



Universidad Nacional de la
Patagonia San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales y
Ciencias de la Salud
Departamento de Biología y Ambiente

Pb

Tesis doctoral

“ Bio-marcadores de contaminación en dos
plantas de marismas (*Limonium brasiliense* y
Atriplex vulgatissima):
una perspectiva multidisciplinaria ”

Doctorando: Lic. María de la Paz Pollicelli
Directora: Dra. Yanina Lorena Idaszkin
Director: Dr. Federico Márquez

2024

Zn



Prefacio

La presente tesis fue realizada en el marco de una beca interna de CONICET dirigida por la Dra. Yanina Lorena Idaszkin y el Dr. Federico Márquez.

Esta tesis constituye uno de los requisitos para obtener el grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.



Índice I

Agradecimientos.....	20
Abreviaturas	22
Guía de lectura y organización de la tesis	23
Resumen.....	24
Abstract	27
CAPITULO I: Introducción general	30
1.1. Marismas.....	31
1.1.1. Contaminación de marismas: los metales como un caso particular	34
1.2. Tolerancia de especies halófitas a la presencia de metales	35
1.3. Los metales y las plantas	37
1.3.1. Particularidades del Pb	37
1.3.2. Particularidades del Zn	39
1.4. Biorremediación y fitorremediación	41
1.5. Biomarcadores.....	44
1.6. Índice de Respuesta Integrada	49
1.7. Importancia de esta tesis en el marco teórico establecido	50
1.8. Objetivo general	50
1.8.1. Objetivos específicos, hipótesis y predicciones	51
CAPITULO II: Metodología general	53
2.1. Recolección de semillas y germinación	54
2.2. Experimentos de estrés en cámara de cultivo	55
2.2.1. Experimentos de estrés por incremento individual de Pb o Zn.....	56
2.2.2. Experimentos de estrés por efecto combinado de Pb y Zn	57
2.3. Determinaciones de variables respuesta al finalizar cada experimento	60
2.3.1. Determinación de la concentración de metales Zn y Pb	60
2.3.1.1. Factor de Bioconcentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación	61
2.3.2. Variables de Crecimiento.....	61

2.3.3.	Variables Fisiológicas	62
2.3.4.	Variables Bioquímicas	63
2.3.5.	Variables Morfométricas	66
2.4.	Índice biológico de respuesta integrada (IBRv2)	68
2.5.	Análisis estadísticos	68
2.5.1.	Análisis estadísticos para variables de crecimiento, fisiológicas y bioquímicas	68
2.5.2.	Análisis morfogeométricos de las hojas	69
CAPITULO III: Evaluación del estrés por incremento individual de Pb y Zn en <i>Atriplex</i>		
<i>vulgatissima</i> y <i>Limonium brasiliense</i>.		71
Introducción		72
Subcapítulo I: <i>Atriplex vulgatissima</i>		73
3.1.	Resultados	73
3.1.1.	Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación	73
3.1.2.	Parámetros de crecimiento	73
3.1.3.	Parámetros fisiológicos	75
3.1.4.	Parámetros bioquímicos	76
3.1.5.	Parámetros morfométricos	80
3.1.6.	Índice Biológico de Respuesta Integrada IBRv2	85
3.1.7.	Discusión	86
Subcapítulo II: <i>Limonium brasiliense</i>		94
3.2.	Resultados	94
3.2.1.	Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación	94
3.2.2.	Parámetros de crecimiento	94
3.2.3.	Parámetros fisiológicos	96
3.2.4.	Parámetros bioquímicos	97
3.2.5.	Parámetros morfométricos	101
3.2.6.	Índice Biológico de Respuesta Integrada IBRv2	106

3.2.7. Discusión	107
CAPITULO IV: Evaluación del estrés por incremento combinado de Pb y Zn en <i>Limonium brasiliense</i> y <i>Atriplex vulgatissi</i>	114
Introducción	115
Subcapítulo I: <i>Atriplex vulgatissima</i>	117
3.1. Resultados.....	117
3.1.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación	117
3.1.2. Parámetros de crecimiento	118
3.1.3. Parámetros fisiológicos.....	120
3.1.4. Parámetros bioquímicos.....	122
3.1.5. Parámetros morfométricos	125
3.1.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada: IBRV2	129
3.1.7. Discusión	132
Subcapítulo II: <i>Limonium brasiliense</i>	137
3.2. Resultados.....	137
4.2.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación	137
4.2.2. Parámetros de crecimiento	138
4.2.3. Parámetros fisiológicos.....	140
4.2.4. Parámetros bioquímicos.....	142
4.2.5. Parámetros morfométricos	146
4.2.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada: IBRV2	150
4.2.7. Discusión	153
CAPITULO V: Conclusiones generales y consideraciones finales	158
Glosario.....	161
Anexo.....	164
Bibliografía.....	171

