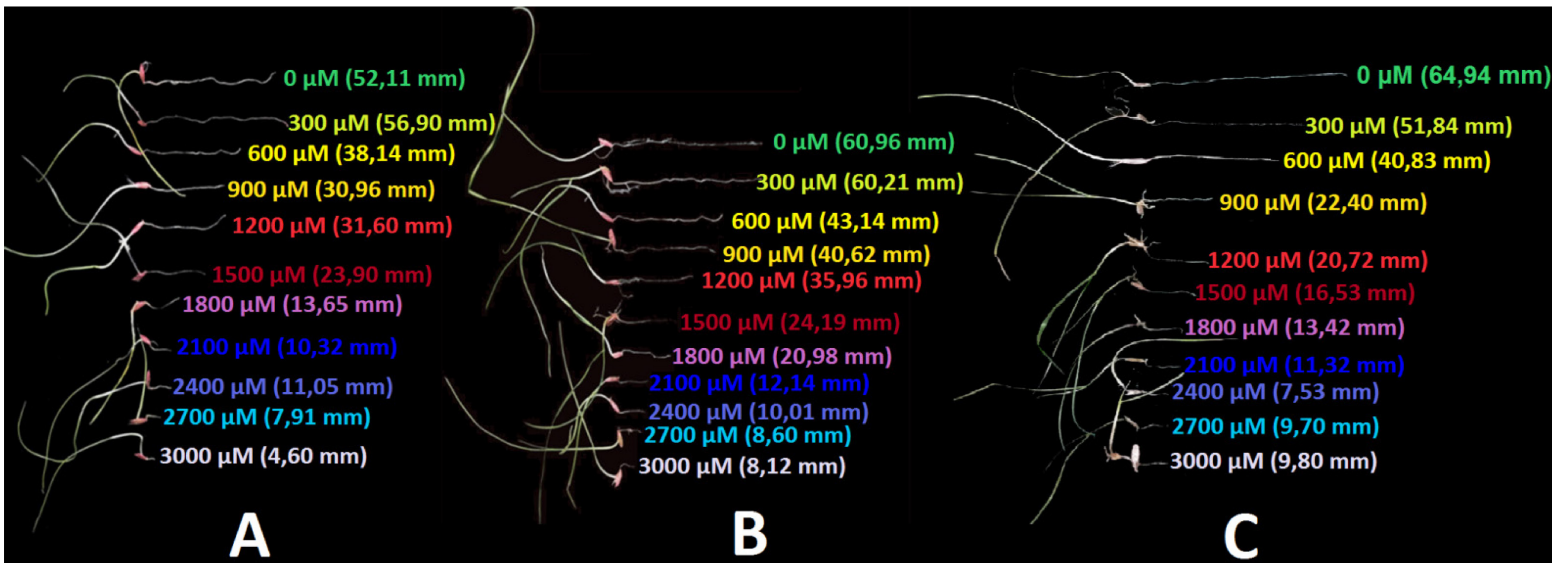
causado por la toxicidad a zinc es que las cromatinas se ven altamente condensadas y algunas de las células corticales muestran rupturas y dilataciones de las membranas nucleares. El citoplasma pierde su estructura, se desintegran organelas y aumenta el desarrollo de vacuolas. Esto último se puede correlacionar con lo encontrado por Chaney (1993) que destacó que la compartimentalización en la vacuola y una fuerte quelación por malato, citrato, glutatión y posiblemente fitoquelatinas en el citoplasma aparentemente proveen tolerancia al zinc.



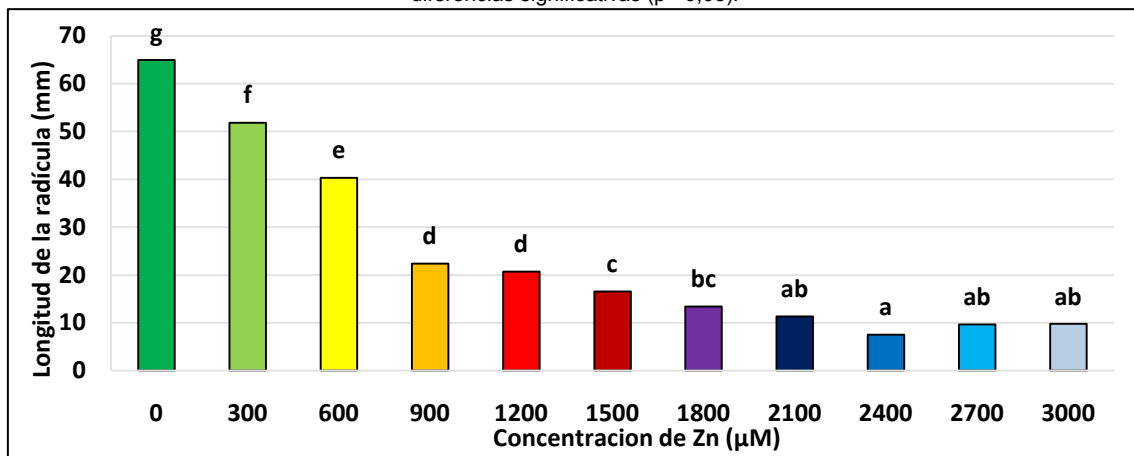
**Grafico 1.** Longitud de la radícula del cv 'Malma' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Grafico 2.** Longitud de la radícula del cv 'Baralta' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Grafico 3.** Longitud de la radícula del cv 'Flexible' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



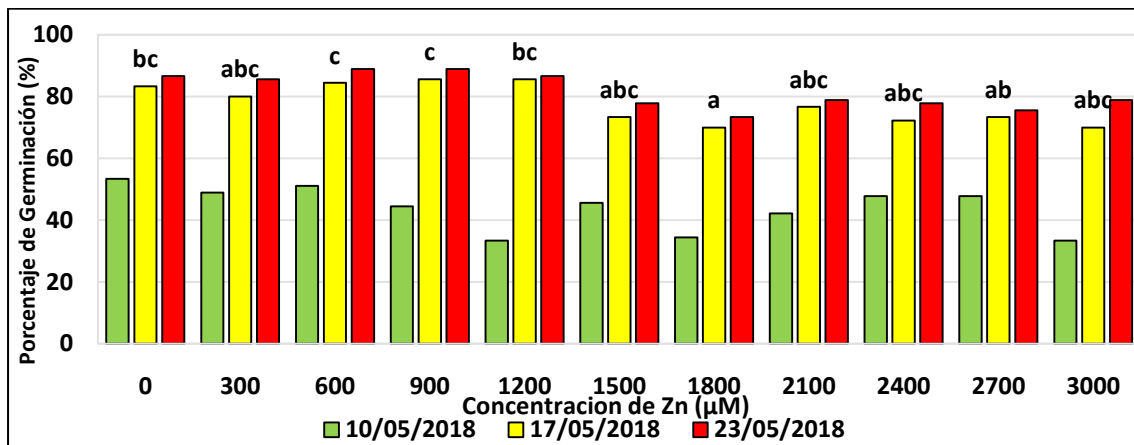
**Figura 10.** Comparación del crecimiento radicular a distintas concentraciones de zinc(II) en los cultivares de *Festuca arundinacea* A. 'Malma'. B. 'Baralta'. C. 'Flexible'.

### 6.1.2. Porcentaje de germinación

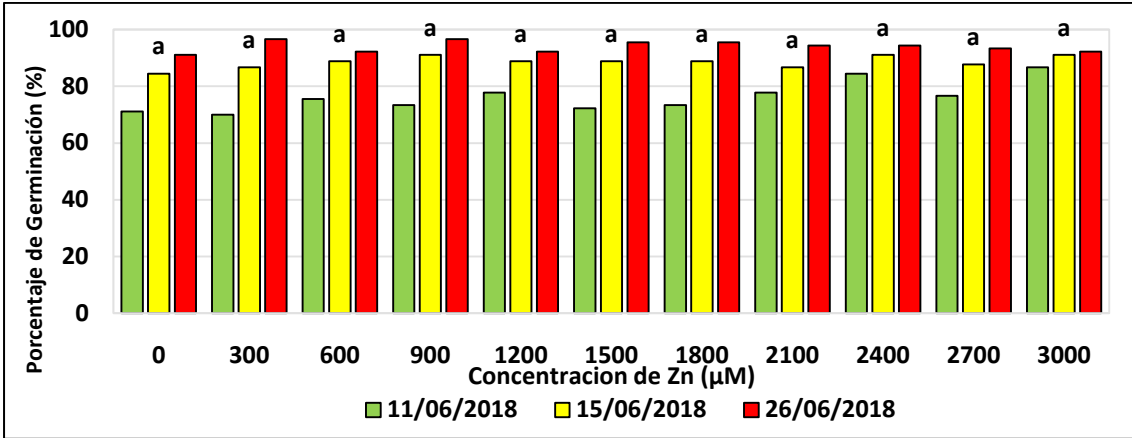
El porcentaje de germinación mostró diferencias estadísticamente significativas como se observa en las Tablas 4, 5 y 6 (Anexo), excepto en el cultivar 'Baralta', (Figura 11). Sin embargo, de acuerdo a los resultados no se puede decir que un cultivar sea más tolerante a la toxicidad por Zn(II) ni que una concentración de Zn(II) sea más inhibitoria que otra debido a que no se observó una tendencia marcada para ninguna de las concentraciones ensayadas (Gráficos 4, 5 y 6).

Se han reportado diversos resultados para la germinación, algunos difieren o coinciden con los obtenidos en este ensayo. En algunas especies como la alfalfa (*Medicago sativa* L.), la contaminación por zinc no afectó la germinación incluso en altas concentraciones (Peralta *et al.*, 2001). En estos ensayos se utilizó el cultivar 'Malone' que creció en medios nutritivos con concentraciones de 0 $\mu\text{M}$ , 76  $\mu\text{M}$ , 153 $\mu\text{M}$ , 306 $\mu\text{M}$  y 612  $\mu\text{M}$  de zinc (0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm y 40 ppm). Liny Xing (2007) por su

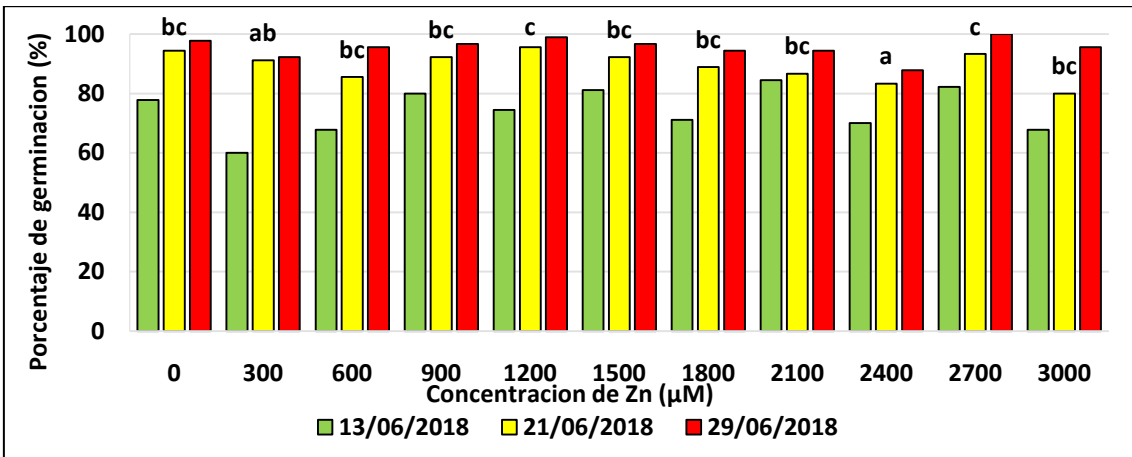
parte encontraron similares resultados para rábano (*Raphanus sativus* L.), colza (*Brassica napus* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y raigrás (*Lolium perenne* L.) evaluados con concentraciones de zinc de 30590  $\mu\text{M}$  (2000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), atribuyendo que la resistencia puede ser causada por un efecto osmótico de las semillas característico de algunas especies más que por la producción de compuestos químicos que ayuden a tolerar este evento; destacando también que las semillas germinaron pero la elongación radicular se vio severamente disminuida. Sin embargo, en otras especies como el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se observó una marcada disminución y retraso de la germinación cuando se lo sometió a concentraciones de 1000 $\mu\text{M}$  y 10000 $\mu\text{M}$  (1 mM y 10 mM) creciendo en cajas de Petri con papeles de filtro embebidos en soluciones con dichas concentraciones en ambiente controlado; indicando además un aumento de ABA (ácido abscísico) y disminución de AG<sub>3</sub> (ácido giberélico), Z (zeatina) y ZR (ribósido de zeatina), todas hormonas relacionadas con la germinación (Aticiet *al.*, 2005). El-Ghameryet *al.* (2003) estudiaron trigo (*Triticum aestivum* L.) y nigella (*Nigella sativa* L.) en concentraciones de zinc de 76  $\mu\text{M}$  y 382  $\mu\text{M}$  (5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y 25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) encontrando una reducción del porcentaje de germinación en ambas especies advirtiendo anomalías mitóticas, núcleos vacuolados y la consecuente disminución de la división celular. La inducción de rigidez y anomalías cromosómicas indica su acción sobre los cromosomas demostrando el potencial clastogénico del exceso de zinc para ciertas especies.



