



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Optimización de las condiciones de cultivo de *Eupatorium cannabinum* para su posterior uso en fitorremediación.



Héctor González Fernández
21 Julio 2015

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Optimización de las condiciones de cultivo de
Eupatorium cannabinum para su posterior uso en
fitorremediación.**

**Optimization of culture conditions *Eupatorium
cannabinum* for later use in phytoremediation**

Héctor González Fernández

Ana Bertrand Baschwitz

Aída González Díaz

RESUMEN

La contaminación de suelos por metales pesados es un problema medioambiental cada vez más importante debido a la actividad industrial y minera que se ha venido realizando en los últimos años. Para remediar este problema se están buscando técnicas biológicas en las que la fitorremediación se presenta como una alternativa sencilla y viable en la descontaminación de suelos. El objetivo de este trabajo es estudiar mediante cultivo *in vitro* la influencia del pH y del ácido cítrico sobre el crecimiento, acumulación de As y síntesis de compuestos tiólicos en *Eupatorium cannabinum*, que crece de forma natural en terrenos contaminados del Principado de Asturias. Para ello se utilizaron técnicas analíticas como la espectrometría de masas y la cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados indican que *E. cannabinum* tolera la presencia de As en el medio, pero reduce notablemente su crecimiento en longitud y peso. La adición de ácido cítrico disminuyó el crecimiento de la raíz pero aumentó la acumulación de As tanto en hojas como en raíces sobre todo a pH ácidos. Las raíces de *E. cannabinum* acumularon gran cantidad de As y sintetizaron diferentes compuestos tiólicos, principalmente PC₂, desgly-PC₂, PC₃ y PC₄ mientras que el ácido cítrico debido a su acción quelante redujo esta respuesta. La alta acumulación de As en la raíz junto con el hecho de que las plantas no hayan mostrado síntomas de toxicidad aparente, nos hace pensar que podrían ser utilizadas en programas de fitoestabilización en terrenos contaminados con As en un amplio rango de pH. Las fitoquelatinas parecen ser un mecanismo importante para la detoxificación de As aunque no el único.

ABSTRACT

Soil contamination by heavy metals is an important environmental problem due to industrial and mining activity that has been taking place in recent years. To remedy this problem are being sought biological techniques that phytoremediation is presented as a simple and viable alternative for soil decontamination. The objective of this work is to study by cultivation *in vitro* the influence of medium pH and citric acid on growth, accumulation of As and synthesis of thiol compounds in *Eupatorium cannabinum*, which grows naturally in contaminated land of Asturias. For this analytical techniques were used as mass spectrometry and high resolution liquid chromatography. The results indicate that *E. cannabinum* tolerate the presence of As in the medium, but greatly reduces its growth in length and weight. Adding citric acid decreased the root growth but increased the accumulation of As in both leaves and roots especially at acid pH. *E. cannabinum* roots accumulated many As and synthesized different thiol compounds, mainly PC₂, desgly-PC₂, PC₃ and PC₄ while citric acid this response decreased because of its chelating action. As high accumulation in the root along with the fact that the plants have not shown signs of apparent toxicity, makes us think that could be used in phytostabilization programs As contaminated land with a wide range of pH soils. The phytochelatinases seem to be an important detoxification mechanism As but not the only mechanism.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la participación de muchas personas a las que me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

Ante todo a Ana Bertrand y Aída González, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. El optimismo de Ana y su capacidad de transmitir los buenos hábitos de trabajo en el laboratorio, así como la capacidad de gestión y buenos consejos de Aída, me han permitido iniciarme y progresar en el ámbito de la investigación científica, lo que seguro me será útil a lo largo de mi trayectoria profesional.

A Daniel F. Fuego por enseñarme a utilizar el cromatógrafo y guiarme en la interpretación estadística cada vez que lo necesitaba.

A mis compañeros del Máster Alicia, Álvaro, Luz, Miguel, Alberto por hacer las jornadas de trabajo más entretenidas, y especialmente a Alejandro siempre dispuesto a echar una mano aunque estuviese hasta arriba de trabajo.

A Fran, Sara, y resto de becarios y personal del área de Fisiología Vegetal, por ayudarme siempre que lo necesité y conseguir un ambiente de trabajo agradable.

A mi familia y amigos por apoyarme y aguantar mis continuadas ausencias durante todo este tiempo.

ABREVIATURAS

AC: Ácido cítrico

Cys: Cisteína.

CTs: Compuestos tiólicos

DTNB: 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) o reactivo de Ellman

EC-J: clon EC- J de *Eupatorium cannabinum*

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

GSH: Glutation

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

ICP-MS: Espectrómetro de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo

MS: Medio Murashige y Skoog

MTs: Metalotioneínas

NPTs: Compuestos tiólicos no proteicos

n.d.: no detectado

PCs: Fitoquelatinas

PC sintasa: γ -GluCys dipeptidyl transpeptidasa

PF: Peso fresco

PS: Peso seco

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

TFA: Ácido trifluoroacético

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento y objetivos	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Eupatorium cannabinum</i>	3
2.2. Medidas de crecimiento.....	3
2.3. Análisis del contenido en As.....	4
2.4. Análisis de compuestos tiólicos.....	4
2.5. Análisis estadístico.....	5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
3.1 Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>E. cannabinum</i>	6
3.1.1. Medidas de longitud.....	6
3.1.2. Medidas de peso.....	7
3.2. Acumulación de As.....	9
3.3. Compuestos tiólicos.....	11
4. CONCLUSIONES.....	17
5. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos y aguas subterráneas es un problema medioambiental grave, que cada vez es mayor debido a la actividad minera e industrial que se ha venido realizando en los últimos años (McGrath et al., 2001). Además los metales pesados no son biodegradables, si no que tienen una vida media de hasta miles de años por lo que la eliminación completa de éstos es prácticamente imposible.

Las altas concentraciones de metales pesados en el suelo son tóxicas para los seres vivos acumulándose en sus células y a lo largo de la cadena trófica, es lo que se conoce como biomagnificación.

El arsénico es un metaloide que es altamente tóxico para humanos y otros seres vivos provocando efectos graves conocidos desde la antigüedad como la arsenicosis y la carcinogénesis (Francesconi et al., 2002). El As es un producto de desecho en la minería de extracción de metales como el Au, Fe, Hg o Sn y en Asturias, que es una importante región minera, las concentraciones de As en el suelo son elevadas en muchas zonas.

Este metaloide tiene una permanencia de 24.000 años en los suelos y de hasta 99.800.000 años en sedimentos (Mackenzie et al., 1979), por lo que es muy difícil de eliminar. Se presenta en forma oxidada As (V) y reducida As (III) siendo ésta última la más tóxica; es un análogo del fosfato y su toxicidad radica principalmente en su interferencia en el metabolismo del fosfato. Además, debido a esta analogía, es difícil de exportar de las células una vez que es absorbido (Nies, 1999). Por ello se hace necesario el desarrollo de estrategias para eliminar este metaloide y otros metales pesados.

Las técnicas físico-químicas tradicionales para la eliminación de contaminantes del suelo como el lavado o aireación del suelo presentan inconvenientes como el alto coste tanto en mano de obra como en maquinaria ya que las áreas contaminadas suelen ser de gran tamaño. Además estas técnicas también alteran el ecosistema y la actividad biológica de los terrenos a descontaminar.

La fitorremediación, sin embargo, es una alternativa a estas técnicas que destaca porque tiene un coste mucho menor y es respetuoso con el ecosistema, manteniendo la actividad biológica prácticamente inalterada (McGrath et al., 2001). La fitorremediación es el empleo de plantas acumuladoras de metales para eliminar o reducir los contaminantes del suelo y los daños que éstos producen (Salt et al., 1995). Para que la fitorremediación tenga éxito deben darse las siguientes circunstancias:

- La planta debe crecer en presencia de los contaminantes. Para esto la mejor opción es utilizar plantas autóctonas, ya que es la única manera de garantizar que están adaptadas a las condiciones edafo-climáticas de la zona.
- El contaminante debe estar en el suelo, biodisponible para la planta.
- La planta debe acumular una cantidad de metal significativo o en su defecto tener una gran biomasa.
- El crecimiento debe ser relativamente rápido
- La eficacia debe compensar los costes económicos

Dentro de la fitorremediación se engloban distintas estrategias de descontaminación como la fitoextracción y la fitoestabilización. La fitoextracción consiste en la absorción de los contaminantes por la raíz y su transporte a la parte aérea; es la técnica más eficaz pero para ello la planta debe ser hiperacumuladora o

tener una gran biomasa aunque no llegue a niveles de hiperacumulación (McGrath et al., 2001; van der Ent et al., 2013). La fitoestabilización, en la que el contaminante queda atrapado en el sistema radical, tiene como objetivo reducir la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo (Wuana y Okieimen, 2011).