Índice de Tablas

Tabla 2.3.5.1: Número de hojas final incluidas en los análisis morfométricos para cada tratamiento y especie: <i>A. vulgatissima</i> y <i>L. brasiliense</i>	67
Tabla 3.1.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo) en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los diferentes tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y el experimento de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn) en <i>A. vulgatissima</i> . Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).	73
Tabla 3.1.2: Media \pm error estándar (n=10) del largo, ancho y <i>centroid size</i> (CS) de hojas de <i>A. vulgatissima</i> para cada tratamiento del experimento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y del experimento de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).	85
Tabla 3.2.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo) en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los diferentes tratamientos de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y Zn (0,100 y 200 μ M Zn) en <i>L. brasiliense</i> . Las letras minúsculas (a, b y c) y mayúsculas (A, B, C) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).	94
Tabla 3.2.2: Media \pm error estándar (n=10) del largo, ancho y <i>centroid size</i> (CS) de hojas de <i>L. brasiliense</i> según tratamiento del experimento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y del experimento de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). ..	106
Tabla 4.1.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo), en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los 9 tratamientos resultantes de la combinación de los factores: Pb (0, 50, 100 μ M Pb) y Zn (0,100 y 200 μ M). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas según el efecto principal Pb o Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).	118

Tabla 4.2.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb y Zn en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los 9 tratamientos resultantes de la combinación de Pb (0, 50, 100 μ M Pb) y Zn (0,100 y 200 μ M). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre niveles de Pb o Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$). 138

Índice de Figuras

Figura 1.1: Imágenes de marismas. (A) Vista aérea de marisma del suroeste de España. Foto tomada por José Antonio Fernández en 2011, (B) Marisma de Norfolk en Inglaterra explotada turísticamente y (C, D) Diferentes sitios de la marisma de Riacho en Península Valdés, Argentina.	31
Figura 1.2: Distribución global de marismas. Imagen tomada de Mcowen <i>et al.</i> 2017..	32
Figura 1.3: (A) <i>Sarcocornia perennis</i> , (B) <i>Spartina alterniflora</i> , (C) <i>Atriplex vulgatissima</i> y (D) <i>Limonium brasiliense</i>	33
Figura 1.5.1: Ruta de detoxificación de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células vegetales. El superóxido (O_2^*) es convertido a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente el H_2O_2 es decompuesto en agua (H_2O) y O_2 por la enzima catalasa (CAT), o reducido a agua por las enzimas peroxidasa: ascorbato peroxidasa (APx) y guaiacol peroxidasa (GPx).	48
Figura 2.2: Semillas y plántulas de (A) <i>A. vulgatissima</i> y (B) <i>L. brasiliense</i> . (C) Trasplante de plántulas a bandejas germinadoras. Plántulas de (D) <i>A. vulgatissima</i> y (E) <i>L. brasiliense</i> en estado avanzado de crecimiento.....	55
Figura 2.3: Representación esquemática del diseño experimental para evaluar el efecto individual del incremento de Pb y Zn en (izquierda) <i>L. brasiliense</i> y (derecha) <i>A. vulgatissima</i>	57
Figura 2.4: Detalle de la bandeja de un tratamiento tipo de cada uno de los experimentos para <i>L. brasiliense</i> (izquierda) y <i>A. vulgatissima</i> (derecha).	57
Figura 2.5: Representación esquemática del diseño experimental para evaluar el efecto del incremento combinado del de Pb y Zn en (izquierda) <i>L. brasiliense</i> y (derecha) <i>A. vulgatissima</i>	58
Figura 2.6: Plantas de <i>A. vulgatissima</i> (A, B) en macetas individuales. (C) Plantas de <i>A. vulgatissima</i> al inicio experimento.	59
Figura 2.7: (A) Trasplante de <i>L. brasiliense</i> a macetas individuales. (B, C) Distribución aleatoria de macetas en bandejas y posterior asignación de los tratamientos. (D) Plantas de <i>L. brasiliense</i> al inicio del experimento.....	60
Figura 2.8: Diferentes etapas en la extracción ácida para la determinación de metales. (A, B) Trituración de la biomasa aérea y radical. (C) Pesaje de biomasa aérea y raíz y colocación en tubos. (D) Homogenización de la muestra vegetal con el ácido. (E) Tubos	