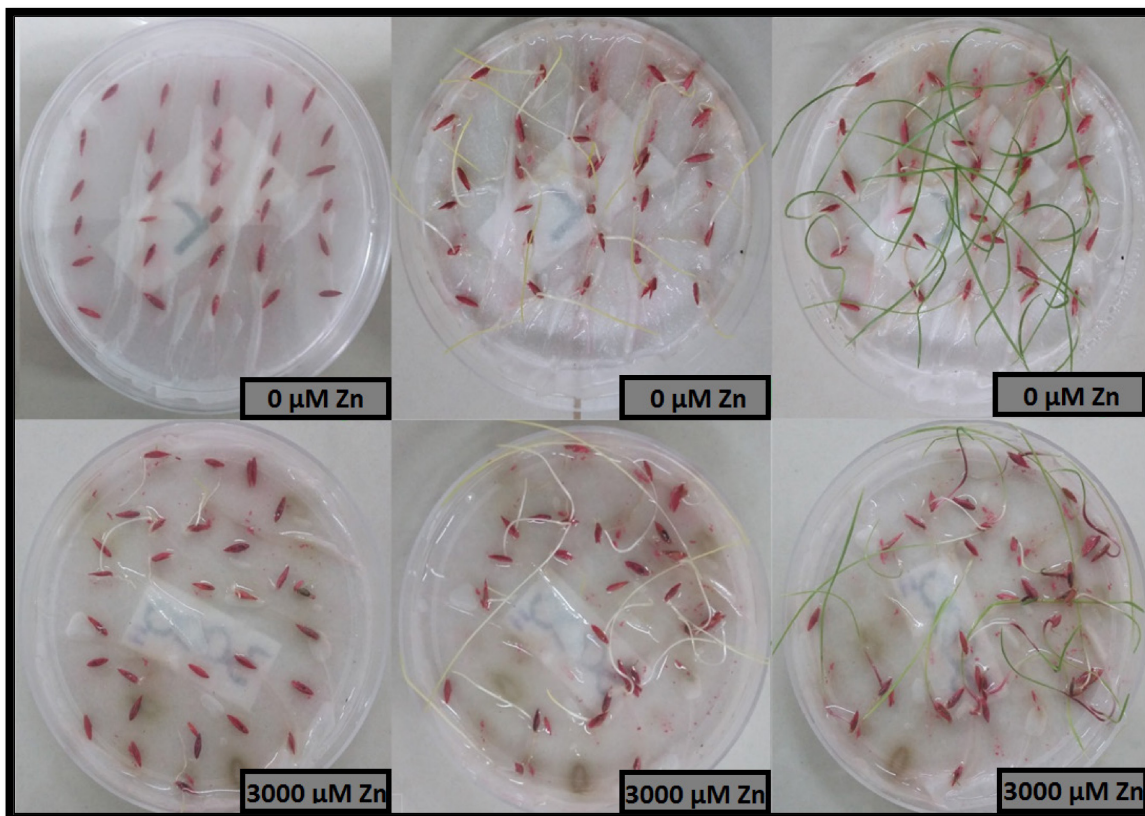
**Grafico 4.** Porcentaje de germinación del cv 'Malma' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Grafico 5.** Porcentaje de germinación del cv 'Baralta' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



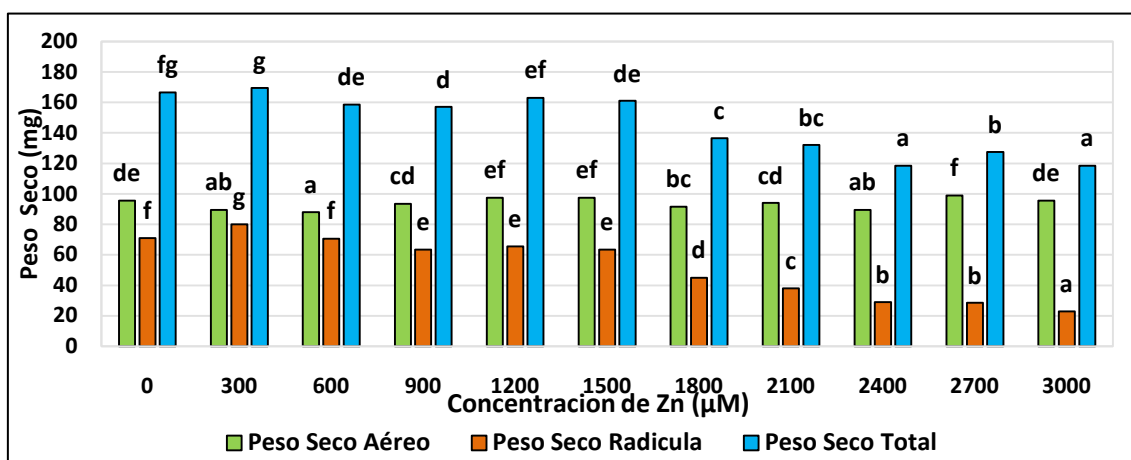
**Grafico 6.** Porcentaje de germinación del cv 'Flexible' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



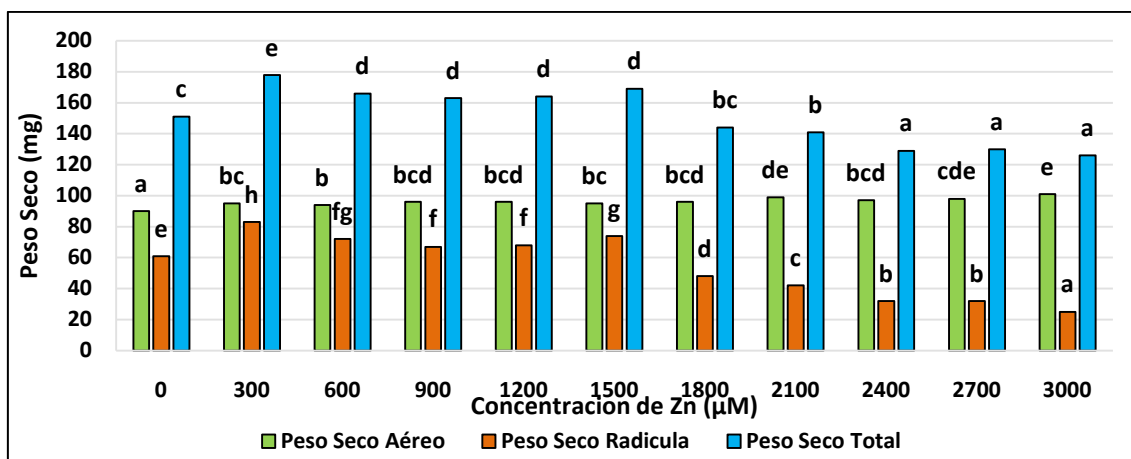
**Figura 11.** Germinación y crecimiento inicial de *Festuca arundinacea* cv 'Malma' sin agregado de zinc (II) y con 3000  $\mu\text{M}$  a los 7, 14 y 21 días de siembra respectivamente.

### 6.1.3. Peso seco de las plántulas

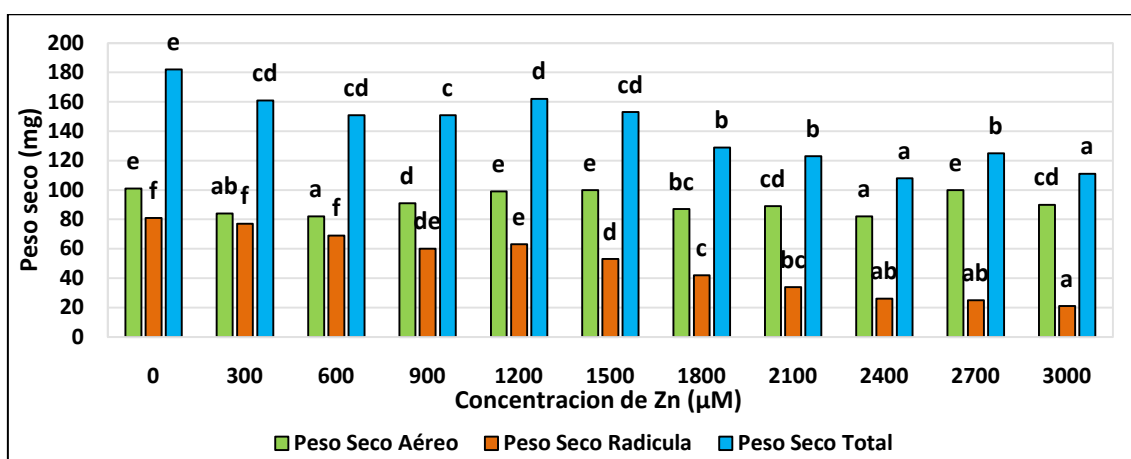
En los cultivares 'Malma' y 'Flexible' el peso seco aéreo del testigo no presentó diferencias significativas con respecto a todas las concentraciones de Zn(II) probadas (Tablas del Anexo 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) (Gráficos 7 y 9) en contraposición con el cultivar 'Baralta', cuyo peso aéreo fue aumentando con la concentración de Zn(II) (Gráfico 8). Como conclusión se puede decir que la disminución en cuanto al peso seco total es debido a la disminución del peso seco radicular y no al peso aéreo ya que no se observó diferencias entre el testigo y todas las concentraciones ensayadas.



**Gráfico 7.** Peso seco aéreo, radicular y total del cv 'Malma' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Grafico 8.** Peso seco aéreo, radicular y total del cv 'Baralta' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Grafico 9.** Peso seco aéreo, radicular y total del cv 'Flexible' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## 6.2. Ensayos de crecimiento

Estos ensayos fueron realizados únicamente con el cultivar 'Malma' debido a que el análisis estadístico no indica diferencias significativas entre los cultivares y además por la mayor disponibilidad del material durante todo el año.

### 6.2.1. Peso seco de las plantas

El Gráfico 10 muestra las diferencias significativas (Tablas del Anexo 16, 17 y 18) que se producen en el peso seco total, aéreo y de raíz. El peso seco total muestra la misma tendencia, es decir, una disminución a mayores concentraciones tal como sucedió en el ensayo de germinación. Sin embargo, a diferencia del ensayo anterior, en este caso no se puede atribuir completamente esta disminución al peso seco de la raíz ya que tanto para la parte aérea como para la raíz el incremento de la concentración de zinc resultó en un decremento del peso seco. Estadísticamente la concentración de 1000 µM generó una disminución significativa del peso seco total comparada con los valores observados en el testigo, pero no del peso de la raíz ni de la parte aérea que se observó recién en la concentración de 1500 µM.



Zamani *et al.* (2015) reportaron similares resultados en *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* creciendo en macetas con sustrato con concentraciones de 200, 400, 800 y 1800 mg.kg<sup>-1</sup> cuando analizaron la modificación de la acumulación de zinc en plantas infectadas con el hongo endófito *Neotyphodium* sp. Curiosamente la especie *N. coenophialum* es responsable de la enfermedad conocida como festucosis, que afecta a los animales que consumen plantas de *Festuca*, causando intoxicaciones que pueden llevar a la muerte de los animales. La infección con este hongo produjo un aumento en la tasa de extracción y acumulación de Zn en la parte aérea y disminuyó la caída del peso seco que se daba a mayores concentraciones lo que igualmente sucedía, en menor medida, en el tratamiento sin el endófito en ambas especies. Orroño (2002) encontró resultados similares en un ensayo de screening de 6 metales, entre ellos zinc, en concentraciones consideradas fitotóxicas de 300 y 600 mg.kg<sup>-1</sup> en 3 especies del género *Pelargonium* (Malvón: *P. hortorum* L. H. Bailey, Geranio: *P. peltatum* (L.)L'Hér. y Malva rosa: *P. graveolens* L'Hér.) creciendo en macetas con tierra en condiciones controladas para determinar la acumulación en la planta y sus efectos tóxicos con objetivo de fitorremediación. Se encontró que a mayores concentraciones de zinc el peso seco tanto aéreo como radical disminuyó. Intawongse y Dean (2006) estudiaron el crecimiento y la acumulación de Cd, Cu, Mn, Pb y Zn en lechuga (*Lactuca sativa* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.) creciendo en compost contaminado con dichos metales, encontrando, en el caso del zinc, una disminución del crecimiento expresado en peso seco en todas las especies. Por lo observado durante el ensayo de germinación la disminución del peso seco aéreo podría deberse a la disminución del crecimiento radical causada por el zinc ya una consecuente menor absorción de agua y nutrientes, que a un efecto directo del zinc sobre la parte aérea. Davies *et al.* (1991) explicaron esto cuando estudiaron la vacuolización inducida por altas concentraciones de zinc en las células de las raíces indicando que la disminución del crecimiento de la raíz es causada por la alta tasa de formación de vacuolas para acumular zinc y evitar que se transporte a otros órganos, sin embargo la disminución de la elongación de la raíz genera el decremento del crecimiento aéreo.