Los mecanismos que utilizan las plantas para tolerar las altas concentraciones de metales pesados son: la unión del metal a la pared celular, la reducción del transporte a través de la membrana celular, la expulsión activa, la compartimentalización y la quelación (Prasad, 1995; Benavides et al., 2005). Uno de estos mecanismos de quelación es la unión de estos metales a ácidos orgánicos; entre ellos, el ácido cítrico, que es un compuesto que está presente de forma natural en las plantas y que puede actuar como agente quelante, secuestrando los metales pesados, y evitando su toxicidad, por lo que puede permitir a la planta acumular más elemento tóxico. Hay trabajos que estudian el efecto de la adición exógena de ácido cítrico y han demostrado que da buenos resultados sin generar los problemas de toxicidad que produce el EDTA que, por otra parte está considerado como el agente quelante más eficaz (Wuana et al., 2010). Además también se ha visto que es más efectivo a pH ácido (Gaber et al., 2011) lo que podría aumentar la acumulación de metal en la planta en condiciones ácidas, condiciones, por otra parte, que son habituales en suelos contaminados por As y otros metales pesados. Otro posible agente quelante que se ha propuesto para As es el ácido húmico que se ha aplicado a aguas subterráneas (Giasuddin et al., 2007).

Otro mecanismo importante de detoxificación en las plantas es la quelación mediante la inducción de péptidos que se unen al metal formando complejos menos tóxicos que los iones libres (Cobett, 2000). Estos péptidos son las fitoquelatinas (PCs). Las PCs están formadas por una o más repeticiones de γ -glutamil-cisteína al que se une la glicina como aminoácido terminal, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n va de 2 a 12 siendo más abundantes las PCs más pequeñas (Cobett y Goldsbrough, 2002). Se sintetizan a partir del glutatión (GSH) por la acción de la enzima PC-sintasa y pueden detectarse en forma intacta, desglicinadas o con una cisteína extra (Zenk, 1996; Cobett, 2000). Este enzima se activa en presencia de metales pesados siendo el Cd uno de los metales que más participan en su activación.

1.1. Planteamiento y objetivos

En trabajos previos en el laboratorio se seleccionaron plantas que crecen de forma natural en zonas contaminadas con metales pesados del Principado de Asturias y que fueron capaces de acumular altas concentraciones de estos metales en sus tejidos. Una de estas plantas es *Eupatorium cannabinum*. Por otra parte, también está descrito en la bibliografía que la absorción de iones por las plantas está muy influenciada por la adición de agentes quelantes y por el pH de los medios de cultivo o de los suelos ya que ejerce una influencia considerable en la disociación y solubilidad de varios componentes.

Con estas premisas, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento de *E. cannabinum*, la acumulación de As y la síntesis de fitoquelatinas. Estos estudios se realizarán mediante cultivo *in vitro* en presencia de As y ácido cítrico con el objeto de optimizar las condiciones de crecimiento y acumulación

de As para, en un futuro, trasladar estos conocimientos a campo para utilizarlos en fitorremediación.

Para desarrollar este objetivo abordamos los siguientes apartados:

1. **Cultivo *in vitro* de *E. cannabinum*.** En este apartado se estudiará la tolerancia a As de esta planta midiendo el crecimiento en longitud del tallo y de la raíz así como el peso fresco y seco de la planta. También se analizará qué efecto tiene el ácido cítrico como agente quelante sobre la acumulación de As en hojas y raíces. Todos estos ensayos se realizarán a diferentes valores de pH del medio de cultivo.
2. **Análisis de compuestos tiólicos.** Este estudio está dirigido a analizar si las fitoquelatinas u otros compuestos tiólicos participan en la acumulación de As por la planta. También estudiaremos el efecto que tiene el ácido cítrico sobre la síntesis de fitoquelatinas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cultivo *in vitro* de *Eupatorium cannabinum*

En este trabajo se utilizaron plantas de *Eupatorium cannabinum* procedentes de un clon EC-J que había sido seleccionado previamente por su acumulación de metales pesados. Estas plantas se cultivaron *in vitro* en condiciones estériles en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) que contiene 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7. Las plantas se dejaron crecer 3 semanas en una cámara a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 h oscuridad.

Al cabo de este período se recogieron las plantas, se lavaron en agua destilada estéril para eliminar los restos de agar, se pesaron, se midió la longitud del tallo y de la raíz, todo ello en condiciones estériles, y se cultivaron en cajas de plástico de 600 ml de capacidad que contenían 10 tapones de celulosa y 80 ml de medio MS líquido diluído a ¼ al que se le añadió 30 g L⁻¹ de sacarosa. Este es el medio que utilizaremos como control. A otro tratamiento se le añadió a ese mismo medio de cultivo 11 mg L⁻¹ de As en forma de arseniato sódico y es el que denominaremos ¼ MS + As. Finalmente también añadimos al medio con arsénico 20 mg L⁻¹ de ácido cítrico y es al que nos referiremos como ¼ MS + As +AC.

En cada uno de estos tratamientos, incluyendo el control, se ensayaron a su vez 5 valores de pH: 3.7; 4.7; 5.7; 6.7 y 7.7; utilizándose 6 plantas por pH y 30 por tratamiento.

Las plantas se mantuvieron durante 21 días en la cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente.

2.2 Medidas de crecimiento

Una vez transcurrido este período, las plantas se sacaron de las cajas, se lavaron con agua corriente y seguidamente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada para eliminar los restos de As. Tras secarlas con papel absorbente, se pesaron, se separó la parte aérea de la raíz y se midió su longitud.

Para obtener el peso seco de las plantas se secaron en estufa a 35 °C durante 48 horas.

Para reducir al mínimo la variabilidad existente entre las plantas, los resultados de crecimiento se expresan según los siguientes índices:

- Índice caulinar: $(\text{Longitud final del tallo} - \text{Longitud inicial del tallo}) / \text{Longitud inicial del tallo}$.
- Índice radical: $(\text{Longitud final de la raíz} - \text{Longitud inicial de la raíz}) / \text{Longitud inicial de la raíz}$.
- Índice peso fresco: $(\text{Peso fresco final} - \text{Peso fresco inicial}) / \text{Peso fresco inicial}$.
- Índice peso seco: $(\text{Peso seco final} - \text{Peso seco inicial}) / \text{Peso seco inicial}$.

Para obtener el peso seco inicial, se secaron aparte 10 plantas crecidas al mismo tiempo y en las mismas condiciones.

2.3 Análisis del contenido en As

Para conocer la cantidad de As acumulado por las plantas se tomaron muestras de hojas y raíces, que una vez lavadas como se ha descrito anteriormente y secas en estufa a 35 °C durante 48 h, se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se cogieron 100 mg del triturado que se digirieron en 3 ml de HNO₃ concentrado altamente purificado; a continuación se introdujeron en un horno microondas durante 6 min a 240 W para licuar la muestra (Montaser, 1998).

Tras dejar enfriar las muestras se realizaron dos diluciones sucesivas con agua desionizada (Mili-Q 185 Plus System, 18 mΩ cm⁻¹ de resistividad), una primera dilución 1:20 y una segunda 1:10 a la que se añadieron 10 µg de Rh Kg⁻¹ en HNO₃ concentrado como estándar interno. Finalmente el contenido en As se analizó mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP- MS) tipo cuadrupolo (HP- 7500cc). En este equipo la muestra pasa mediante nebulización a través del canal central de plasma de Argón, que se encuentra altamente ionizado y a una elevada temperatura, y es de inmediato desolvatada, vaporizada, atomizada y finalmente ionizada. Los iones formados son extraídos del canal central por un cono de extracción y separados en función de su masa/carga llegando a un detector donde generan un pulso eléctrico que se filtra, modula y cuantifica. La determinación se realizó por calibrado con patrones internos.