luego de la digestión ácida en horno microondas. (F) Determinación de metales en ICP-OES.	61
Figura 2.9: Momento previo a la medición de la fluorescencia de la clorofila en las plantas de <i>L. brasiliense</i> expuestas 30 min a la luz solar.	62
Figura 2.10: (A) Proceso de extracción y (B) determinación de pigmentos fotosintéticos	63
Figura 2.11: Diferentes etapas del proceso de preparación de los extractos para medir la actividad enzimática. (A) Preparación del homogenato. (B, C y D) Subdivisión en alícuotas del sobrenadante en tubos Eppendorf para posterior determinación de la actividad enzimática.	65
Figura 2.12: Baño de inversión de los homogenatos.	65
Figura 2.13: Configuración 2D de <i>landmarks</i> (puntos negros) y <i>semilandmarks</i> (puntos grises) utilizados para capturar la forma de la hoja de (A) <i>A. vulgatissima</i> y (B). <i>L. brasiliense</i> . <i>Landmarks</i> : (1) ápice, (2) lado izquierdo del pecíolo, (3) lado derecho del pecíolo, (24) punto medio entre los <i>landmarks</i> 2 y 3, (25) centroide de la lámina en la nervadura central. <i>Semilandmarks</i> : (4-13; 14-23) dispuestos a lo largo del contorno del pecíolo y la lámina.	67
Figura 3.1.1: Fotografía de plantas <i>A. vulgatissima</i> al finalizar los experimentos de Pb (arriba): 0, 50 y 100 μM Pb, y de Zn (abajo): 0, 100 y 200 μM Zn.	74
Figura 3.1.2: Parámetros de crecimiento en <i>A. vulgatissima</i> (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo: tratamientos del experimento Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Biomasa aérea y raíz, y (C, D) crecimiento relativo.	75
Figura 3.1.3: Parámetros fisiológicos en <i>A. vulgatissima</i> (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo: tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Contenido de agua (CA) y (C, D) rendimiento cuántico del fotosistema II, donde Φ_{psII} : representa la eficiencia del fotosistema II y Q_y la eficiencia máxima del fotosistema II. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).	76
Figura 3.1.4: Concentración de pigmentos en <i>A. vulgatissima</i> (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo (A, B, C): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (D, E, F): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D)	

clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).... 77

Figura 3.1.5: Actividad enzimática medida en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n=5$). Panel izquierdo (A, B, C, D): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx y (D, H) catalasa, CAT. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$)..... 79

Figura 3.1.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm error estándar; $n=5$). Tratamientos del experimento de (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100, 200 μM Zn). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$). 80

Figura 3.1.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la forma de la hoja de *A. vulgatissima* para los tratamientos del experimento de: (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn), mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. En los márgenes se muestra el cambio en la forma (color negro) de la hoja en superposición del consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representada por el contorno (color negro) a lo largo de los valores del eje representado..... 82

Figura 3.1.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas (AVC) de la forma de la hoja de *A. vulgatissima* para los tratamientos del experimento de: (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes). A los márgenes de cada eje canónico se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) desde la forma consenso (color turquesa) hacia los valores positivos y negativos de cada CP. El factor de escala. (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado..... 83

Figura 3.1.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la

variación en forma (n° CPs Pb= 8; n° CPs Zn= 7) entre los tratamientos del experimento de Pb (derecha) y Zn (izquierda). La línea vertical se corresponde con un $P = 0,05$ 84

Figura 3.1.10: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes 10 biomarcadores medidos en hojas de *A. vulgatissima*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb; verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición para cada biomarcador respecto al control. 86

Figura 3.2.1: Fotografía de plantas *L. brasiliense* al finalizar el experimento para el experimento de (arriba): Pb 0, 50 y 100 μM Pb y (abajo): Zn 0, 100 y 200 μM Zn. 95

Figura 3.2.2: Parámetros de crecimiento en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos del experimento Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Biomasa aérea y raíz y (C, D) crecimiento relativo. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). 96

Figura 3.2.3: Parámetros fisiológicos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) contenido de agua (CA), (C, D) rendimiento cuántico del fotosistema II, donde Φ_{psII} representa la eficiencia del fotosistema II y Qy la eficiencia máxima del fotosistema II. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). 97