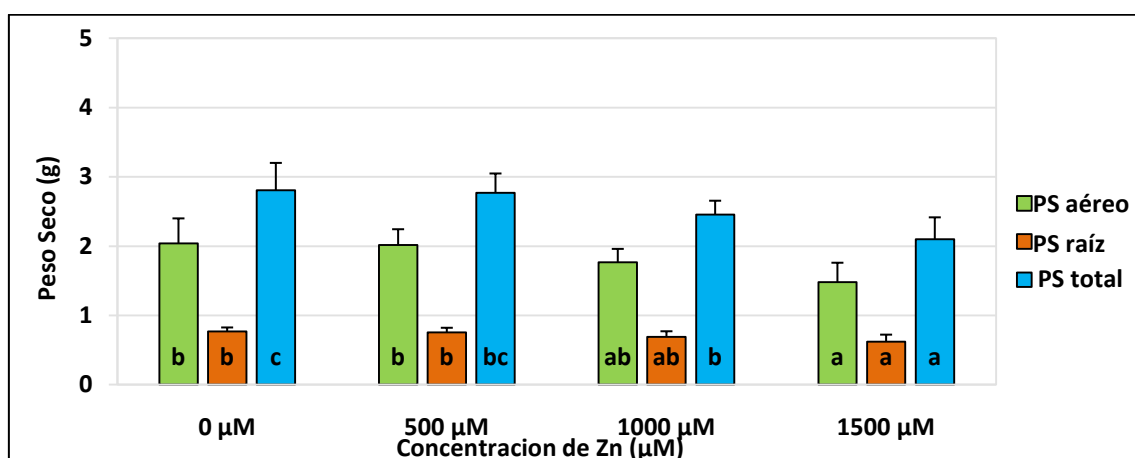


Gráfico 10. Peso seco aéreo, radicular y total del cv 'Malma' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.2. Área Foliar

En cuanto al área foliar, la Tabla 19 (Anexo) muestra que esta disminuyó significativamente en la concentración 1000  $\mu\text{M}$  y 1500  $\mu\text{M}$  (Gráfico 11), presentándose el valor más bajo en la concentración de 1500  $\mu\text{M}$ .

Ruano *et al.* (1988) encontraron similares resultados estudiando el crecimiento y la partición de biomasa en plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) creciendo en soluciones nutritivas sometidas a concentraciones consideradas fitotóxicas de zinc de 2  $\mu\text{M}$ , 6,6  $\mu\text{M}$ , 9,6 $\mu\text{M}$  y 13,5 $\mu\text{M}$  donde el área foliar, entre otros parámetros, disminuía a medida que las concentraciones eran mayores. Davis *et al.* (1993) reportaron resultados similares para plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.) creciendo en macetas con concentraciones de zinc de 0, 10, 20 y 40  $\text{mg.kg}^{-1}$  donde se observó un decremento del área foliar con el incremento de zinc. Esto también sucedió en el trabajo de Khudsar *et al.* (2004) donde estudiaron los cambios morfo-fisiológicos, entre estos la expansión del área foliar, inducidos por altas concentraciones de zinc (50, 100, 200, 300 y 400  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) en ajeno (*Artemisia annua* L.), que presentó la misma tendencia reportando también una disminución de la materia seca tanto aérea como radical, disminución del contenido de clorofila, carotenoides y proteínas.

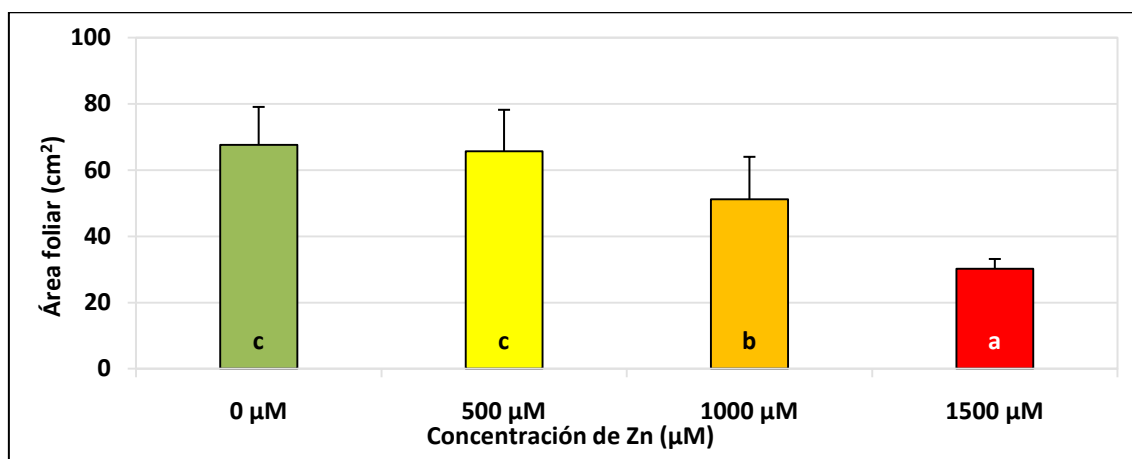


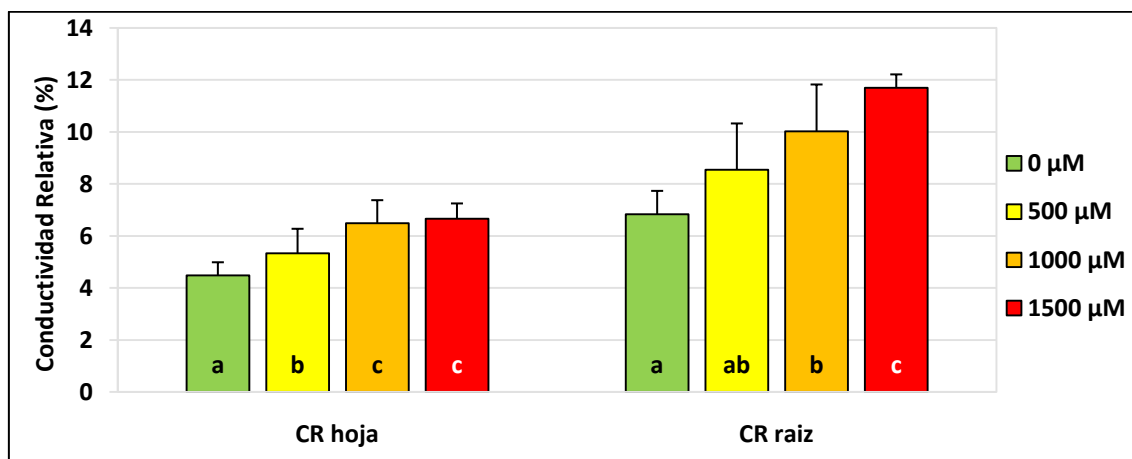
Gráfico 11. Área foliar en las distintas concentraciones de Zn del cv 'Malma'. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.3. Conductividad relativa de las membranas celulares

La conductividad relativa (CR) de las membranas presentó diferencias estadísticamente significativas, como se observa en las Tablas 20 y 21 (Anexo), tanto para hoja como para raíz en las distintas concentraciones de Zn (II) (Gráfico 12). En hoja los mayores valores se obtuvieron en las dos mayores concentraciones (1000  $\mu\text{M}$  y 1500  $\mu\text{M}$ ), sucediendo lo mismo para la raíz siendo la CR mayor en raíz que en hoja para todas los tratamientos. Sin embargo, los valores de CR muestran que el daño causado fue muy leve. Valores cercanos al 60% se relacionan a daños considerables y en este caso los máximos obtenidos fueron menores al 12%. La CR sirve como indicador de daño de las membranas celulares, midiendo la liberación de electrolitos consecuencia de deterioro o modificaciones de las mismas. La membrana puede considerarse como la primera estructura "viviente" que es afectada por los metales

pesados. Su función puede ser rápidamente afectada por las altas concentraciones de metales (Sánchez-Urdaneta, 2003).

Wainwright y Woolhouse (1977) demostraron que a mayores concentraciones de cobre pero no de zinc, se incrementó el eflujo de  $K^+$  de las células de las raíces de *Agrostis capillaris* L. Asimismo, De Vos *et al.* (1991), Strange y Macnair (1991) y Quartacci *et al.* (2001) concluyeron que el daño a la membrana celular puede ser monitoreado por la fuga de iones que, en estos ensayos, fue medida por acción del Cu encontrando que aumentaba a mayores concentraciones. Otros estudios han revelado que las plantas poseen diversas clases de transportadores de metales que están vinculados a la incorporación y a la homeostasis en general, y que estos poseen un rol clave en la tolerancia. Así Williams *et al.* (2000) y Guerinot (2000) incluyen en estos a bombas de metales pesados impulsados por ATP (CPx-ATPasas), proteínas de macrófagas naturales asociadas a resistencia (NRAMPs), facilitadores de la difusión de cationes (CDF) y Proteínas ZIP. En *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl, Pence *et al.* (2000) estudiaron un transportador (ZNT1), que permite una alta afinidad para la acumulación de zinc y baja para cadmio y que se expresa en elevados niveles en raíces. El aumento de la expresión, causada por los cambios en el estado de oxidación de zinc de la planta, condujo a una mayor absorción del mismo en las raíces. Este transportador está incluido en los CDF y se encuentra tanto en vegetales, como animales y microorganismos. También se conoce que una variación en la expresión del mismo (ZNT-1) provoca el efecto contrario: la exclusión de zinc, como concluyó Silver (1996), lo que podría demostrar que estos transportadores forman parte de un mecanismo de tolerancia de los metales pesados mediante su exclusión.



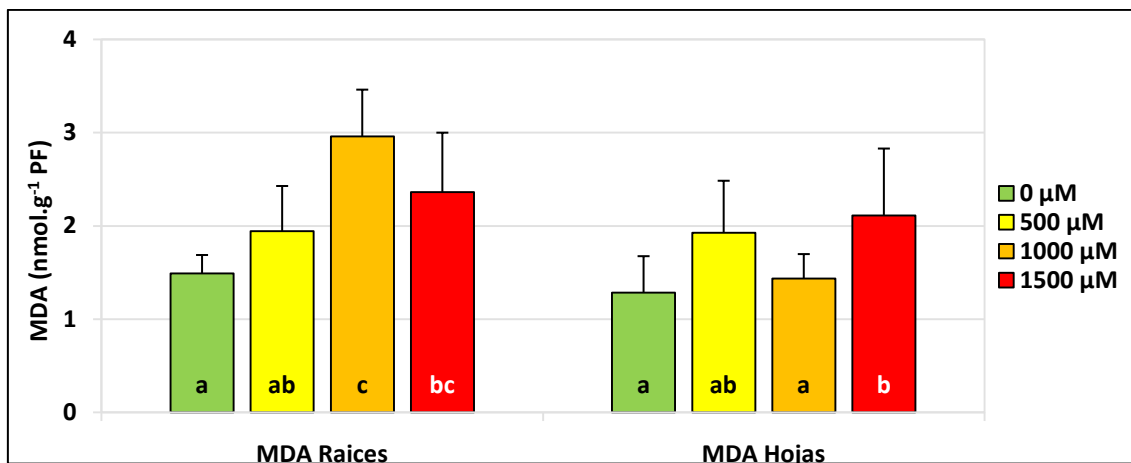
**Grafico 12.** Conductividad relativa de las membranas celulares de hoja y raíz del cv 'Malma' en las distintas concentraciones de Zn (II). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.4. Contenido de malondialdehído(MDA)

El contenido de MDA presentó diferencias estadísticamente significativas como se observa en las Tablas 22 y 23 (Anexo). La concentración de MDA fue mayor a las mayores concentraciones de Zn (II) y también en las raíces que en las hojas (Gráfico 13). El MDA es un compuesto orgánico que resulta de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de lípidos causada por las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas se forman como un subproducto natural del metabolismo normal del

oxígeno y tienen roles importantes en la señalización celular y la homeostasis. Sin embargo, en situaciones de estrés, los niveles de ROS pueden aumentar significativamente provocando daños a las estructuras celulares lo que se conoce como estrés oxidativo (Sosa-Torres *et al.*, 2015). En las plantas, cuando este tipo de estrés es causado por metales pesados generan radicales superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), radicales hidroxilos ( $OH^-$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Jain *et al.*, 2010). Estas ROS son altamente reactivas y pueden causar la muerte de las plantas por daños a las membranas lipídicas, proteínas, pigmentos y ácidos nucleicos.