2.4 Análisis de compuestos tiólicos

Para analizar los compuestos tiólicos las plantas se cultivaron de igual forma que para medir el crecimiento, pero en este caso se ensayaron 3 valores de pH: 3.7; 5.7 y 7.7. Al cabo de 21 días de crecimiento las plantas se lavaron y se secaron con papel de filtro, y a continuación se separaron las hojas y las raíces para triturarlas de forma independiente en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez trituradas, ya pueden almacenarse a -80°C hasta su posterior utilización.

Para la extracción de compuestos tiólicos se siguió el protocolo de Rauser (1991) ligeramente modificado. Todo el proceso se realizó en cámara fría para evitar la desnaturalización de los péptidos de la muestra.

A 500 mg de muestra congelada se le añadieron 5 mg de Polivinil polipirrolidona (PVPP) al 1% y, tras mezclar levemente, se le añadieron 750 μ l de HCl 0.1 N. La mezcla se agitó durante 30 segundos, se introdujo en un baño de ultrasonidos con hielo 5 minutos y se agitó de nuevo otros 30 segundos antes de centrifugarla durante 15 minutos a 4°C.

A continuación se recogió el sobrenadante y se filtró utilizando filtros Millex-HV de 0.45 μ m de diámetro de poro. Finalmente se repartió en alícuotas de 150 μ l y se inyectó en el HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

La muestra debe almacenarse a -20°C hasta su utilización y nunca más de 1 hora ya que se desnaturalizarían los compuestos tiólicos. (Rausser, 1991).

Para el análisis por HPLC se siguió el protocolo de Fernández et al. (2012) utilizando un cromatógrafo Waters 600. Se inyectaron 100 μ l de muestra en un columna Kromasil C18 5 μ m (250x4.6 mm) (Teknokroma) y se eluyó con un solvente A de acetonitrilo:agua 2:98 (v/v) y un solvente B de acetonitrilo:agua 98:2 (v/v). A ambos solventes se les añadió ácido trifluoroacético (TFA) al 0.05%. Las muestras se separaron con un gradiente lineal (0-25% en 25 min y 25-50% en 5 min) de solvente B a un flujo de 1.5 mL min⁻¹ durante 30 minutos. La detección se consiguió con una derivatización postcolumna con el reactivo de Ellman (Ellman, 1959) a un flujo de 0.5 mL min⁻¹ en un loop de reacción (1ml) siguiendo el protocolo de Grill et al. (1988). Se midió la absorbancia del compuesto derivatizado (5-mercapto-2-nitrobenzoato) a 412 nm.

Los patrones utilizados fueron estándares externos de GSH y una mezcla de PCs (PC₂ PC₃ y PC₄) sintetizadas *in vitro* por el profesor Dr. Zenk con el enzima PC sintasa extraída de *Silene vulgaris* (Friederich et al., 1998). Los patrones de GSH (5 nmoles/g) se utilizaron para calcular el contenido en compuestos tiólicos de las muestras (nmoles/g) en función del área de integración del cromatograma.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el software SigmaPlot 12. El estudio del efecto del pH, del arsénico (11 mg L⁻¹) y del ácido cítrico (20 mg L⁻¹) sobre el crecimiento de las plantas es la media \pm error estándar de 6 plantas por tratamiento. Los datos de acumulación de As son la media \pm error estándar de 3 medidas por muestra (cada muestra se compone de 6 plantas) y los análisis de compuestos tiólicos por HPLC son la media \pm error estándar de 2 muestras de 6 plantas cada una. En todos los casos se realizaron 2 experimentos independientes. Las diferencias entre tratamientos con el mismo pH y las diferencias entre los distintos pH dentro del mismo tratamiento se compararon mediante un test ANOVA complementado con un test de Tukey (P \leq 0.05). En los casos en los que los datos no seguían una distribución normal o no había homocedasticidad se ejecutó un test de Kruskal-Wallis (P \leq 0.05).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto del pH sobre el crecimiento de *E. cannabinum*

3.1.1 Medidas de longitud

Cuando estudiamos el efecto del pH sobre el crecimiento en longitud del tallo de las plantas control (Fig. 1) observamos un crecimiento similar entre los diferentes valores de pH, excepto entre los pH 5.7 donde se aprecia un mayor crecimiento con respecto a pH 7.7.

La adición de As al medio de cultivo redujo entre el 23% y el 36 % la longitud del tallo en la mayoría de valores de pH; excepto a pH 7.7 donde parece que el As no inhibe la longitud del tallo como lo hace a pH más ácido (Fig. 1).

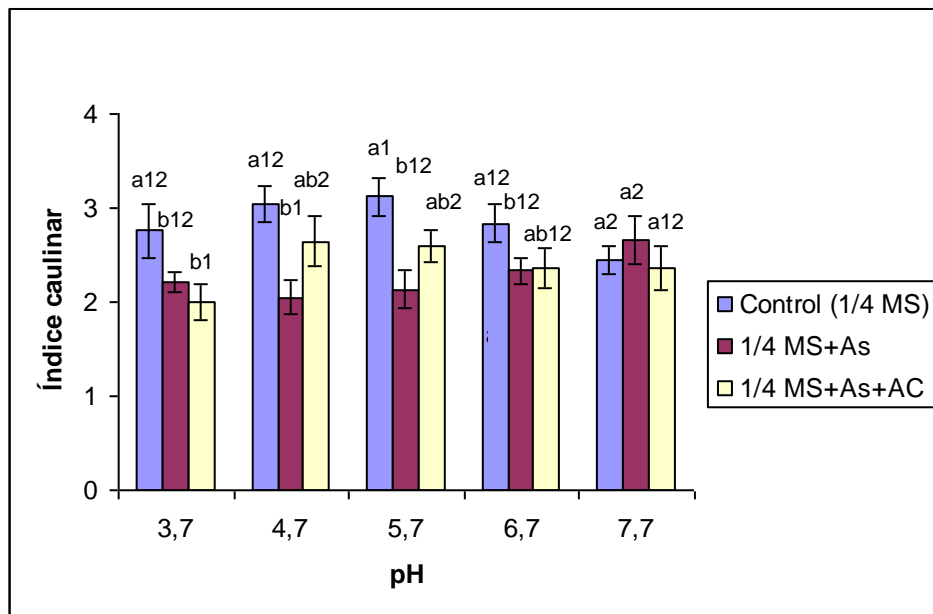


Fig. 1. Incremento en longitud del tallo de *E. cannabinum* cultivado durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

Cuando al medio con As le añadimos ácido cítrico hemos observado una reducción del crecimiento respecto al control, próxima al 25 %, solamente cuando el medio estaba a un pH de 3.7; no detectándose diferencias en los otros valores de pH ensayados (Fig.1). Cuando se compara con el tratamiento de As no se encontraron diferencias en ningún caso. Si observamos el efecto del pH vemos que el menor crecimiento se midió a pH 3.7 (Fig. 1).

Al analizar el crecimiento en longitud de la raíz no se observan diferencias de crecimiento cuando se cultiva en el medio control con diferentes valores de pH. (Fig. 2). Sin embargo, si se observa una gran inhibición cuando se añade As al medio, siendo bastante más acusada que en los tallos, ya que alcanza disminuciones entre

el 84% y el 94%. El cambio de pH no provocó diferencias de crecimiento en la raíz (Fig. 2).

Al añadir ácido cítrico se reduce aún más el crecimiento a pH 5.7 y 7.7 al compararlo con el tratamiento de As mientras que en el resto de valores de pH no hubo diferencias. Si se compara con el control la reducción ronda el 90% (Fig. 2).