Figura 3.2.4: Concentración de pigmentos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo (A, B, C): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (D, E, F): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$). 98

Figura. 3.2.5: Actividad enzimática en hojas de *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n=5). Panel izquierdo (A, B, C, D): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM

Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; y (D, H) catalasa, CAT. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$). 100

Figura 3.2.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *L. brasiliense* (media \pm error estándar; $n=5$). Tratamientos del experimento (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100, 200 μM Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). 101

Figura 3.2.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la hoja de *L. brasiliense* para los tratamientos del experimento: (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn), mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. En los márgenes se muestra el cambio en la forma (color negro) de la hoja en superposición del consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado..... 102

Figura 3.2.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas (AVC) de la forma de la hoja de *L. brasiliense* para los tratamientos del experimento de (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje canónico se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) en superposición al consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado. 104

Figura 3.2.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma (n° C Pb= 6; n° C Zn= 6) entre los tratamientos del experimento de Pb (derecha) y Zn (izquierda). La línea vertical se corresponde con un $P = 0,05$ 105

Figura 3.2.10: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos del experimento de Pb: (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, y Zn: (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *L. brasiliense*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa

(SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Q_y) y eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb, verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcador respecto al control..... 107

Figura 4.1.1: Fotografía de plantas *A. vulgatissima* seleccionadas aleatoriamente al finalizar el experimento para cada uno de los tratamientos. 119

Figura 4.1.2: Parámetros de crecimiento en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, D) Biomasa raíz, (B, E) biomasa aérea y (C, F) crecimiento relativo. 120

Figura 4.1.3: Parámetros fisiológicos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, D) contenido de agua (CA), (C, D) eficiencia máxima del fotosistema II (Q_y) y (C, E) eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}). *Zn y/o *Pb en la esquina izquierda indica que los factores principal Pb y/o Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para las comparaciones principales (*Pb) y (*Zn)..... 121

Figura 4.1.4: Concentración de pigmentos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides..... 122

Figura 4.1.5: Actividad enzimática en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n= 4 o 5). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; (D, H) catalasa, CAT. Pb*Zn y *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B, C) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn)..... 124

Figura 4.1.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm error estándar; n= 5). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). 125

Figura 4.1.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la hoja de *A. vulgatissima* del experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μ M Pb + 0 μ M Zn, 50 μ M Pb+100 μ M Zn, 100 μ M Pb + 100 μ M Zn, 50 Pb + 200 μ M Zn y 100 μ M Pb + 200 μ M Zn, mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. A los márgenes de cada componente se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre la CP), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. 126

Figura 4.1.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas de la hoja en *A. vulgatissima* del experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μ M Pb + 0 μ M Zn, 50 μ M Pb+100 μ M Zn, 100 μ M Pb + 100 μ M Zn, 50 Pb + 200 μ M Zn y 100 μ M Pb + 200 μ M Zn, en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre cada eje), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada eje..... 127

Figura 4.1.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma (n° CPs= 7) entre los tratamientos combinados Pb + Zn y el control. El valor de la distancia de Mahalanobis que determina la significancia estadística ($P < 0,05$) entre los grupos se indica mediante una línea vertical..... 128

Figura 4.1.10: Largo, ancho y centro size (CS) de hojas de *A. vulgatissima* (media \pm error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). Pb*Zn o *Zn y/o *Pb en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Pb y/o Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias

estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn) y principales (*Pb); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn). 129

Figura 4.1.11: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (E) 100 Pb, (B) 100 Zn, (F) 200 Zn, (C) 50 μM Pb + 100 μM Zn, (G) 100 μM Pb + 100 μM Zn, (D) 50 μM Pb + 200 μM Zn, (H) 100 μM Pb + 200 μM Zn basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *A. vulgatissima*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcador respecto al control. 131

Figura 4.2.2: Fotografías de plantas *L. brasiliense* seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los 9 tratamientos al finalizar el experimento. 139

Figura 4.2.3: Parámetros de crecimiento en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) Biomasa raíz, (B, E) biomasa aérea y (C, F) crecimiento relativo. 140

Figura 4.2.4: Parámetros fisiológicos (media \pm el error estándar; n= 10) en *L. brasiliense*. Tratamientos graficados según incremento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) en panel izquierdo y según incremento de Zn (0, 100, 200 μM Zn) en panel derecho. (A, D) contenido de agua (CA), (B, E) eficiencia del fotosistema II (ΦpsII) y eficiencia máxima del fotosistema II (Qy). Pb*Zn *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples Zn|Pb y principales (*Zn). 142