Según Navarro-Aviñó *et al.* (2007) sí se daña la membrana, ingresan iones  $Ca^{+2}$  y egresan iones  $K^+$  (responsables de los fenómenos de polarización y despolarización de la membrana y, en definitiva, de la transmisión eléctrica). La salida de  $K^+$  favorece la entrada de agua. Hay varios mecanismos que pueden inducir estos cambios, algunos son la fluidización de la membrana, la peroxidación de lípidos, el daño al citoesqueleto, el bloqueo de canales etc. Por lo tanto, el contenido de MDA permite estimar el daño causado a las células o más específicamente a las membranas de las mismas. Prasad y Saradhi (1995) estudiaron la producción de ROS en *Brassica juncea* L. y *Cajanus cajan* L. causada por concentraciones fitotóxicas de zinc (10, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000  $\mu M$ ) creciendo en un medio nutritivo, encontrando similares resultados; las concentraciones elevadas de zinc causaron un decrecimiento de la biomasa general y promovieron la generación de ROS visualizada en un mayor contenido de MDA y la acumulación de prolina; proponiendo la existencia de una correlación directa entre la generación de ROS y la acumulación de prolina relacionada a una detoxificación no enzimática de radicales libres. Similares resultados obtuvieron Chaoui *et al.* (1997) que encontraron elevados contenidos de MDA (6-10 MDA/g) cuando estudiaron la peroxidación lipídica causada por concentraciones fitotóxicas de cadmio y zinc (100  $\mu M$ ) en plántulas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) creciendo en medio nutritivo. También Jain *et al.* (2010) midieron los impactos de distintos parámetros, entre ellos el estrés oxidativo, en plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) expuestas a elevadas concentraciones de zinc de 994 Y 1988  $\mu M$  (65 Y 130  $mg.l^{-1}$ ) encontrando alto contenido de MDA en ambas concentraciones. Hosseini y Poorakbar (2013) estudiaron la respuesta oxidativa a la toxicidad de zinc en plantas de maíz (*Zea mays*) creciendo en macetas con concentraciones de 0 $\mu M$ , 400 $\mu M$  y 600  $\mu M$  de zinc encontrando un aumento del contenido de MDA significativo en el tratamiento de 600  $\mu M$ . A su vez, la toxicidad por zinc fue mayor a pH 4,5. La generación de ROS y el incremento de la peroxidación lipídica bajo estrés por exceso de zinc pueden resultar en un incremento de la permeabilidad de la membrana y pérdida de la integridad de la misma (Rout y Das, 2009).

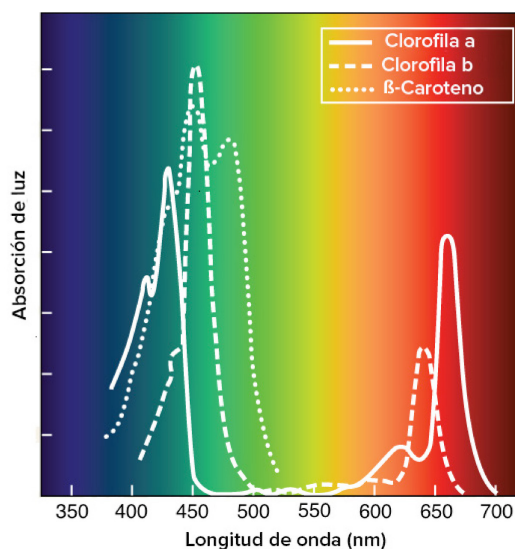


**Grafico 13.** Contenido de MDA en hoja y raíz en las distintas concentraciones de Zn en el cv 'Malma'. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.5. Contenido de clorofila y carotenoides

El contenido de clorofilas y carotenos muestra diferencias significativas como se observa en el Grafico 14 y en las Tablas 24, 25, 26 y 27 (Anexo). Se observó una marcada diferencia entre la concentración de clorofila y carotenos determinados en el testigo en relación a la encontrada en todos los tratamientos ensayados. Esta diferencia fue de aproximadamente un 50 a 60% de clorofila y carotenos, respectivamente.

La clorofila es el pigmento por excelencia de las plantas, esencial para el proceso de la fotosíntesis. La clorofila *a* difiere de la clorofila *b* en el radical de la posición 3 del grupo tetrapirrólico el cual es  $-CH_3$  (metilo) en lugar de  $-CHO$  (grupo funcional aldehído), lo que modifica, entre otras propiedades, el pico de absorción de luz como se observa en la Figura 12. La clorofila *a* tiene una función única y crucial al convertir la energía de la luz en energía química. Todas las plantas fotosintéticas, algas y cianobacterias contienen clorofila *a*, mientras que solo las plantas y algas verdes contienen además clorofila *b*, junto con algunos tipos de cianobacterias. Debido a la función central de la clorofila *a* en la fotosíntesis todos los otros pigmentos, como los carotenos y otras clorofilas, se conocen como pigmentos accesorios. Estos permiten la absorción de una gama más amplia de longitudes de onda y, por lo tanto, una captura mayor de energía de la luz solar.

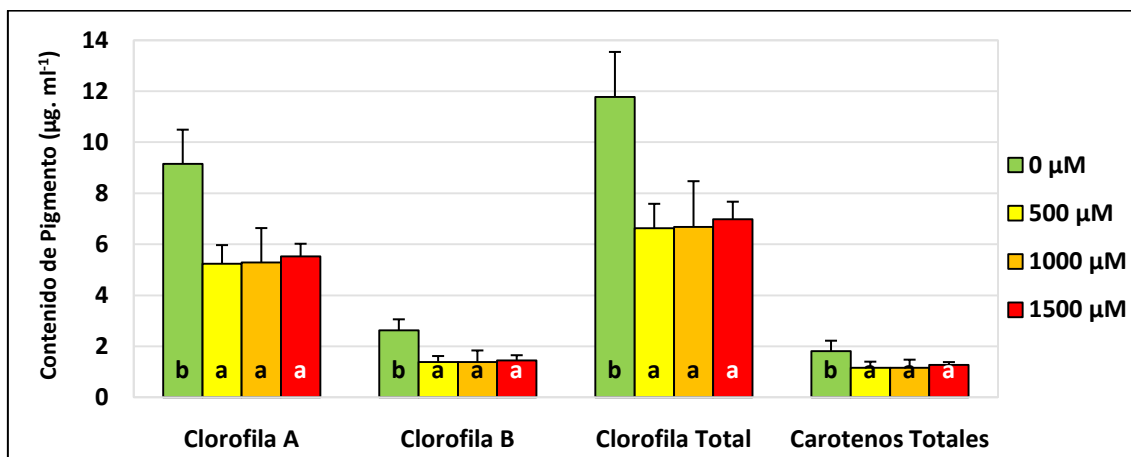


**Figura 12.** Picos de absorción de las clorofilas y el caroteno en el espectro de luz.

**Fuente:** Open Stax College, 2015.

Similares resultados obtuvieron Rosen *et al.* (1977) que estudiaron los efectos de la toxicidad de zinc en relación al hierro y a la producción de clorofila en un híbrido de maíz (*Zea mays* 'Barbecue') creciendo en un sustrato en condiciones controladas. Se estudió la relación con hierro porque los síntomas de toxicidad observados (clorosis internerval) eran comparables a la deficiencia de hierro, sin embargo, se concluyó que el zinc no afecta a la absorción de hierro, pero si modifica su metabolismo. El contenido de clorofila disminuyó marcadamente en las plantas que crecieron con concentraciones elevadas de zinc de 153  $\mu\text{M}$  y 1531  $\mu\text{M}$  (10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en el sustrato. Coincidiendo, Fontes y Cox (1998) estudiaron la deficiencia de hierro en soja (*Glycine max*) causada por la toxicidad de zinc con una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , reportando mayor clorosis en las hojas unifoliadas y que la fertilización foliar con hierro atemperaba esta deficiencia. Así mismo Ebbs y Kochian (1997) obtuvieron similares resultados analizando los efectos de la toxicidad de zinc con concentración de 996  $\mu\text{M}$  (65  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y cobre en distintas especies del género *Brassica* (*B. juncea*, *B. rapa* L. y *B. napus* L.) encontrando que ambos metales produjeron una disminución del contenido de hierro y manganeso en la parte aérea causando síntomas de deficiencia de dichos nutrientes. Sagardoy *et al.* (2009) reportaron que altas concentraciones de zinc (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1500  $\mu\text{M}$ ) en remolacha (*Beta vulgaris* L.) creciendo en condiciones controladas en hidroponía, generaron síntomas de deficiencia de hierro y magnesio, la disminución del contenido de hierro en las hojas, disminución de clorofila y carotenos y un aumento de la relación carotenos/clorofila. Gill y Tujeta (2010) destacan que los principales sitios de generación de ROS son los cloroplastos, las mitocondrias y la membrana celular, que están interconectados al sistema de transporte de electrones. Relacionado a esto Lavid *et al.* (2001) afirman que el oxígeno molecular se foto reduce en los cloroplastos produciéndose superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). La dismutación de este anión produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y la reacción del superóxido y el peróxido pueden crear radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ). Estos radicales causan inactivación de enzimas, blanqueo de pigmentos, peroxidación de lípidos y degradación de proteínas. Precisamente Vaillant *et al.* (2005) estudiaron las respuestas de cuatro especies de datura (*Datura metel* L., *Datura innoxia* Mill., *Datura sanguinea* Ruiz & Pav. y *Datura tatula* L.) a la toxicidad por zinc (1000  $\mu\text{M}$ , 2500  $\mu\text{M}$  y 5000  $\mu\text{M}$ ) creciendo en medios nutritivos y concluyeron que el exceso provoca la destrucción de la clorofila y degrada los fotosistemas causando una disminución de la fotosíntesis neta y, por ende, de la producción de biomasa. Por su parte Prasad (1998) y Krupa *et al.* (1996) concuerdan en que el exceso de zinc inhibe la biosíntesis de deshidrogenasas y reductasas, disminuye la proporción total de clorofila *a* y *b* en las plantas y, por tanto, provoca un descenso en la fotosíntesis. En cuanto a los carotenos, son menos afectados por estos metales, sin embargo también disminuye su contenido. En plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) creciendo en medio nutritivo y con concentración de 50  $\mu\text{M}$ , Ramani y Kannan (1985) encontraron que la región de crecimiento activa tiene más capacidad para acumular zinc, puesto que, al exponer plantas a este metal, se acumuló en mayor medida en los cloroplastos de tallos, hojas y retoños jóvenes. Tumberley *et al.* (1973) concuerdan en que el zinc acumulado en exceso en los cloroplastos conduce a la reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos. Por su parte, Ernst (1996) comenta una posible sustitución del Mg por el Zn(II) en el estroma de los cloroplastos de plantas de frutilla (*Fragaria*  $\times$  *ananassa* (Weston) Duchesne ex

Rozier 'Camarosa') creciendo en macetas con  $350 \text{ mg.kg}^{-1}$  de zinc, pues se ha encontrado que, cuando se presenta toxicidad por Zn(II), la cantidad de este elemento puede llegar a ser equivalente al contenido de Mg(II); por lo tanto, es de esperarse la reducción del contenido de clorofila, dada la función del Mg(II) como centro del anillo tetrapirrólico en la molécula de clorofila.



**Grafico 14.** Contenido de clorofila y carotenos en las distintas concentraciones de Zn en el cv 'Malma'. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.2.6. Contenido de proteínas

Con respecto al contenido de proteínas en hojas hubo una marcada disminución cuando se aplicó Zn (II), de aproximadamente un 50% entre el testigo comparando con todos los tratamientos sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de Zn(II) ensayadas como se observa en las Tablas 28 y 29 (Anexo). En cuanto a las raíces el contenido de proteínas aumentó levemente hacia las mayores concentraciones del metal (Gráfico 15). Se observó una disminución en la concentración de 500  $\mu\text{M}$  pero que no es estadísticamente significativa con respecto al testigo.

Los resultados obtenidos por John *et al.* (2012) coinciden con los de este trabajo. Ellos estudiaron parámetros de crecimiento, bioquímicos y acumulación de metales pesados en mostaza (*Brassica juncea* L.) encontrando una disminución general del contenido de proteínas solubles en la planta. Asimismo Singh y Sinha (2005) reportaron disminución del contenido de proteínas estudiando la misma planta que crecía en sitios contaminados con vertidos de curtiembre. Coincidiendo Cherifet *al.* (2011) encontraron que, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sometidas a estrés por zinc (10, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ) y cadmio, el contenido de proteínas solubles disminuye y aumenta el daño por estrés oxidativo destacando que las altas concentraciones de zinc poseen un efecto sinérgico con el cadmio en la reducción de parámetros de crecimiento y en el aumento del estrés oxidativo. Van Assche y Clijsters (1990) afirman que la disminución del contenido de proteínas puede ser resultado de la unión de los metales a grupos sulfhidrilos presentes en las mismas, lo que conduce a la inhibición de la actividad o la alteración de la estructura modificando sus propiedades. Palma *et al.* (2002) comenta que la disminución del contenido de proteínas observado en este tipo de estrés también puede ser resultado del aumento de la actividad proteasa

inducida por las ROS que genera la fragmentación de proteínas.

Por otra parte, Routy Das (2009) mencionan que el número de nucléolos en las células se incrementa en estos tipos de estrés, implicando la síntesis de nuevas proteínas involucradas en la tolerancia a metales pesados similar a lo que sucede en la raíz en el presente trabajo. Estas nuevas proteínas cumplen funciones diversas como el acomplejamiento de metales en el interior de la célula para detoxificarlos mediante la unión con ligandos. Estos son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente, dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneinas. Entre los aminoácidos y los ácidos orgánicos se encuentran los ácidos cítrico y málico, la histidina, la cisteína etc.