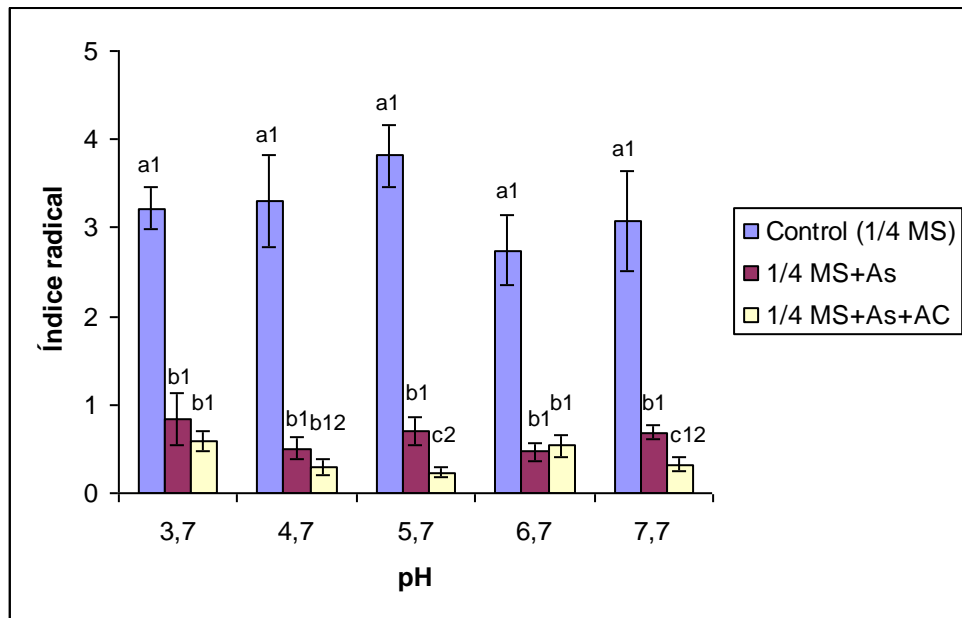


Fig. 2. Incremento en longitud de la raíz de *E. cannabinum* cultivado durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio ¼ MS (control), ¼ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y ¼ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

3.1.2 Medidas de peso

Al cultivar las plantas en el medio control a diferentes valores de pH vemos que a pH 5.7 aumenta el peso fresco de la planta con respecto a valores de pH más ácidos como 3.7 y 4.7. (Fig. 3). Además podemos ver que la adición de As tiene un efecto negativo sobre el peso fresco el cual se redujo alrededor del 80%. Si analizamos el efecto del pH en plantas cultivadas en As detectamos un mayor crecimiento a pH básico (7.7) (Fig. 3).

Cuando se añade As y ácido cítrico conjuntamente al medio de cultivo se reduce el crecimiento en peso fresco tanto si lo comparamos con el control, como si lo comparamos con las plantas que crecieron sólo con As, excepto a pH 3.7 (Fig. 3).

En el peso seco no hubo diferencias de crecimiento en las plantas control entre los diferentes valores de pH, excepto a pH 5.7 donde el crecimiento fue mayor (Fig. 4). La presencia de As en el medio de cultivo redujo el peso seco entre un 44 y un 66%.

La adición de ácido cítrico al medio con As disminuyó el peso seco de las plantas, de manera significativa en todos los valores de pH ensayados (hasta un 80% cuando se compara con el control), y también se redujo cuando se compara con los resultados obtenidos con As (Fig.4).

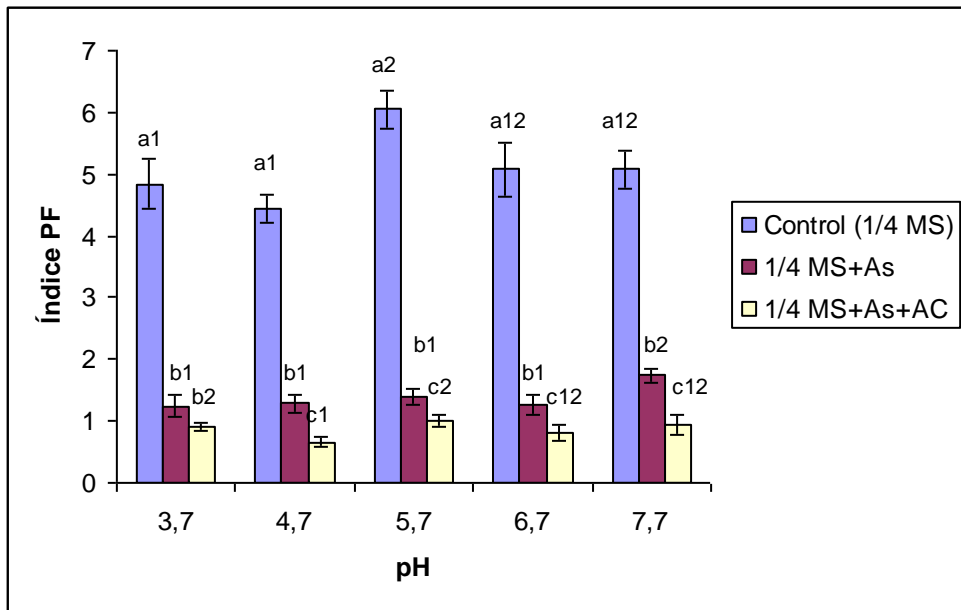


Fig. 3. Índice de peso fresco en plantas de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

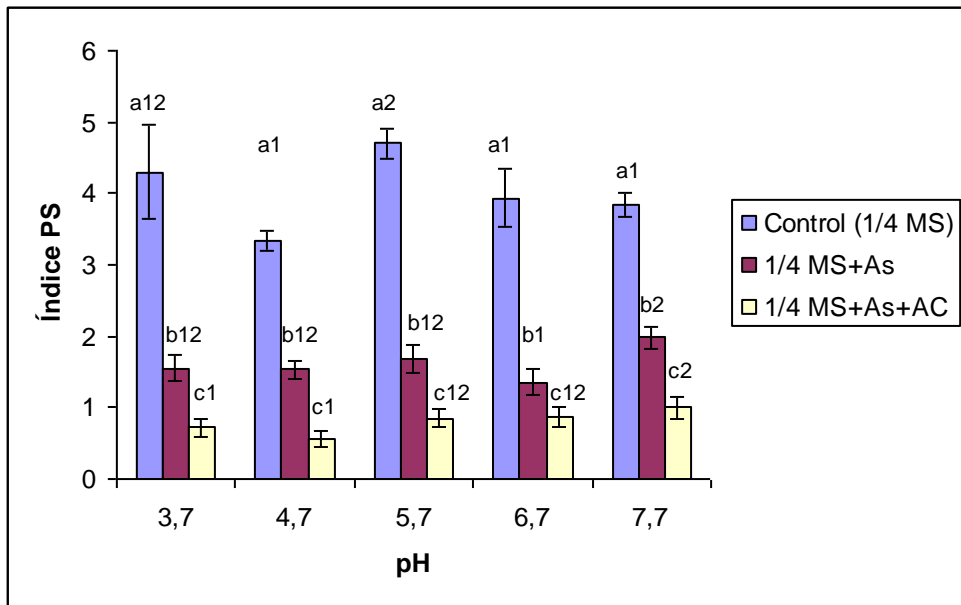


Fig. 4 Índice de peso seco en plantas de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

3.2 Acumulación de As

Cuando analizamos el contenido de As en las hojas observamos una acumulación entre 30 y 45 mg Kg⁻¹ que no se ve muy influenciada por el pH, excepto a pH 4.7 que disminuye (Fig.5).

La adición de ácido cítrico incrementó la acumulación de As y permite a la planta acumular cantidades mayores a valores de pH intermedios, (entre 4.7 y 6.7), mientras que no ejerció efecto a valores de pH extremos (3.7 y 7.7). El pH dónde más As se acumuló en las hojas fue a 6.7 (Fig. 5).

Al analizar la raíz observamos que la cantidad de As acumulada fue notoriamente superior a la acumulada en las hojas y esta acumulación fue mayor a valores de pH básico, acercándose a los 4000 mg Kg⁻¹ a pH 7.7 (Fig. 6). Esta alta acumulación en raíces hace que el factor de traslocación (mg As hoja / mg As raíz) para esta especie sea muy bajo (inferior a 0.03), lo cual nos está indicando que este elemento se transporta muy escasamente desde las raíces a la parte aérea.

La adición de ácido cítrico provoca un aumento en la concentración de As en raíz a pH ácido (3.7 y 4.7) mientras que lo disminuye a pH básico (7.7). En valores de pH intermedios no se detectan diferencias entre los 2 tratamientos (Fig.6).

Hay que destacar que *E. cannabinum* no mostró síntomas de toxicidad aparente (marchitez, necrosis, malformación en hojas) con esta acumulación de As.