Figura 4.2.5: Concentración de pigmentos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n= 10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. *Zn en la esquina izquierda indica que el efecto factor principal Zn es estadísticamente significativo (ANOVA, $P <$

0,05). Las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos principales (*Zn). 143

Figura 4.2.6: Actividad enzimática en hojas de *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n= 5$). Panel izquierdo: (A, B, C, D): tratamientos graficados según incremento de tratamientos de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos graficados según incremento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD;(B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; (D, H) catalasa, CAT. Pb*Zn o *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o el efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn). 145

Figura 4.2.7: Concentración de malondialdehído en hojas de *L. brasiliense* (media \pm error estándar; $n= 5$). Tratamientos graficados según (A) incremento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) incremento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). 146

Figura 4.2.8: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de las hojas de *L. brasiliense* del experimento combinado de Pb + Zn correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb+100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. A los márgenes de cada componente se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre la CP), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. 147

Figura 4.2.9: Diagrama de dispersión del Análisis de Variables Canónicas de la hoja en *L. brasiliense* para el experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb +100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre el eje de la VC),

respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada eje. 148

Figura 4.2.10: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma ($n^{\circ} C= 7$) entre los tratamientos combinados Pb + Zn y el control. El valor de la distancia de Mahalanobis que determina la significancia estadística ($P < 0,05$) entre los grupos se indica mediante una línea vertical. 149

Figura 4.2.11: Media \pm error estándar ($n= 10$) del largo, ancho y *centroid size* (CS) de hojas de *L. brasiliense* según tratamiento con Pb (0, 50 y 100 μM Pb) o Zn (0, 100 y 200 μM Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). Pb*Zn o *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o el efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn). 150

Figura 4.2.12: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *L. brasiliense*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb, verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcadaor respecto al control. 152

Anexo Figura 1: Representación del cambio en forma y tamaño entre dos objetos geométricos, un cuadrado y un rectángulo. Se puede observar como el cambio en forma (*form*) es una combinación del cambio en "tamaño" (*size*) y "forma" (*shape*) (Richtsmeier *et al.* 2002). 165

Anexo Figura 2: Representación del Análisis Generalizado de Procrustes en una de *A. vulgarissima* (ala). Digitalización mediante la posición de *landmarks* (cuadrados) en dos hojas de distintos tamaños. (A) Escalado a un mismo tamaño (*centroid size*= 1). (B) Traslación a un mismo origen (x0, y0). (C) Rotación minimizando las dinstancias de Procrustes entre cordenadas de *Landmarks*. 166

Anexo Figura 3: (A) alas con <i>Matching symmetry</i> , (B) rostro humano con <i>Object symmetry</i> (tomado de Mardia <i>et al.</i> 2000).	168
Anexo Figura 4: Imagen de pares de <i>landmarks</i> en la hoja digitalizada de <i>Limonium brasiliense</i> con simetría de objeto (MorphoJ).....	168
Anexo Figura 5: Análisis de variación de la forma en una estructura hipotética con <i>Object Symmetry</i> . Los landmarks 1 y 2 representan la línea media, los landmarks impares 5,6 y 7 (lado derecho) y los pares 4, 6 y 8 (lado izquierdo). En color verde se muestra la configuración original. En color naranja la configuración reflejada a cada uno de los lados (derecho hacia el izquierdo y viceversa). En color violeta se muestra la forma consenso, perfectamente simétrica.	168
Anexo Figura 5: Descripción de partes de la hoja.	169

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a quienes me acompañaron y guiaron en este camino de formación profesional, a Yani y Fede, con quienes vengo trabajando desde inicios de mi carrera de Licenciatura. Quisiera darles las gracias por su paciencia, dedicación y su apoyo durante estos años, no solo en referencia al desarrollo de esta tesis, sino desde el plano personal, sobre todo en momentos donde las fuerzas decaían. Gracias por motivarme y confiar en mí, y hacerme parte de su familia.

A la Dra. Ana Cenzano, Dra. Mirta Menone y Dra. Sandra Bucci por la minuciosa revisión y los aportes que mejoraron sustancialmente esta tesis.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, la cual fue cuna de mis estudios de grado y posgrado, brindándome la educación para alcanzar el título de doctora. A todas las personas que formaron como profesional y como persona, así como todo el personal administrativo y auxiliar que me ayudó y acompañó en este camino.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para realizar este doctorado y en particular al Instituto Patagónico para el Estudio de los Ecosistemas Continentales IPEEC-CONICET por brindarme el espacio y los recursos para poder llevar a cabo esta tesis.