Las Metalotioneinas (MTs) son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido con grupo funcional sulfhídrico, capaz de formar complejos con cationes. Se cree que son las responsables esenciales de la quelación de metales pesados en el citoplasma de las células de mamíferos y bacterias y, que a pesar de estar presente en plantas, no son proteínas decisivas en el proceso de quelación de metales pesados (Hall *et al.*, 2002). Junto a las MTs se producen proteínas de choque térmico (HSPs) las cuales se expresan en respuesta a una variedad de condiciones de estrés que incluyen metales pesados; actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento y ensamblaje de proteínas normales, pero también pueden funcionar en la protección y reparación de proteínas bajo condiciones de estrés (Lewis *et al.*, 1999).

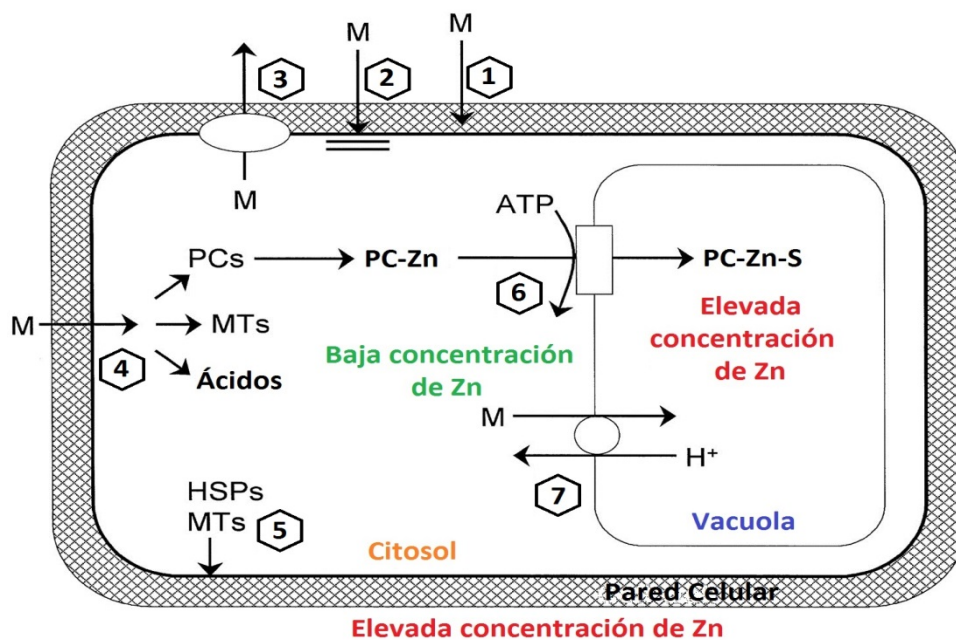
Las Fitoquelatinas (PCs) son otros ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados. Estas desempeñan en plantas el papel equivalente al que las MTs desempeñan en mamíferos y bacterias. Las PCs se inducen rápidamente en plantas por tratamiento con metales pesados. Su disminución provoca una mayor sensibilidad a metales pesados, por lo tanto su papel en la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas es crítico (Rauser, 1999). Estas tienen como sustrato al glutatión que es considerado el péptido más abundante de la Tierra y tiene un rol clave en el balance del estado oxidativo de la célula ya que es capaz de quelar metales pesados por sí mismo (Zhu *et al.*, 1999). Las PCs se sintetizan en el citosol, donde se unen a compuestos metálicos formando complejos. Sin embargo, técnicas de HPLC y rayos X detectan mayores concentraciones de metal y PCs en el interior de la vacuola, por lo que se deduce que el transporte y acumulación en su interior es otro mecanismo implicado en tolerancia y detoxificación (Zhen-guo, 2001). En consecuencia, el paso final en el proceso de detoxificación es la compartimentalización vacuolar.

El flujo de iones y el transporte al interior de la vacuola constituyen dos mecanismos distintos de conseguir con el mismo objetivo: reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma (Davies *et al.*, 1991). La diferencia entre ambos, es que mientras en el primer caso el problema de la toxicidad no siempre queda resuelto, en el segundo caso sí. Dentro de la vacuola se forman complejos PCs-Zn de alto y bajo peso molecular y de esta manera el zinc queda retenido en el interior de las vacuolas. Davies *et al.* (1991) observó que éste mecanismo ocurría en *Festuca rubra* creciendo en medio nutritivo.

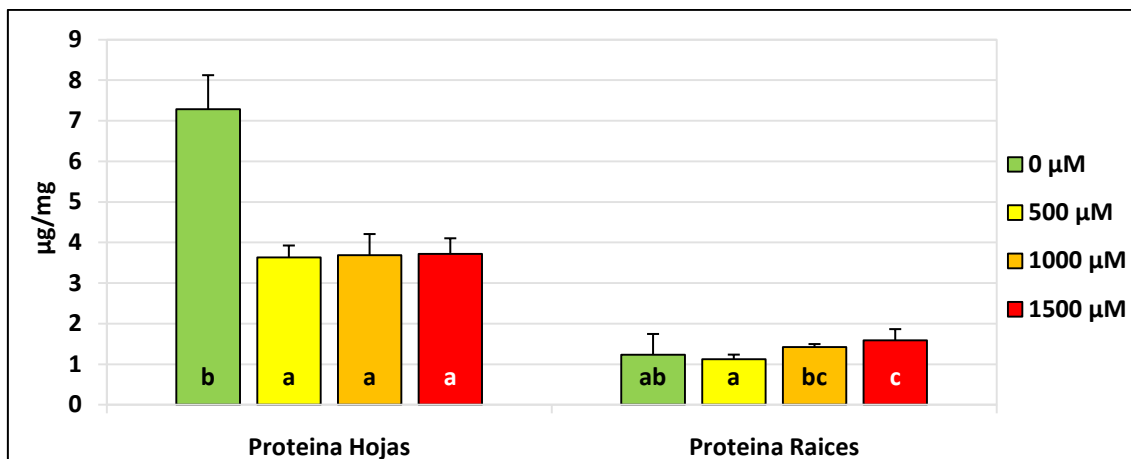


Las proteínas no solo actúan como quelantes de los metales sino que además, ayudan al movimiento hacia adentro de la célula, para ser compartimentalizados en la vacuola, como así también, hacia afuera mediante un flujo de iones (Williams *et al.*, 2000 y Guerinot, 2000). Se destacan los bombeadores de metales pesados impulsados por ATP (CPx-ATPasas), proteínas de macrófagos naturales asociadas a resistencia (NRAMPs), facilitadores de la difusión de cationes (CDF) y Proteínas ZIP. Todos estos mecanismos se pueden observar resumidamente en la Figura 13.

En conclusión la disminución de proteínas en la parte aérea de la planta es un síntoma característico del estrés causado por metales. La degradación de las mismas podría estar dando lugar aminoácidos para la formación de nuevas proteínas y el desencadenamiento de mecanismos de resistencia como se observa en las raíces.



**Figura 13.** Resumen de los potenciales mecanismos disponibles para las plantas para la detoxificación y tolerancia de metales. 1. Unión a la pared celular o exudados radicales. 2. Influjos reducidos por la membrana celular. 3. Eflujo activo al apoplasto. 4. Quelación en el citosol por diversos ligandos. 5. Reparación y protección de la membrana celular. 6. Transporte de complejos PC-Zn a la vacuola. 7. Transporte y acumulación de metales en la vacuola.

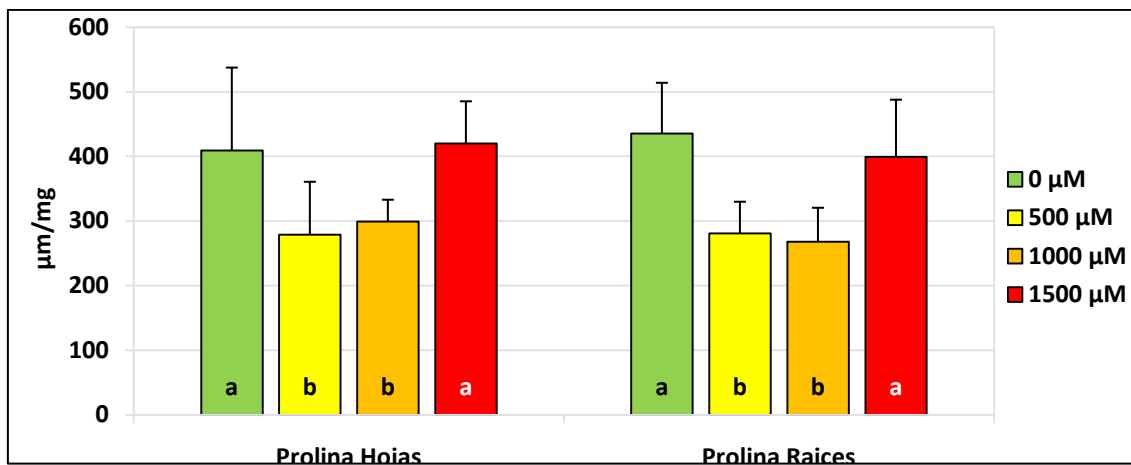


**Grafico N°15.** Contenido de proteína en hoja y en raíz en las distintas concentraciones de Zn en el cv 'Malma'. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.7. Contenido de prolina

La prolina presentó un peculiar comportamiento como se observa en las Tablas 30 y 31 y en el Grafico 16. Se observaron mayores valores en la concentración de 1500 µM comparada con las menores, sin embargo estos no se diferenciaron del testigo el cual presentó un valor similar. No hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos en las hojas y las raíces.

La prolina es un aminoácido y un osmolito importante que aumenta su cantidad en el sistema celular cuando es expuesto a distintos tipos de estrés entre ellos el causado por metales. En los últimos años Ashraf y Foolad (2007) destacaron el papel de la prolina también como secuestrante de ROS. Asimismo, la prolina también puede actuar como chaperón molecular estabilizando las estructuras de las proteínas y regulando el pH citosólico, lo que ayuda a equilibrar el estado redox de la célula. Además de su papel como un osmolito, también previene la alteración de las proteínas y las membranas al formar agrupaciones con moléculas de agua y estabilizar sus estructuras (Koca *et al.*, 2007). Kasai *et al.* (1998) han sugerido que la acumulación de prolina puede contribuir al ajuste osmótico a nivel celular y a la estabilización de la estructura de macromoléculas y organelas además de provocar el incremento de enzimas antioxidantes. Prasad *et al.* (1995) encontraron concentraciones elevadas de prolina a medida que la concentración de Zn (II) aumentaba en ensayos con *Brassica juncea* L. y *Cajanus cajan* L. Al Khateeb y Al-Qwasemeh (2014) observaron este comportamiento en *Solanum nigrum* L. y *Solanum lycopersicum* creciendo en concentraciones fitotóxicas de cadmio, cobre y zinc indicando que la concentración de prolina aumentó con las mayores concentraciones de dichos metales y esta fue mayor en *Solanum nigrum* L. Sharma y Dietz (2006) han demostrado que la prolina protege e impide la inhibición de la glucosa-6-fosfato dihidrogenasa y la nitrato reductasa durante el estrés por zinc y que es importante en la ligación de iones porque no forman complejos con las fitoquelatinas, indicando que actúan sobre el mismo propósito pero en formas separadas.



**Grafico N°16.** Contenido de prolina en hoja y en raíz en las distintas concentraciones de Zn(II) en el cv Malma. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.8. Contenido de zinc

En cuanto a la concentración de Zn (II) aplicada se puede decir que a medida que la concentración aumentaba, esta también aumentaba dentro de la planta (Gráfico 17) (Tablas del Anexo 32, 33, 34 y 35). Los valores obtenidos en el sustrato muestran valores 4 veces inferiores a los obtenidos en la biomasa denotando la capacidad de acumulación de la planta como se observa en el Cuadro 2. Se calculó el índice de biodisponibilidad (FD), el índice de acumulación (FA), el índice de traslocación (FT) y el índice de bioacumulación (FB). El FD, FA y el FB fueron superiores a 1 mientras que el FT fueron cercanos a 1. Cuando estos índices son superiores a 1 indican que la planta es eficiente en la extracción del metal desde el sustrato ya sea acumulándolo en sus raíces o en toda su biomasa. Estos resultados indicarían que *Festuca arundinacea* sirve para fitorremediación de zinc para las concentraciones estudiadas y que su estrategia de remediación sería la de fitoestabilización.

El éxito de la fitorremediación depende de la selección de especies y enmiendas que maximicen la eliminación de contaminantes. Los diferentes patrones de tolerancia y acumulación de metales, ofrecen un amplio surtido de germoplasma para la selección adecuada de tecnologías de fitorremediación, tal es así que las poblaciones tolerantes a los metales son genéticamente distintas de las poblaciones no tolerantes de mismas especies (Antonovics *et al.*, 1971).