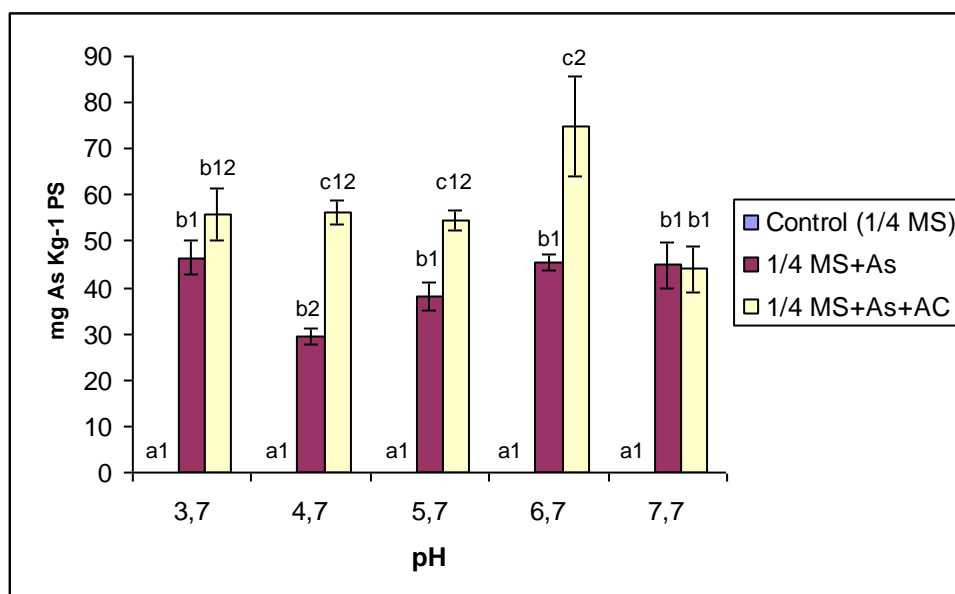


Fig. 5. Acumulación de As (mg Kg⁻¹ PS) en hojas de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio ¼ MS (control), ¼ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y ¼ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

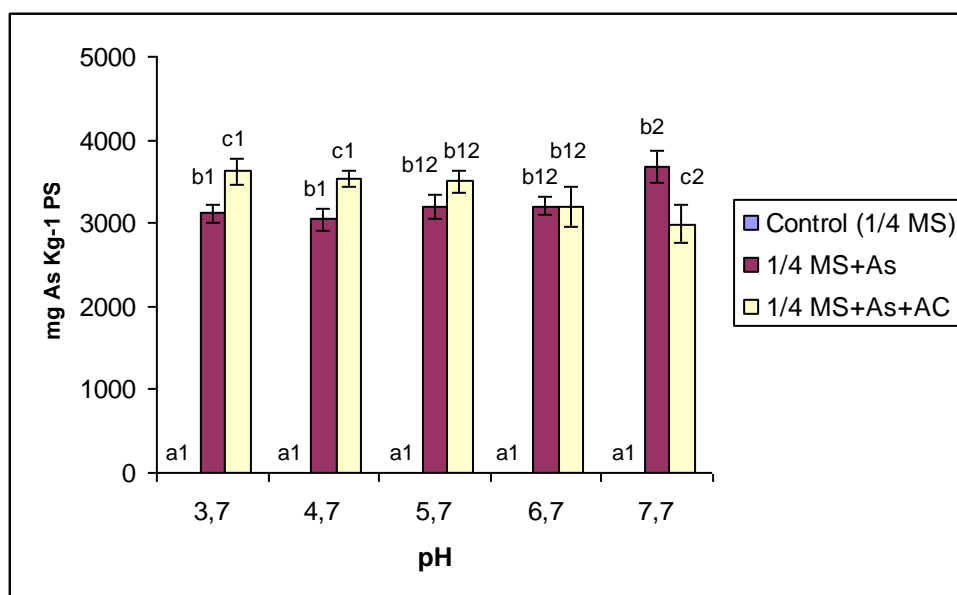


Fig. 6. Acumulación de As (mg Kg^{-1} PS) en raíces de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L^{-1} ($\frac{1}{4}$ MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L^{-1} + 20 mg L^{-1} de AC ($\frac{1}{4}$ MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

Los niveles de toxicidad del As en establecidos por White y Brown (2010) para plantas oscilan entre $1 - 20 \text{ mg Kg}^{-1}$ considerándose niveles tóxicos aquellos en los que la planta no supera el 10% de crecimiento (Kabata-Pendias, 2010). En nuestro caso los niveles acumulados por *E. cannabinum* superan claramente el nivel de toxicidad en todos los casos ensayados.

Para que una planta sea considerada hiperacumuladora de As debe acumular al menos $1000 \text{ mg de As Kg}^{-1}$ de peso seco en la parte aérea, o sino la cantidad acumulada debe ser al menos un orden de magnitud superior a la concentración medida en un suelo contaminado (Van der Ent et al., 2013).

En nuestro caso la mayor acumulación la hemos detectado en la raíz que es el primer órgano en contacto con el metal donde supera ampliamente los 1000 mg Kg^{-1} de peso seco, sin embargo en la parte aérea la acumulación no supera los 100 mg Kg^{-1} , por lo que *E. cannabinum* no puede ser considerada hiperacumuladora, sin embargo, puede utilizarse como planta fitoestabilizadora ya que acumula altas cantidades de As en raíz. Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios de Perez-Sirvent et al. (2012) quien estudió la bioacumulación de As en *Dittrichia viscosa*, y observó que la mayor acumulación se localizaba en raíz.

Que la acumulación de As en la raíz sea mucho mayor podría estar relacionado con mecanismos que impidan una mayor toxicidad en la parte aérea, la cual presenta una mayor sensibilidad que las raíces (Van der Ent et al., 2013). Estos mecanismos tienen que ver con el proceso de absorción en el que parecen estar implicados los transportadores de fosfato a través de los cuales entraría el arseniato que es rápidamente reducido a As (III) el cual se acumularía en las vacuolas y quedaría retenido en las raíces por lo que este sería el paso limitante para que el As no alcanzase la parte aérea en plantas no hiperacumuladoras (Zhang et al., 2009).

Las altas concentraciones de As acumulado en la raíces podrían justificar que la raíz haya tenido una reducción de crecimiento mayor que el tallo, ya que las cantidades medidas superan incluso los valores de hiperacumulación.

La mayor acumulación de As observada a pH 7.7 en raíces podría deberse a una mayor disponibilidad del elemento en el medio de cultivo, ya que en el caso de As las formas más móviles se encuentran a pH entre 7 y 9.5 (Kabata-Pendias, 2010); sin embargo, la mayoría de los suelos contaminados tienen un pH ácido por lo que interesaría que la planta acumulese en esas condiciones. Para ello recurrimos al ácido cítrico que actúa como agente quelante uniéndose al metaloide, permitiendo una mayor absorción y acumulación de As por la planta. En la bibliografía está descrito (Gaber et al., 2011) que el ácido cítrico es efectivo a pH ácido para extraer metales pesados de lodos y alcanza porcentajes de extracción cercanos o iguales al 100% en algunos metales como Cr o Zn (Del Mundo Dacera y Babel 2006). En hojas de *E.cannabinum* el efecto del ácido cítrico también es más efectivo a pH ácido (4.7, 5.7 y 6.7) mientras que en raíces se redujo esta efectividad únicamente a los pH más ácidos de 3.7 y 4.7 (Fig. 5 y 6). Por otra parte también se observó una cierta toxicidad en la planta al añadir ácido cítrico ya que se redujo mucho la longitud de la raíz lo cual se refleja en una disminución del peso seco de la planta (Fig.2 y 4). A pesar de esta reducción del peso, el incremento de acumulación de As hace rentable la utilización de este compuesto ya que en algunos casos (pH 6.7), triplica la acumulación en hojas cuando se compara con el tratamiento al que solo se añade As. Esta reducción de peso seco provocado por el ácido cítrico ha sido también descrita en juncos por Najeeb et al. (2011), pero fue ampliamente compensada por una acumulación mayor de Cd tanto en raíz como en hojas. En *Halimione portulacoides* concentraciones más bajas de ácido cítrico aumentaban la acumulación de Cd en raíz, mientras que impedía la acumulación de Ni. (Duarte et al., 2007). Por tanto cada especie y cada metal tienen una respuesta diferente a la adición de diferentes concentraciones de ácido cítrico, por lo que en nuestro caso sería necesario ensayar nuevas concentraciones.

3.3 Compuestos tiólicos

El análisis de compuestos tiólicos mostró diferencias tanto en hojas como en raíces. Al comparar los cromatogramas observamos una respuesta al As mucho más clara en raíz, tanto en el tratamiento con As como en As+AC. Mientras que en hojas los cambios que veíamos eran cuantitativos en raíces se observan nuevos compuestos además de un aumento de los preexistentes (Tablas 1 y 2 y Fig. 7 y 8).

Al estudiar las hojas pudimos identificar glutation (GSH), PC₂, PC₃ y PC₄, y también se observaron otros compuestos tiólicos que no hemos podido identificar (Tabla 1, Fig. 7). En hojas, todos los compuestos citados se encontraron en todos los tratamientos, existiendo solamente cambios cuantitativos.

Si nos fijamos en la Tabla 1, vemos que al aumentar el pH del medio se estimula la síntesis de compuestos tiólicos en hojas lo cual está de acuerdo con los estudios de Chen et al. (1997) en los que se observó que la PC sintasa (enzima implicado en la síntesis de fitoquelatinas) es más efectiva a pH básico, lo cual explicaría por qué la síntesis de compuestos tiólicos es mayor a pH 7.7.

Tabla 1. Compuestos tióicos (nmol/g) en hojas de *E.cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio ¼ MS (control), ¼ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y ¼ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

Compuestos tióicos parte aérea									
pH	3,7			5,7			7,7		
	Control	As	As+AC	Control	As	As+AC	Control	As	As+AC
GSH	4,64±0,93a1	5,60±0,01a1	5,85±0,35a1	6,17±0,27a2	6,07±0,28a12	5,10±0,07a1	3,92±0,26a1	6,23±0,17b2	10,30±1,67c2
CT1	0,79±0,01a1	0,686±0,03a1	0,78±0,05a1	0,67±0,05a1	1,27±0,21b2	0,73±0,02a1	1,32±0,04a2	1,19±0,08ab2	1,11±0,02b2
PC2	0,27±0,03a1	0,24±0,04a1	0,46±0,02b1	2,42±0,04a2	1,29±0,04b2	0,54±0,11c12	0,39±0,01a1	0,98±0,05b3	1,51±0,30c2
CT2	0,51±0,03a1	0,81±0,03b1	0,74±0,07ab1	0,35±0,04a1	1,23±0,16b2	0,87±0,02c12	0,70±0,10a2	1,00±0,11b12	1,07±0,04b2
PC3	2,07±0,05a1	1,88±0,13a1	2,31±0,44a1	1,93±0,05a1	4,01±0,36b2	2,21±0,13a1	3,828±0,17ab2	3,30±0,09a2	4,18±0,17b2
PC4	3,64±0,16a1	4,27±0,26a1	4,34±0,57a1	4,28±0,09a1	15,25±1,35b2	7,09±0,26c2	8,24±0,81a2	10,52±0,30b3	9,96±0,45ab3
ΣNPTs	7,28±0,42a1	7,88±0,59a1	8,63±0,5a1	9,65±0,52a1	23,05±1,82b2	11,44±0,83c2	14,48±0,18a2	16,99±1,22b3	17,83±1,14b3

Tabla 2. Compuestos tióicos (nmol/g) en raíces de *E.cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio ¼ MS (control), ¼ MS + 11mg As L⁻¹ (1/4 MS + As) y ¼ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC (1/4MS + As + AC). Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos de un mismo pH. Diferentes números indican diferencias significativas (p<0.05) entre los diferentes valores de pH dentro de un mismo tratamiento.

Compuestos tióicos raíz									
pH	3,7			5,7			7,7		
	Control	As	As+AC	Control	As	As+AC	Control	As	As+AC
Cys		1,10±0,35a1	1,00±0,36a1		1,60±0,47a1	1,10±0,12a1		0,64±0,19a1	0,90±0,08a1
GSH	0,77±0,10a1	1,45±0,34b12	1,27±0,36ab1	0,56±0,08a1	1,77±0,40b1	1,75±0,18b1	0,67±0,10a1	0,92±0,18b2	2,01±0,52c1
PC2		1,00±0,23a12	1,05±0,36a1		1,72±0,49a1	1,66±0,35a1		0,45±0,10a2	1,25±0,19b1
Desgly-PC2		0,42±0,07a1	0,27±0,02b1		0,83±0,35a1	0,63±0,13a2		0,25±0,09a2	0,38±0,11a1
PC3		23,4±2,4a1	18,4±2,1b1		24,4±1,7a1	17,3±1,7b1		17,2±1,4a2	15,8±2,6a1
CysPC3	0,40±0,09 1			0,45±0,05 1			0,35±0,06 1		
Mezcla CTs		170,1±10,5a1	121,9±10,0b1		176,0±7,8a1	113,1±5,3b1		120,4±5,0b2	110,6±8,0a1
PC4	8,5±0,6a1	63,7±2,2b1	59,27±12,9b1	7,7±1,2a1	88,7±9,6b2	56,3±11,1c1	8,7±0,5a1	54,9±7,4b1	57,2±1,3c1
Σ NPTs	8,9±1,6a1	259,8±13,0b1	201,0±9,6c1	8,1±1,5a1	293,3±15,0b1	190,1±9,8c1	9,0±1,6a1	193,9±9,2b2	186,1±7,5b1

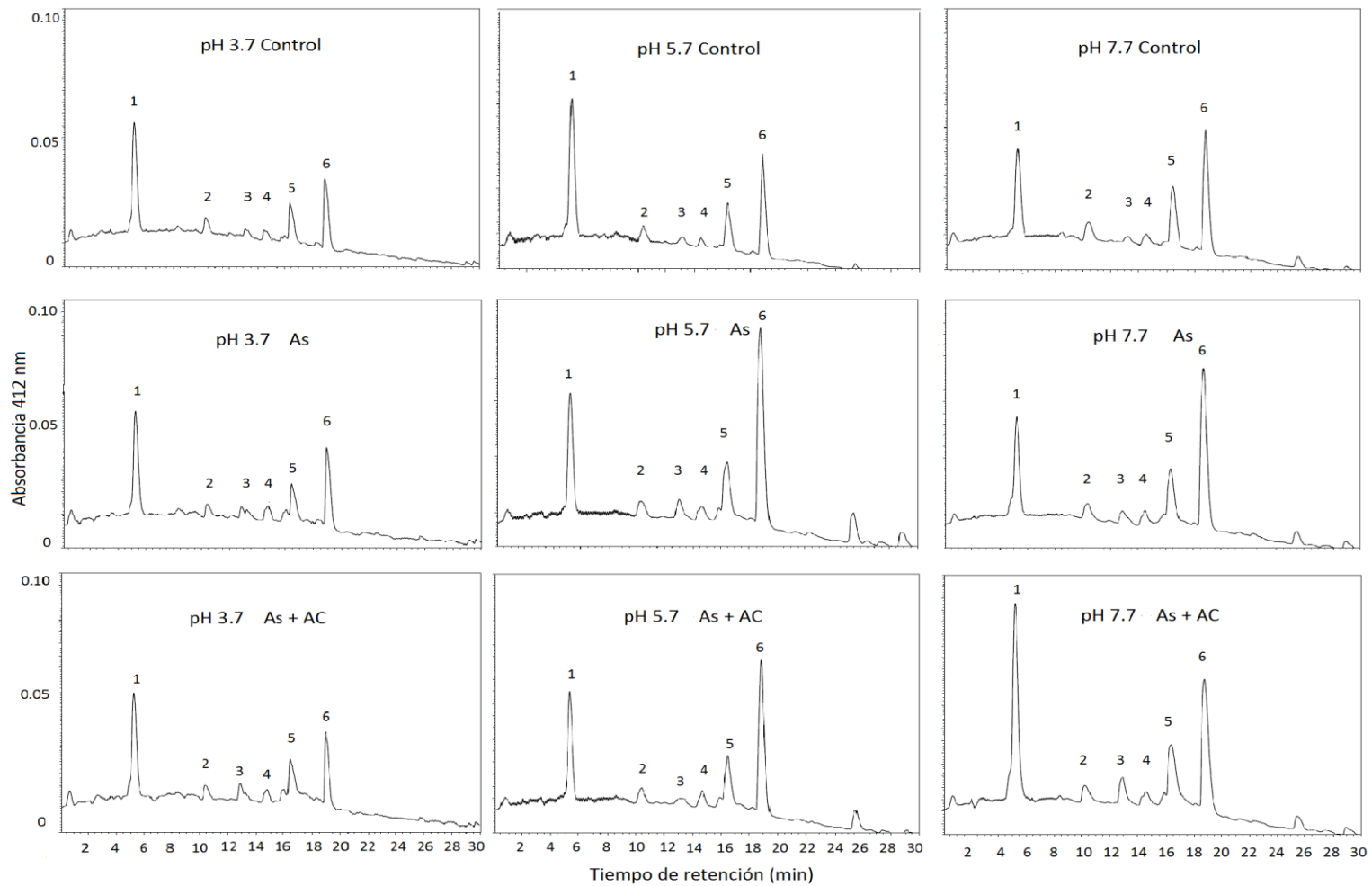


Fig. 7. Cromatogramas de extractos de hojas de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11mg As L⁻¹ ($\frac{1}{4}$ MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC ($\frac{1}{4}$ MS + As + AC). Los números indican los siguientes compuestos: 1: GSH; 2: CT1; 3: PC2; 4: CT2; 5: PC3; 6: PC4.