Baker (1981) investigó los diferentes mecanismos de absorción de metales de plantas tolerantes que crecen en suelos con diferentes concentraciones de metales pesados lo que le permitió clasificarlas en 3 grandes grupos: acumuladoras, indicadoras y excluyentes. Una planta acumuladora concentra metales principalmente en su parte aérea por lo que se caracteriza por tener un índice de traslocación mayor a 1. En estas especies, la absorción y el transporte de los metales están regulados. En contraposición, las plantas excluyentes, no son capaces de regular la absorción de metales por lo que restringen su transporte de la raíz a los brotes. Baker (1981) consideró la relación entre los metales pesados en el suelo y en los brotes de la planta y verificó que la concentración en brotes de plantas excluyentes era baja y constante en un amplio rango de concentraciones del suelo hasta un cierto valor por encima del

cual se produce un transporte sin restricciones. Por último las plantas indicadoras, que usan estrategias similares a estas 2 últimas, permiten reflejar la concentración de un metal en el suelo. Así, una acumuladora se puede usar de manera eficiente en un proceso de fitoextracción mientras que las excluyentes en los de fitoestabilización.

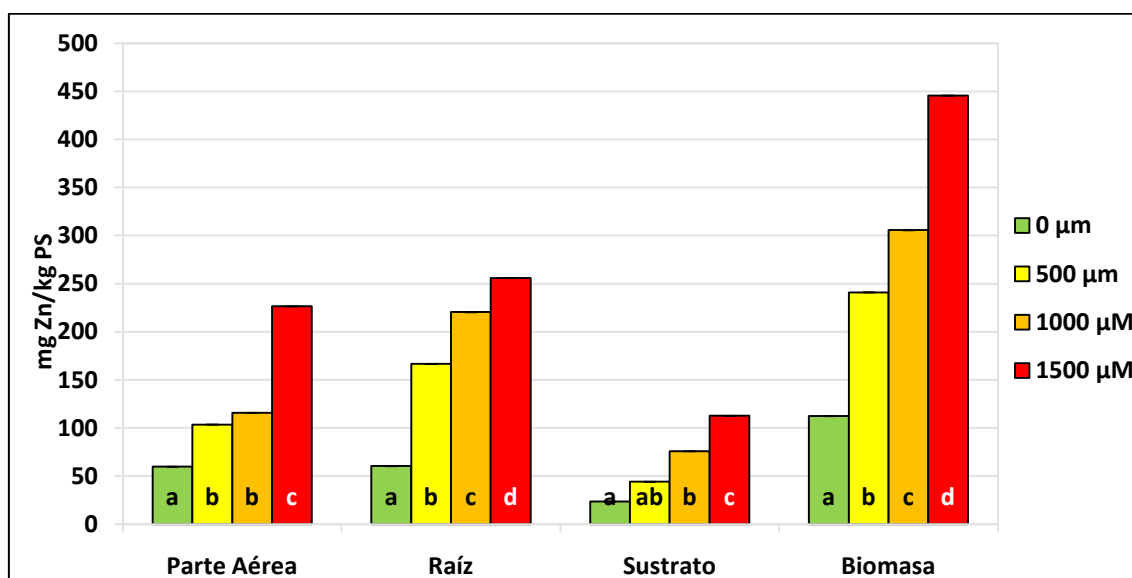
La bibliografía cita algunas especies capaces de acumular zinc en elevadas cantidades. *Cardaminopsis halleri* L. en los ensayos de McGrath *et al.* (2000), demostró poder acumular 9000 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc en sus brotes cuando creció en soluciones nutritivas enriquecidas con este metal. Barrutia *et al.* (2011) estudiaron la acumulación de metales por *Thlaspi caerulescens* J.Presl & C.Presl creciendo en una mina abandonada encontrando en los brotes concentraciones de zinc de 18250 mg.kg<sup>-1</sup>; justamente esta especie es catalogada como hiperacumuladora y citada como planta base para fitorremediación de dicho metal.

Cao *et al.* (2004) estudiaron especies que crecían en un pasivo minero en Montevecchio, Italia, donde la contaminación por metales pesados era muy alta (2000-3000 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc y 8000-9000 mg.kg<sup>-1</sup> de plomo). Entre ellas destacaron dondiego de noche (*Mirabilis jalapa* L.) que acumuló 550 mg.kg<sup>-1</sup> de plomo, curry (*Helichrysum sumitalicum* (Roth) G.Don) que acumuló 1500 y 2000 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc en parte aérea y raíz respectivamente y *Festuca arundinacea* que acumuló 6000 y 9000 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc en parte aérea y raíz cuando se ensayó en laboratorio. Esta última mostró la mayor tolerancia al zinc y leve tolerancia al plomo. De hecho, luego de cuatro meses de crecimiento, las raíces de la planta habían alcanzado una profundidad de 7 cm. La alta acumulación de zinc implica que puede ser usada eficientemente para eliminar el zinc pero no el plomo. El hecho de que la concentración de zinc en las raíces es más alta que en la parte aérea, indica que esta planta se comporta como un excluidor según lo mencionado por Baker (1981). Precisamente los factores de acumulación son de 4 para la parte aérea y 5 para las raíces indicando que podría ser utilizada para programas de fitorremediación como una especie fitoestabilizadora. Los resultados del presente trabajo son similares a los obtenidos por Cao *et al.* (2004), las cantidades de zinc encontradas en las plantas fueron menores por las distintas condiciones del ensayo (menores concentraciones de zinc en el sustrato) los índices de acumulación mostraron la misma tendencia, ser mayores en raíz que en parte aérea pero con una distribución prácticamente equitativa.

Para realizar fitorremediación no se necesita únicamente de plantas hiperacumuladoras. Algunas son aptas para fitoestabilización, las cuales pueden incluirse al comienzo del programa de fitorremediación para evitar el lixiviado de los metales pesados a través del perfil del suelo y contaminar aguas subterráneas. Puga *et al.* (2006) estudiaron las plantas que crecían en cercanías de las presas de jales en Chihuahua, México que concentran varios elementos potencialmente tóxicos, entre ellos arsénico y zinc (1000-3000 mg.kg<sup>-1</sup>) y destacaron que la especie que mayor concentración de zinc mostró fue la pata de gallo (*Cynodon dactylon* L.) con 302 mg.kg<sup>-1</sup> en las hojas y 226 mg.kg<sup>-1</sup> en la raíz. La jarilla (*Baccharis glutinosa* PERS.) también mostró niveles importantes de zinc, en la hoja concentró 361 mg.kg<sup>-1</sup> y 166 mg.kg<sup>-1</sup> en la raíz. Ambas plantas fueron catalogadas como acumuladoras pero no hiperacumuladoras de dicho metal. A pesar de esto, estas plantas tienen la capacidad

de acumular zinc en concentraciones superiores a las normales. Cameron (1992) menciona concentraciones de 100-400 ppm de zinc como muy fitotóxicas y que, en general, especies gramíneas herbáceas la concentración normal de zinc en las hojas puede variar entre 6 y 80 mg.kg<sup>-1</sup> con medias que no superan los 47 mg.kg<sup>-1</sup>. Estudios más recientes realizados por Noulas *et al.* (2018) destacan que la mayoría de las plantas poseen 30-100 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc en la biomasa y que contenidos mayores a 300 mg.kg<sup>-1</sup> son generalmente fitotóxicos. En este trabajo fueron medidos contenidos de hasta 445 mg.kg<sup>-1</sup> sin producirse una disminución significativa del crecimiento.

También se ha demostrado que especies agrícolas de interés económico y alimenticio pueden acumular zinc en concentraciones que pueden causar problemas a la salud. Long *et al.* (2003) evaluaron dos variedades de pakchoi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis* (L.) Kitam), y apio (*Apium graveolens* L.) creciendo en sustratos con distintas concentraciones de zinc (0, 100, 200, 300, 400 mg.kg<sup>-1</sup>). Encontraron que en las más altas concentraciones solo hubo una disminución del 10% del rendimiento y que las plantas habían acumulado en promedio entre 150 a 200 mg.kg<sup>-1</sup> en la parte aérea. Basándose en el umbral de toxicidad en la dieta humana para zinc (20 mg.kg<sup>-1</sup>) concluyeron que estas especies pueden acumular zinc en sus partes comestibles sobre el umbral tóxico antes de que la reducción de rendimiento sea notoria.



**Grafico 17.** Contenido de Zn(II) en parte aérea, en raíz, en sustrato y en biomasa en las distintas concentraciones de Zn en el cv 'Malma'. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05).

**Tabla 2.** Índices que denotan la translocación del Zn(II) dentro del cv 'Malma'.

Tratamiento de Zn(II) (μM)	Índice de Biodisponibilidad (Raíz/Suelo)	Índice de Acumulación (PA/Suelo)	Índice de Traslocación (PA/Raíz)	Índice de Bioacumulación (Biomasa/Suelo)
500	3,38	2,81	1,02	5,83
1000	2,16	1,20	0,61	4,62
1500	1,95	2,03	1,04	3,38

## 7. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados del ensayo de germinación se concluye que:

- ✚ Las altas concentraciones de zinc provocaron una marcada disminución de la longitud y peso seco radicular con una inhibición de la división celular y de la elongación de la raíz.
- ✚ Tanto el porcentaje de germinación como el peso aéreo de las plántulas no fueron afectados por la presencia de zinc.

Por lo tanto se infiere que la acumulación y exclusión dentro de las células de la raíz es una estrategia para evitar que el zinc llegue y afecte a la parte aérea en los primeros estadios de crecimiento.

De acuerdo a los resultados del ensayo de crecimiento se concluye que:

- ✚ Hubo una disminución de la biomasa aérea y radicular, del área foliar, el contenido de clorofila, carotenos y proteínas, como consecuencia de la presencia de las diferentes concentraciones de zinc ensayadas.
- ✚ El contenido de MDA, la conductividad relativa de las membranas, las proteínas en raíces y de prolina aumentaron; evidenciando el daño que el zinc causa a las membranas y la estrategia de la planta para superar la situación de estrés

### 7.1. Conclusión General

*Festuca arundinacea* tiene la capacidad de absorber gran cantidad de zinc y acumularlo en su biomasa sin afectar significativamente su crecimiento debido a que tiene la capacidad de desarrollar diversas estrategias tales como disminución de biomasa, de contenido de clorofila y carotenos, aumento de MDA, proteínas complejantes, quelantes y transportadoras de iones en el interior y hacia afuera de la célula, además de la compartimentalización en vacuolas por lo que esta especie podría ser utilizada como fitoestabilizadora en una primera etapa en proyectos de fitorremediación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Petrella, F. (2002). Heavy metals in agricultural soils from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment. *Chemosphere*, 49(6), 545-557.
- Abud, Y. C., Guilla, J. N., Trujillo, M. M. (2013). Efecto de níquel, plomo y zinc, en el desarrollo de la raíz de *Nicotiana tabacum* L. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 10(1), 39-48.
- Al Khateeb, W., Al-Qwasemeh, H. (2014). Cadmium, copper and zinc toxicity effects on growth, proline content and genetic stability of *Solanum nigrum* L., a crop wild relative for tomato; comparative study. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), 31-39.
- Angelova V., Ivanova, R., Delibaltova, V., Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19(3), 197-205.
- Antonovics, J., Bradshaw, A. D., Turner, R. G. (1971). Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research*. Academic Press, (vol. 7, pp. 1-85).
- Ashraf M., Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
- Atici, Ö., Ağar, G., Battal, P. (2005). Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. *Biologia Plantarum*, 49(2), 215-222.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, 3(1-4), 643-654.
- Barla, M. J., Escaray, R. U., Bustingorry, J. F. (2005). Copper, zinc and chromium in water, sediments and biota in the pampean Chascomús Lake (Argentina). *Natura Neotropicalis*, 1(30), 67-76.
- Barrutia, O., Artetxe, U., Hernández, A., Olano, J. M., García-Plazaola, J. I., Garbisu, C., Becerril, J. M. (2011). Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of northern Spain: implications for phytoremediation and germplasm preservation. *International Journal of Phytoremediation*, 13(3), 256-270.
- Bates LS, Waldren RP Tease ID (1973). Rapid determination of the proline for stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Ben Naceur, M. (1994). Contribution to assessment of resistance degree to water stress (drought and water flooding) at barley (*Hordeum vulgare* L.) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *FAO*.
- Bermudez, G. M., Jasan, R., Plá, R., Pignata, M. L. (2011). Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 193, 264-271.
- Bidegain, J. C., Jurado, S. (2011). Adsorción de contaminantes en sedimentos del Holoceno de la región de La Plata. *Ciencia y Tecnología de los Materiales*, 1, 75-84.
- Bonfranceschi A., Flocco C. G. Donati E. R. (2017). Study of heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in a hydroponic environment. *Journal of Hazardous Materials* 165, 366-371.
- Boswell, F. C. (1975). Municipal Sewage Sludge and Selected Element Applications to Soil: Effect on Soil and Fescue 1. *Journal of Environmental Quality*, 4(2), 267-273.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cakmak, I. (2015). Zinc para la Producción Global Sustentable de Cultivos y mejores Dietas Nutricionales. *Conferencia del Curso Internacional de Nutrición de Cultivos*.
- Cameron, R. E. (1992). Guide to site and soil description for hazardous waste characterization. Metals, 250. *Environmental Protection Agency EPA/600/4-91/029*.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131-143.

- Cao, A., Cappai, G., Carucci, A., Muntoni, A. (2004). Selection of plants for zinc and lead phytoremediation. *Journal of Environmental Science and Health*, 39(4), 1011-1024.
- Chaca, M. P., Vigliocco, A., Reinoso, H., Molina, A., Abdala, G., Zirulnik, F., Pedranzani, H. (2014). Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* L. Merr. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2815-2826.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., El Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127(2), 139-147.
- Chaney, R. L. (1993). Zinc phytotoxicity. *Zinc in soils and plants* Springer, Dordrecht. (pp. 135-150).
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W. B., Jemal, F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 837-844.
- Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475-486.
- Cuizano, N. A., Navarro, A. E. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Anales de Química* (Vol. 104, No. 2)
- Cunningham, S.D., Berti, W.R. Huang, J.W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils and sediments. *Bioremediation: Science and Applications*, 145-56.
- Davies, K. L., Davies, M. S., Francis, D. (1991). The influence of an inhibitor of phytochelatin synthesis on root growth and root meristematic activity in *Festuca rubra* L. in response to zinc. *New Phytologist*, 118(4), 565-570.
- Davies, K. L., Davies, M. S., Francis, D. (1991). Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of *Festuca rubra* L. *Plant, Cell & Environment*, 14(4), 399-406.
- Davis, J. G., Parker, M. B. (1993). Zinc toxicity symptom development and partitioning of biomass and zinc in peanut plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16(12), 2353-2369.
- De Vos CHR, Schat H, Vooijs R. Who E. (1989). Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silenecucubalus*. *Journal of Plant Physiology*, 135, 164-169.
- De Vos CHR, Schat H, De Waal MAM, Vooijs R. Ernst WHO. (1991). Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silenecucubalus*. *Physiologia Plantarum*, 82, 523-528.
- Ebbs, S. D., Kochian, L. V. (1997). Toxicity of Zinc and Copper to Brassica Species: Implications for Phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 26(3), 776-781.
- Efroymsen, R.A., M.E. Will, G.W. Suter A.C. Wooten. (1997). Toxicological benchmarks for screening contaminants of potential concern for effects on terrestrial plants. *Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy. Oak Ridge, Tennessee*. pp123.
- El-Ghamery, A. A., El-Kholy, M. A., y El-Yousser, M. A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn<sup>2+</sup> in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticumaestivum* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 29-41.
- Ernst, W.H. (1996). Stress bei Pflanzen. *Schwermetalle*. pp. 191-220.
- Felipó, M.T., Garau, M.A. (1987). La contaminació del sòl. Procès de degradació del mediedàfic i de l'entorn. *Quaderns D'Ecologia Aplicada*, 85 pp
- Fergusson, J. E. (1990). The heavy metals, chemistry. Environmental impact and health effect. *Oxford*. (Vol 7, pp 614)
- Fontes, R. L. F., Cox, F. R. (1998). Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8), 1723-1730.
- Foy, C. D., Chaney, R. L. White, M. C., (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 511-566.
- Franco, L. F. L., Muñoz, P. T. L., Garcia, F. G. M. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14(2), 145-153.



- García, I. Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por Metales Pesados. *Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola*. <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm>
- Gbadegesin, A, MA Olabode. (2000). Soil properties in the metropolitan region of Ibadan, Nigeria: implications for the management of developing countries. *Environmentalist* 20, 205-214.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giuffré, L; S Ratto, L Marbán (1999). Contaminación de un suelo urbano afectado por residuos sólidos. *Gerencia Ambiental*, 37, 529-531.
- Guerinot ML. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 190–198.
- Guisande-Donadio Cristian; Plaza Cazón Josefina, Donati Edgardo. (2016) Diagnóstico y evaluación de la contaminación ambiental en el pasivo minero Concordia (Dpto de los Andes-Prov. Salta) 5° Simposio Internacional De Biotecnología e Ingeniería Ambiental.
- Hall JL. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1–11.
- Heath R. L, Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Biochemistry and Biophysics*. 125, 189–198.
- Ho, C. H., Applegate, B., Banks, M. K. (2007). Impact of microbial/plant interactions on the transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere of *Festuca arundinacea*. *International Journal of Phytoremediation*, 9(2), 107-114.
- Hosseini, Z., Poorakbar, L. (2013). Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9(1), 66-73.
- Intawongse, M., Dean, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants*, 23(1), 36-48.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A. K., Chandra, A. (2010). Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), 979-986.
- 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(3), 65-76.
- Kabata-Pendias, A. (2000). *Trace elements in soils and plants*. Third Edition. CRC Press, 365-413.
- Kasai, Y., Kato, M., Aoyama, J., Hyodo, H. (1998). Ethylene production and increase in aminocyclopropanecarboxylate oxidase activity during senescence of broccoli florets. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39.
- Khudsar, T., Iqbal, M., Sairam, R. K. (2004). Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. *Biologia Plantarum*, 48(2), 255-260.
- Kirschbaum, A., Murray, J., Arnosio, M., Tonda, R., Cacciabue, L. (2012). Pasivos ambientales mineros en el noroeste de Argentina: aspectos mineralógicos, geoquímicos y consecuencias ambientales. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 29(1), 248-264.
- Koca M, Bor M, Ozdemir F, Turkan I (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 344-351
- Konno H, Nakato T, Nakashima S, Katoh K. (2005). *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *Journal of Experimental Botany* 56, 1923–1931.
- Krupa, Z., M. Baranowska, D. Orzol. (1996). Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiologiae Plantarum*, 18(2), 147-151.
- Labunska, I., Brigden, K., Stringer, R. (2000). Contaminantes orgánicos y metales pesados en sedimentos y muestras de agua asociados con el Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso, Argentina, 2000. *Contaminantes orgánicos y metales pesados en sedimentos y muestras de agua asociados con el Polo Petroquímico de Ensenada-Berisso, Argentina*. Greenpeace, pp 14.

- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E (2001). The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212: 323-331.
- Lewis S, Handy RD, Cordi B, Billingham Z, Depledge MH. (1999). Stress proteins (HSPs): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8(5), 351-368.
- Li, Y. M., Chaney, R. L., Siebielec, G., Kerschner, B. A. (2000). Response of four turfgrass cultivars to limestone and biosolids-compost amendment of a zinc and cadmium contaminated soil at Palmerton, Pennsylvania. *Journal of Environmental Quality*, 29(5), 1440-1447.
- Lidon FC, Henriques FS. (1992). Copper toxicity in rice: diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. *Soil Science* 154, 130-135.
- Lin, D., Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150(2), 243-250.
- Llosa, R., Noriega, G., de Aguirre, E. N., Kesten, E. (1990). Niveles de plomo, cadmio, zinc y cobre en suelos del área metropolitana y suburbana de Buenos Aires. *Ciencia del Suelo*, 8, 3-8
- Lou L. Q, Shen Z. G, Li X. D. (2004). The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* 51, 111-120.
- Long, X. X., Yang, X. E., Ni, W. Z., Ye, Z. Q., He, Z. L., Calvert, D. V., Stoffella, J. P. (2003). Assessing zinc thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(9-10), 1421-1434.
- Lucho, C.A., Álvarez, M., Beltrán, R.I., Prieto, F., Poggi, H. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environment International*, 31(3), 313-323.
- Lutts S, Kinet, J. M, Bouharmont J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L) cultivars differ in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78, 389-398.
- Machalec, J., Speltini, C., Coppo, G., Capato, N., Flamini, L., Devescovi, M. P., Martínez, N (2011). Desarrollo frutihortícola en las inmediaciones del Polo petroquímico Dock Sud.
- Madaleno, IM. (2001). Urban Agriculture Supportive Policies in Latin America. *City Farmer, Canada's Office of Urban Agriculture*
- Marbán, L; L Giuffré; S Ratto AAgostini. (1999). Contaminación con metales pesados en un suelo de la cuenca del río Reconquista. *Ecología Austral* 9: 15-19
- Margas Marcos, F. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista Española de Salud Pública*, 79(2), 117-127.
- Marschner, H. (1998). Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press, San Diego, CA*. pp. 313-396.
- Martí, L., Filippini, M. F., Drovandi, A., Salcedo, C., Troilo, S., Valdés, A. (2011). Evaluación de metales pesados en suelos de los oasis irrigados de la Provincia de Mendoza: I. Concentraciones totales de Zn, Pb, Cd y Cu. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 43(2), 203-221.
- McGrath, S. P., Dunham, S. J., Correll, R. L. (2000). Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*.
- Melignani, E. (2017). *Pautas para la remediación y recuperación de áreas sujetas a contaminación mixta de cuencas urbanas y periurbanas de llanura*.
- Murphy A, Taiz L. (1997). Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 Arabidopsis ecotypes. *New Phytologist Journal*, 136, 211-222.
- Murphy A. S, Eisinger W. R, Shaff J. E, Kochian. LV, Taiz L. (1999). Early copper-induced leakage of K<sup>+</sup> from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology* 121, 1375-1382.
- Navarro Aviñó JP, Aguilar Alonso I., López-Moya JR. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 16(2).

- Neumann D, Nieden U. Z, Lichtenberger O, Leopold I. (1995). How does *Armeriamaritima* tolerate high heavy metal concentrations? *Journal of Plant Physiology*, 146,707–717.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., Karyotis, T. (2018). Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- Orroño, I. (2002). Acumulación de metales (cadmio, zinc, cobre, cromo, níquel y plomo) en especies del género *Pelargonium*: suministro desde el suelo, ubicación en la planta y toxicidad. *Universidad de Buenos Aires*.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., del Río, L.A. (2002). Plant proteases/protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 521-530.
- Parrish ZD, Banks MK, Schwab AP (2004) Effectiveness of phytoremediation as a secondary treatment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted soil. *International Journal of Phytoremediation*, 6(2), 119-137.
- Passow, H., A. Rothstein, y T. W. Clarkson. (1961). The general pharmacology of heavy metals. *Pharmacol.* 13, 185-224.
- Pence, N. S., Larsen, P. B., Ebbs, S. D., Letham, D. L., Lasat, M. M., Garvin, D. F., Kochian, L. V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4956-4960.
- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(6), 727-734.
- Prasad, K. V. S. K., Saradhi, P. P. (1995). Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. *Phytochemistry*, 39(1), 45-47.
- Prasad, M.N.V. (1998). Metal-biomolecule complexes in plants: occurrence, functions, and applications. *Analisis* 26 (6), 25-28.
- Puga, S., Sosa, M., Mora, A. D. L., Pinedo, C., Jiménez, J. (2006). Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(2), 75-82.
- Qu, R. L., Li, D., Du, R., Qu, R. (2003). Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. *HortScience*, 38(4), 623-626.
- Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F. (2001). Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *Journal of Experimental Botany*, 52,77–84.
- Ramani, S., S. Kannan (1985). Studies on translocation of zinc in bean plants: evidence for retranslocation during new growth. *Journal of Plant Physiology*, 121(4), 313-318.
- Ratto, S; M González; L Marbán, L Giuffré. (1999). Calidad de suelos antrópicos en espacios verdes urbanos. *Gerencia Ambiental* 38:36-40
- Rauser WE. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants—the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31,19–48.
- Ren, F. C., Liu, T. C., Liu, H. Q., Hu, B. Y. (1993). Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year old American ginseng plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16(2), 393-405.
- Ritchie, G.S.P., Sposito, G. (1995). *Speciation in soils*. Chemical Speciation in the environment. Blackie Academic and Professional. pp 226-233.
- Rosen, J. A., Pike, C. S., Golden, M. L. (1977). Zinc, iron, and chlorophyll metabolism in zinc-toxic corn. *Plant Physiology*, 59(6), 1085-1087.
- Rout, G.R., Das, P. (2009) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23, 3-11
- Ruano, A., Poschenrieder, C. H., Barcelo, J. (1988). Growth and biomass partitioning in zinc-toxic bush beans. *Journal of Plant Nutrition*, 11(5), 577-588.