A pH 3.7 no hay diferencias en el contenido en GSH ni en el contenido total de compuestos tiólicos (NPTs) entre los 3 tratamientos; parece que la presencia de As o de As y ácido cítrico en el medio no induce la síntesis de más compuestos tiólicos. Sin embargo a pH 5.7 el As sí estimula la síntesis de tioles preexistentes sobre todo de la PC₃ y la PC₄ (Tabla 1, Fig. 7).

El ácido cítrico a pH 5.7 redujo la síntesis de compuestos tiólicos cuando se compara con As lo cual nos llama la atención porque la acumulación de este elemento era mayor en las hojas. Hay que destacar que este aumento de tioles se debe principalmente a un aumento de la PC₄ (Tabla 1), la cual se sintetiza a partir de fitoquelatinas más pequeñas como la PC₂ (Cobbet, 2000), lo que justificaría la disminución de ésta, tanto en el tratamiento con As como con As+AC.

A pH 7.7 llama la atención el aumento total de tioles en las hojas de las plantas control respecto a los pH 3.7 y 5.7 (Tabla 1). La adición de As y de As+AC también estimula la síntesis de compuestos tiólicos como la PC₄. Hay que resaltar también un importante aumento del glutation, que podría estar relacionado con otras funciones como la antioxidante (Maldonado, 2008).

La presencia de PCs en hojas de plantas control podría deberse a mecanismos de homeostasis frente a iones metálicos como el Zn o el Fe, ambos micronutrientes presentes en el medio de cultivo (Grill et al., 1988). Con As se estimularía la síntesis de PCs sobre todo PC₃ y PC₄.

Al analizar los compuestos tiólicos en raíces observamos que el contenido total es mayor que en las hojas (Tabla 2, Fig. 8). En plantas control, detectamos la presencia de GSH, Cys-PC₃ y PC₄ siendo esta última la más abundante. El pH no tuvo influencia en estas plantas control (Tabla 2). Sin embargo, el As del medio de cultivo, independientemente del pH, estimuló tanto la síntesis de los compuestos tiólicos preexistentes en las plantas control como la de nuevos tioles como Cys, PC₂, desgly-PC₂ y PC₃. Los pH ácidos (3.7 y 5.7) indujeron mayor síntesis de tioles en presencia de As que el pH 7.7 (al contrario de lo que ocurría en hojas) aunque es en este pH donde se alcanzó la mayor acumulación del elemento (Fig. 6). Hay que resaltar que en estos cromatogramas siempre encontramos una mezcla de compuestos tiólicos que no hemos podido separar correctamente. Sabemos que en esta mezcla está incluida la Cys-PC₃ y la desgly-PC₃ y otros compuestos que no han podido ser identificados (Tabla 2, Fig. 8). La presencia de los tioles sintetizados *de novo*, así como el aumento de los preexistentes (Cys-PC₃ y PC₄), hacen que el contenido total de compuestos tiólicos sea mucho mayor que en las plantas control. Las fitoquelatinas de cadena larga fueron las que experimentaron el mayor aumento al igual que ocurrió en hojas.

En raíces de plantas cultivadas con As+AC a diferentes pH se sintetizaron los mismos compuestos que en el tratamiento con As pero en cantidades significativamente inferiores excepto a pH 7.7 (Tabla 2, Fig. 8). Esta disminución se puede explicar por el efecto del ácido cítrico como agente quelante, por lo que la planta no necesitaría sintetizar tantas PCs para tolerar el As. También se observó un aumento notable de GSH a pH 7.7, que la planta podría utilizar para la síntesis de tioles de mayor tamaño como la PC₂, PC₃ y PC₄ (Cobbet, 2000).

La presencia de nuevos compuestos en raíz nos da idea de que la ruta de síntesis de azufre está activa (Harada et al., 2002). Además compuestos como la cisteína también podrían formar complejos con iones metálicos como sugiere Oven et

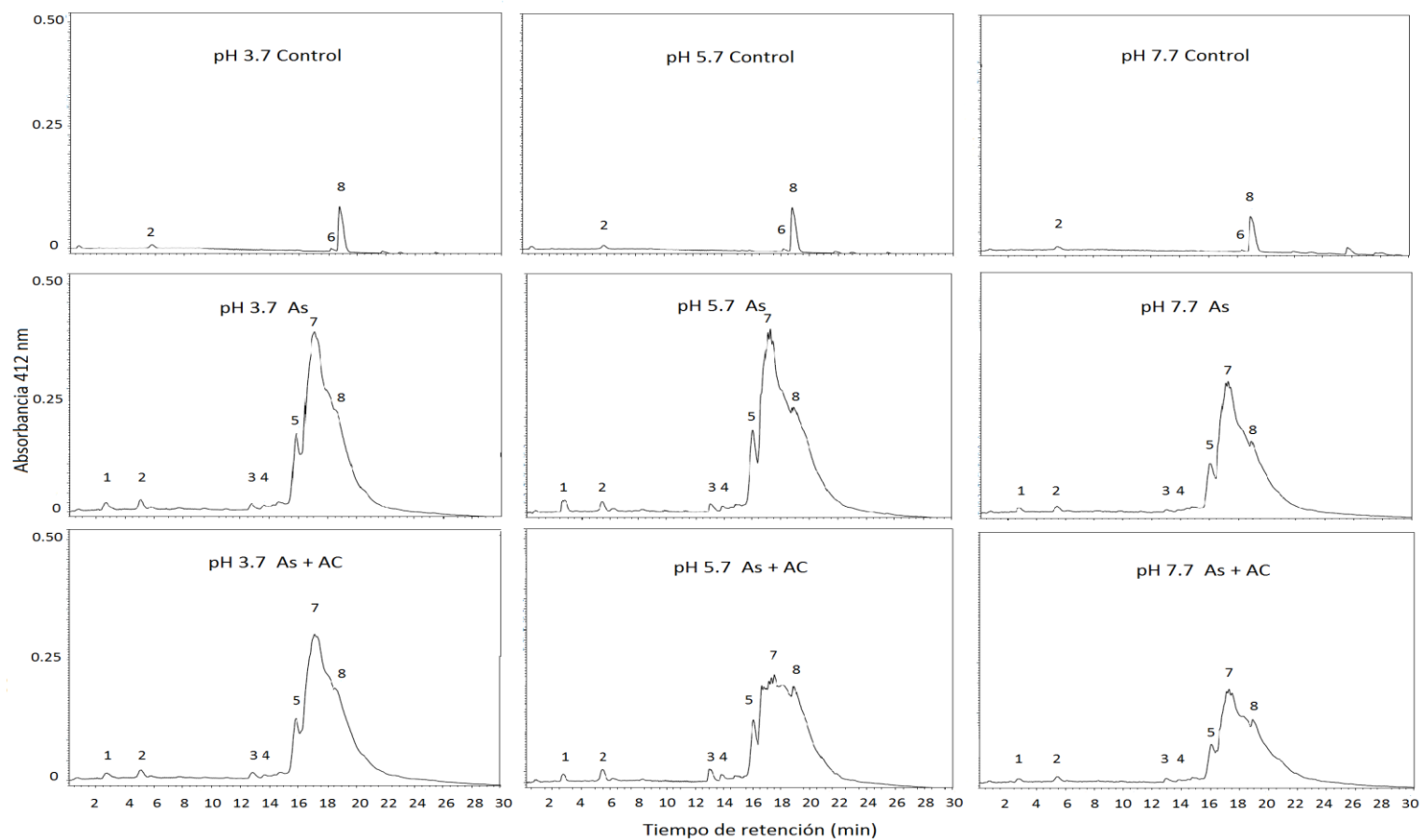


Fig. 8. Cromatogramas de extractos de raíces de *E. cannabinum* cultivadas durante 21 días en diferentes valores de pH y en medio $\frac{1}{4}$ MS (control), $\frac{1}{4}$ MS + 11mg As L⁻¹ ($\frac{1}{4}$ MS + As) y $\frac{1}{4}$ MS + 11 mg As L⁻¹ + 20 mg L⁻¹ de AC ($\frac{1}{4}$ MS + As + AC). Los números indican los siguientes compuestos: 1: Cys; 2: GSH; 3: PC₂; 4: desgly-PC₂; 5: PC₃; 6: Cys-PC₃; 7: Mezcla CTs; 8: PC₄.

al. (2002), quien observa además un mayor contenido de ácido cítrico endógeno cuando plantas de *Crotalaria cobalticola* se exponen a Co, lo que lo ratifica como agente quelante de metales en situaciones de estrés.