- Ruscitti MF, Arango MC, Ronco MG, Beltrano J. (2011). Inoculation with mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* or *G. intraradices*- modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23:15-25
- Sagardoy, R. , Morales, F. , López-Millán, A. , Abadía, A., Abadía, J. (2009), Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris*L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology*, 11: 339-350.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 49, 643-68.
- Sánchez-Urdaneta, A. B., Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., Aguirre, R., Rogelio, J., Cárdenas, E., Galicia Jiménez, A. B. (2003). Permeabilidad de las membranas radicales de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre y domesticado bajo déficit de humedad. *Interciencia*, 28(10), 597-603.
- Sarmiento, M. I., Idrovo, Á. J., Restrepo, M., del Pilar Díaz, M., González, A. (1999). Evaluación del impacto de la contaminación del embalse del Muña sobre la salud humana. *Revista de Salud Pública*, 1(2), 159-171.
- Schnitzler, WH; R Holmer, S Sansavini. (1999). Strategies for urban horticulture in developing countries. *Acta Horticulturae* 495, 331-335.
- Sharma, S. S., Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Shen Z. G, Zhang F. Q, Zhang F. S. (1998). Toxicity of copper and zinc in seedlings of Mung Bean and inducing accumulation of polyamine. *Journal of Plant Nutrition* 21, 1153-1162.
- Silver S. (1996). Bacterial resistance to toxic metal ions—a review. *Gene*, 179, 9-19.
- Singh, S., Sinha, S. (2005). Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 118-127.
- Soleymani, M., Hajabbasi, M. A., Afyuni, M., Charkhabi, A. H., Shariatmadari, H. (2009). Bioaccumulation of nickel and lead by Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*) from two contaminated soils. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 7(2), 59-70.
- Sosa Torres ME, Saucedo-Vázquez JP, Kroneck PM (2015). Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases. *Metal Ions in Life Sciences*. 15. Springer. pp. 1-12.
- Strange J, Macnair MR. (1991). Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. *New Phytologist* 119, 383-388.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. 3ra. Ed. Sinauer Associates, pp 779.
- Tumberley, M.H., R.R. Brooks, P.J. Peterson. (1973). The distribution of nickel, copper, zinc and iron in tree leaves. *Journal of experimental botany*, 24(5), 889-895.
- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A. (2005). Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere*, 59(7), 1005-1013.
- Van Assche F, Clijsters H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13, 195-206.
- Vázquez, M. D., Barceló, J., Poschenrieder, C. H., Madico, J., Hatton, P., Baker, A. J. M., Cope, G. H. (1992). Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology*, 140(3), 350-355.
- Wainwright SJ, Woolhouse HW. (1977). Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in *Agrostis tenuis* Sibth.: cell elongation and membrane damage. *Journal of Experimental Botany* 28, 1029-1036.
- Webb, J. M. (1994). Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere. Crowley y GD Luster. *Recent aspects of Mn and Zn absorption and translocation in cereals*. CRC Press, 183-199.
- Wei L, Luo Ch, Li X, Shen Z. (2008). Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 238-246
- Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls A and B, as well as Total carotenoids, using various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.

- Williams LE, Pittman JK, Hall JL. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 77803,1–23.
- Yang, H.M., X.Y. Zhang, G.X. Wang.(2004). Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. *Journal of Plant Physiology*. 51(4), 464-468.
- Zamani, N., Sabzalian, M. R., Khoshgoftarmansh, A., Afyuni, M. (2015). Neotyphodium endophyte changes phytoextraction of zinc in *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(5), 456-463.
- Zhao, S., Jia, L., Duo, L. (2013). The use of a biodegradable chelator for enhanced phytoextraction of heavy metals by *Festuca arundinacea* from municipal solid waste compost and associated heavy metal leaching. *Bioresource Technology*, 129, 249-255.
- Zhen-guo, L. L. Q. S. (2001). The role of metallothioneins and phytochelatins in heavy metal tolerance of plants. *Journal of Biology*, 3, 000.
- Zhu, D., A. P. Schwab, M. K. Banks. (1999). Heavy Metal Leaching from Mine Tailings as Affected by Plants. *Journal of Environmental Quality*, 28(6), 1727-1732.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N. (1999). Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology* 121,1169–1177.
- Zuluaga, J., Rearte, E., Drovandi, A., Bermejillo, A., Filippini, M. F., Cónsoli, D., Pereyra, M. (2013). Evolución de la contaminación del recurso hídrico en el cinturón verde de Mendoza. *Congreso Nacional del Agua CONAGUA*.
- Zúñiga, F. B. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados (Vol. 1). *Uady*.

## 8. ANEXO. TABLAS DE ESTADÍSTICA

**Tabla N°1.** Análisis de la varianza de la longitud de la radícula del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Longitud radicular (mm)	812	55,64	10	23910,77	115,27	<0,0001
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	23910,77	115,27	<0,0001
Error			801	207,44		
Total			811			

**Tabla N°2.** Análisis de la varianza de la longitud de la radícula del cv Baralta.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Longitud radicular (mm)	930	52,23	10	32533,04	141,64	<0,0001
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	32533,04	141,64	<0,0001
Error			919	229,69		
Total			929			

**Tabla N°3.** Análisis de la varianza de la longitud de la radícula del cv Flexible.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Longitud radicular (mm)	939	53,67	10	31420,11	186,40	<0,0001
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	31420,11	186,40	<0,0001
Error			928	168,56		
Total			938			

**Tabla N°4.** Análisis de la varianza del porcentaje de germinación del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Porcentaje de germinación (%)	33	9,42	10	96,57	1,63	0,1630
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	96,57	1,63	0,1630
Error			22	59,26		
Total			32			

**Tabla N°5.** Análisis de la varianza del porcentaje de germinación del cv Baralta

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Porcentaje de germinación (%)	33	4,36	10	11,31	0,67	0,7381
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	11,31	0,67	0,7381
Error			22	16,84		
Total			32			

**Tabla N°6.** Análisis de la varianza del porcentaje de germinación del cv Flexible.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
Porcentaje de germinación (%)	33	3,60	10	33,67	2,86	0,0192
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	33,67	2,86	0,0192
Error			22	11,78		
Total			32			

**Tabla N°7.** Análisis de la varianza del peso seco aéreo del cv Malma.

F.V.	N	CV	2,13	CM	F	p-valor
Peso seco aéreo (g)	33	2,19	10	40,85	10,21	<0,0001
Tratamientos ( $\mu\text{M}$ )			10	40,85	10,21	<0,0001
Error			22	4,00		
Total			32			

**Tabla N°8.** Análisis de la varianza del peso seco radicular del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco radicular (g)</b>	33	3,94	10	1229,55	287,77	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	1229,55	287,77	<0,0001
<b>Error</b>			22	4,27		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°9.** Análisis de la varianza del peso seco total del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco total (g)</b>	33	2,09	10	1171,25	125,09	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	1171,25	125,09	<0,0001
<b>Error</b>			22	9,36		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°10.** Análisis de la varianza (SC tipo III) del peso seco aéreo del cv Baralta

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco aéreo (g)</b>	33	2,43	10	24,27	4,45	0,0017
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	24,27	4,45	0,0017
<b>Error</b>			22	5,45		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°11.** Análisis de la varianza del peso seco radicular del cv Baralta

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco radicular (g)</b>	33	5,68	10	1187,67	122,10	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	1187,67	122,10	<0,0001
<b>Error</b>			22	9,73		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°12.** Análisis de la varianza del peso seco total del cv Baralta.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco total (g)</b>	33	2,75	10	987,00	57,44	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	987,00	57,44	<0,0001
<b>Error</b>			22	17,18		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°13.** Análisis de la varianza peso seco aéreo del cv Flexible.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco aéreo (g)</b>	33	1,95	10	166,96	52,47	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	166,96	52,47	<0,0001
<b>Error</b>			22	3,18		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°14.** Análisis de la varianza peso seco radicular del cv Flexible.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco radicular (g)</b>	33	10,85	10	1548,00	50,53	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	1548,00	50,53	<0,0001
<b>Error</b>			22	30,64		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°15.** Análisis de la varianza peso seco radicular del cv Flexible.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco total (g)</b>	33	4,30	10	1757,56	46,93	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			10	1757,56	46,93	<0,0001
<b>Error</b>			22	37,45		
<b>Total</b>			32			

**Tabla N°16.** Análisis de la varianza peso seco aéreo del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco aéreo (g)</b>	28	14,87	3	0,47	6,43	0,0024
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,47	6,43	0,0024
<b>Error</b>			24	0,07		
<b>Total</b>			27			

**Tabla N°17.** Análisis de la varianza peso seco de la raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco de la raíz (g)</b>	28	10,94	3	0,03	5,58	0,0048
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,03	5,58	0,0048
<b>Error</b>			24	0,01		
<b>Total</b>			27			

**Tabla N°18.** Análisis de la varianza peso seco total del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Peso seco total (g)</b>	28	11,95	3	0,76	8,29	0,0006
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,76	8,29	0,0006
<b>Error</b>			24	0,09		
<b>Total</b>			27			

**Tabla N°19.** Análisis de la varianza del aérea foliar del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Área foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	28	20,00	3	2098,28	18,20	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	2098,28	18,20	<0,0001
<b>Error</b>			24	115,26		
<b>Total</b>			27			

**Tabla N°20.** Análisis de la varianza de la conductividad de las membranas celulares de hoja del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>CR Hoja (%)</b>	25	12,94	3	8,00	14,61	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	8,00	14,61	<0,0001
<b>Error</b>			21	0,55		
<b>Total</b>			24			

**Tabla N°21.** Análisis de la varianza de la conductividad de las membranas celulares de raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>CR Raíz (%)</b>	23	14,12	3	25,22	13,97	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	25,22	13,97	<0,0001
<b>Error</b>			19	1,81		
<b>Total</b>			22			



**Tabla N°22.** Análisis de la varianza del contenido de MDA en hoja del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>MDA Hoja (MDA/g)</b>	19	30,73	3	0,81	3,34	0,0477
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,81	3,34	0,0477
<b>Error</b>			15	0,24		
<b>Total</b>			18			

**Tabla N°23.** Análisis de la varianza del contenido de MDA en raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>MDA Raíz (MDA/g)</b>	19	22,41	3	1,75	7,54	0,0026
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	1,75	7,54	0,0026
<b>Error</b>			15	0,23		
<b>Total</b>			18			

**Tabla N°24.** Análisis de la varianza del contenido de clorofila A del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Clorofila A</b>	21	16,34	3	18,27	17,43	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	18,27	17,43	<0,0001
<b>Error</b>			17	1,05		
<b>Total</b>			20			

**Tabla N°25.** Análisis de la varianza del contenido de clorofila B del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Clorofila B</b>	21	20,23	3	1,89	16,00	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	1,89	16,00	<0,0001
<b>Error</b>			17	0,12		
<b>Total</b>			20			

**Tabla N°26.** Análisis de la varianza del contenido de clorofila total del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Clorofila total</b>	21	17,06	3	31,92	17,28	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	31,92	17,28	<0,0001
<b>Error</b>			17	1,85		
<b>Total</b>			20			

**Tabla N°27.** Análisis de la varianza del contenido de clorofila total del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Carotenoides totales</b>	24	21,52	3	0,59	6,91	0,0022
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,59	6,91	0,0022
<b>Error</b>			20	0,08		
<b>Total</b>			23			

**Tabla N°28.** Análisis de la varianza del contenido de proteínas en hoja del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Proteína Hojas (µg/mg)</b>	23	12,75	3	17,03	52,66	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	17,03	52,66	<0,0001
<b>Error</b>			19	0,32		
<b>Total</b>			22			

**Tabla N°29.** Análisis de la varianza del contenido de proteínas en raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Proteína Raíz (µg/mg)</b>	24	15,69	3	0,25	5,75	0,0053
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,25	5,75	0,0053
<b>Error</b>			20	0,04		
<b>Total</b>			23			

**Tabla N°30.** Análisis de la varianza del contenido de prolina en hoja del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Prolina Hojas (µg/mg)</b>	21	23,00	3	27844,99	4,48	0,0172
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	27844,99	4,48	0,0172
<b>Error</b>			17	6220,14		
<b>Total</b>			20			

**Tabla N°31.** Análisis de la varianza del contenido de prolina en raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Prolina Raíz (µg/mg)</b>	18	19,19	3	30342,78	7,48	0,0032
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	30342,78	7,48	0,0032
<b>Error</b>			14	4058,14		
<b>Total</b>			17			

**Tabla N°32.** Análisis de la varianza del contenido de Zn en el sustrato.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Zn en Sustrato (mg/g)</b>	12	28,88	3	4,5E <sup>-03</sup>	13,26	0,0018
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	4,5E <sup>-03</sup>	13,26	0,0018
<b>Error</b>			8	3,4E <sup>-04</sup>		
<b>Total</b>			11			

**Tabla N°33.** Análisis de la varianza del contenido de Zn en parte aérea del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Zn en parte aérea(mg/g)</b>	17	13,44	3	0,02	82,65	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,02	82,65	<0,0001
<b>Error</b>			13	2,3E <sup>-04</sup>		
<b>Total</b>			16			

**Tabla N°34.** Análisis de la varianza del contenido de Zn en la raíz del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Zn en Raíz (mg/g)</b>	17	12,77	3	0,03	83,84	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,03	83,84	<0,0001
<b>Error</b>			13	3,9E <sup>-04</sup>		
<b>Total</b>			16			

**Tabla N°35.** Análisis de la varianza del contenido de Zn en la biomasa del cv Malma.

F.V.	N	CV	GI	CM	F	p-valor
<b>Zn en biomasa(mg/g)</b>	17	12,55	3	0,08	84,90	<0,0001
<b>Tratamientos (µM)</b>			3	0,08	84,90	<0,0001
<b>Error</b>			13	9,3E <sup>-04</sup>		
<b>Total</b>			16			