Que la respuesta de compuestos tiólicos al As sea mayor en raíz puede ser debido a que hay una mayor acumulación que en la parte aérea, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que la raíz es el órgano que está en contacto con el medio de cultivo y las fitoquelatinas, sintetizadas en las hojas, se transportarían hasta la raíz como se observó en *Arabidopsis* (Chen et al., 2006) y como ocurre con el glutathione (Maldonado, 2008).

Las fitoquelatinas que más responden al As son la PC₃ y la PC₄. Actualmente se sabe que las fitoquelatinas más grandes forman complejos más estables con los metales pesados por lo que son más efectivas secuestrando el As, haciendo a la planta más tolerante y permitiéndole acumular cantidades mayores (Gusmão et al., 2010).

Por otra parte, nuestros resultados fueron distintos a los obtenidos por Fernández et al. (2008) en *Dittrichia viscosa* cultivada con Cd en los que la cantidad de PCs fue mayor en parte aérea a pesar de acumular más Cd en raíz. En *E. cannabinum* la acumulación de As y la síntesis de compuestos tiólicos siempre fue mayor en raíz aunque las concentraciones de tioles variaron con el pH y no siempre se pudo relacionar con la acumulación As. Esto nos lleva a pensar que aunque las PCs parece que tienen un papel importante en la tolerancia a As, en algunas circunstancias la planta da prioridad a otros mecanismos de detoxificación como la unión a compuestos de la pared celular o la quelación a ácidos orgánicos (Fernández et al., 2014). Por este motivo sería interesante estudiar estos mecanismos de detoxificación que aún son desconocidos en *E. cannabinum*.

4. CONCLUSIONES

1. Las variaciones de pH en el medio de cultivo no afectan ni a la longitud ni al peso fresco y seco de *E. cannabinum*

2. El tratamiento con As redujo el crecimiento en longitud y peso siendo más acusado en raíz que en parte aérea. El ácido cítrico en combinación con el As inhibió aún más el crecimiento de la raíz lo cual se refleja en una disminución del peso seco de la planta.

3. *E. cannabinum* fue capaz de acumular altas concentraciones de As en raíz sin mostrar síntomas de toxicidad lo que la hace una buena candidata para ser utilizada en programas de fitoestabilización. En hojas, la concentración de As fue mucho más baja aunque superó ampliamente los valores de toxicidad establecidos en planta.

4. La presencia de ácido cítrico mejora la acumulación de As a pH ácido. Este incremento en la acumulación, tanto en hojas como en raíces, hace rentable la utilización de este compuesto para obtener un mayor rendimiento en fitoextracción aunque se observe una reducción del peso seco de la planta.

5. La raíz de *E. cannabinum* responde a la acumulación de As sintetizando *de novo* compuestos tiólicos como Cys, PC₂, desgly-PC₂ y PC₃ y aumentando la síntesis de las preexistentes como la Cys-PC₃ o PC₄. En hojas, también aumenta la síntesis de los compuestos preexistentes, principalmente PC₄. Al añadir ácido cítrico se redujo la síntesis de tioles probablemente debido a la acción quelante de éste. Así pues parece que estos compuestos tienen un papel importante en la tolerancia de la planta a As aunque no descartamos la existencia de otros mecanismos como podrían ser la unión a diferentes compuestos de la pared celular o la quelación por ácidos orgánicos endógenos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 21-34.
- Chen, J., Zhou, J., Goldsbrough, P. B. (1997). Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiologia Plantarum*, 101(1), 165-172.
- Chen, A., Komives, E. A., Schroeder, J. I. (2006). An improved grafting technique for mature Arabidopsis plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(1), 108-120.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 211-216.
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159-182.
- Del Mundo Dacera, D., Babel, S. (2006). Use of citric acid for heavy metals extraction from contaminated sewage sludge for land application. *Water Science & Technology*, 54(9), 129-135.
- Duarte, B., Delgado, M., Caçador, I., (2007). The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*. *Chemosphere*, 2007, 69(5), 836-840.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, R. S. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution*, 152(3), 522-529.
- Fernández, R., Bertrand, A., García, J. I., Tamés, R. S., González, A. (2012). Lead accumulation and synthesis of non-protein thiolic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 18-24.
- Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., González, A. (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 63-70.
- Francesconi, K., Visoottiviseth, P., Sridokchan, W., Goessler, W. (2002). Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 284(1), 27-35.

- Friederich, M., Kneer, R., Zenk, M. H. (1998). Enzymic synthesis of phytochelatins in gram quantities. *Phytochemistry*, 49(8), 2323-2329.
- Gaber, S. E., Rizk, M. S., Yehia, M. M. (2011). Extraction of certain heavy metals from sewage sludge using different types of acids. *Biokemistri*, 23(1) 41-48.
- Giasuddin, A. B., Kanel, S. R., Choi, H. (2007). Adsorption of humic acid onto nanoscale zerovalent iron and its effect on arsenic removal. *Environmental Science & Technology*, 41(6), 2022-2027.
- Grill, E., Thumann, J., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1988). Induction of heavy-metal binding phytochelatins by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Reports*, 7(6), 375-378.
- Gusmão, R., Ariño, C., Díaz-Cruz, J. M., Esteban, M. (2010). Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium. *Analytical Biochemistry*, 406(1), 61-69.
- Harada, E., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Hiroshi, S. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*, 159(4), 445-448.
- Kabata, A., Pendias, H. (2010). *Trace elements in soils and plants*. 4^a ed. CRC, Washington, DC U.S.A.
- Mackenzie, F. T., Lantzy, R. J., Paterson, V. (1979). Global trace metal cycles and predictions. *Journal of the International Association for Mathematical Geology*, 11(2), 99-142.
- Maldonado, J. M. (2008). Asimilación del nitrógeno y del azufre. *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal Azcon –Bieto J. y Talon.(eds.) 2^a ed. McGraw-Hill, Madrid*, pp 287-303.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J., Lombi, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232(1-2), 207-214.
- Montaser, A. (1998). *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. John Wiley & Sons.
- Murashige T., Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Najeeb, U., Jilani, G., Ali, S., Sarwar, M., Xu, L., Zhou, W. (2011). Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and

its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 565-574.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730-750.

Oven, M., Grill, E., Golan-Goldhirsh, A., Kutchan, T. M., Zenk, M. H. (2002). Increase of free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry*, 60(5), 467-474.

Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M. J., Martínez-López, S., Bech, J., Bolan, N. (2012). Distribution and bioaccumulation of arsenic and antimony in *Dittrichia viscosa* growing in mining-affected semiarid soils in southeast Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 128-135.

Prasad, M. N. V. (1995). Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, 35(4), 525-545.

Rausser, W. E. (1991). [38] Cadmium-binding peptides from plants. *Methods in Enzymology*, 205, 319-333.

Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, 13(5), 468-474.

Van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Pollard, A. J., Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and Soil*, 362(1-2), 319-334.

White, P. J., Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073-1080.

Wuana, R. A., Okieimen, F. E., Imborvungu, J. A. (2010). Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(3), 485-496.

Wuana, R. A., Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 2011.

Zenk, M. H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene*, 179(1), 21-30.

Zhang, X., Zhao, F. J., Huang, Q., Williams, P. N., Sun, G. X., Zhu, Y. G. (2009). Arsenic uptake and speciation in the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *New Phytologist*, 182(2), 421-428.