Al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (PICTs N° N° 2016-0017, 2018-03802 y 2021-GRF-TII-00397) y Neotropical Grassland Conservancy (Derald G. Langham Memorial Research Grant) por el financiamiento que hizo posible desarrollar este doctorado.

A todas las personas del CENPAT que de alguna manera me ayudaron cuando lo necesite y enseñaron cosas nuevas. A todo el grupo del laboratorio de suelos a Claudia, Lina, Estela y Tomás. A Mauricio, al laboratorio de química: Marian, Clau y Rodri, por su buena predisposición para enseñarme a utilizar el equipamiento y trabajar en conjunto. A Lau por su agilidad en la gestión de trámites y por ayudar siempre que estaba a su alcance.

A mi diseñadora favorita Magui, mi hermana, quien en distintas ocasiones me ayudó en el diseño de gráficos y en detalles de trabajos y de este mismo escrito. También al Kily,

mi amigo que me salvó las papas en con sus artirugios de diseño para editar y armar figuras.

A todas las personas que dieron de su tiempo y esfuerzo en ayudarme a discutir y analizar resultados, comprender técnicas, entender trabajos, etc. A Belu, Maga, Flor, Pablito, Tomás y todos los que formaron parte de los trabajos publicados y de la elaboración de esta tesis.

A todos los compas de la I17. A los que están hoy, Sil, Romi, Facu y Maga, y a los que estuvieron: Lina, Martín y Cristian. Por compartir TOCs, charlas, mates, junto a tristeza y alegrías; por el ambiente de trabajo generado y el compañerismo.

A mis amigos de la vida y a los que me llevo como premio de esta etapa. Quienes desde su lugar y capacidad estuvieron en el momento bisagra de mi vida donde atravesé el dolor más profundo de mi vida.

A las personas que más amo mis padres y hermanos, quien forman parte del tesoro que Dios me regalo para aprender a amar al transitar esta vida. A cada uno de los tesoros de los sobrinos de sangre, políticos y de corazón. A los cuñados y cuñados.

Finalmente, a esa persona de corazón inmenso que apenas puedo vislumbrar, quién desde mi adolescencia cautivo mi corazón, que hoy es parte de mi vida y con quien espero compartir la vida. Al mejor compañero y amigo con quien puedo compartir charlas noñas y profundas, con quién encuentro la motivación y la pasión por la investigación, la naturaleza, el deporte, la nutrición y la comida. Te amo Fran.

Abreviaturas

APx: ascorbato peroxidasa

FBA: factor de bioacumulación

FBC: factor de bioconcentración

CAT: catalasa

CA: contenido de agua

CS: centroid size

GPA: Análisis Generalizado de Procrustes

GPx: guaiacol peroxidasa

IBRv2: Índice biológico de respuesta integrada versión 2

MDA: malondialdehído

PH: peso húmedo de cada planta de los tratamientos al finalizar el experimento

PS1: peso seco de 10 plantas al inicio el experimento

PS2: peso seco al finalizar el experimento

Qy: eficiencia máxima del fotosistema II

ROS: reactive oxygen species (especies reactivas del oxígeno)

SOD: superóxido dismutasa

t: duración del experimento en días

FT: factor de traslocación

Φ_{psII} : eficiencia del fotosistema II

Guía de lectura y organización de la tesis

Capítulo I: En este primer capítulo se introduce el marco teórico en el cual se sustenta el tema de investigación. Se establecen el contexto y la justificación del estudio, y se detallan los objetivos e hipótesis que se desarrollaron y se pusieron a prueba y se desarrollan a lo largo de los posteriores capítulos de esta tesis.

Capítulo II: En este capítulo se desarrolla la metodología general correspondiente a los dos capítulos subsiguientes. Se describe en detalle el diseño experimental y los procedimientos involucrados en la determinación de las variables respuestas y los análisis estadísticos implicados.

Capítulo III: Este capítulo se divide en dos subcapítulos en los cuales se presentan y discuten los resultados relacionados al objetivo I correspondientes a la evaluación del incremento individual de Pb y Zn en *Atriplex vulgatissima* (subcapítulo III-a) y *Limonium brasiliense* (subcapítulo III-b).

Capítulo IV: En este capítulo se presentan y discuten los resultados relacionados al objetivo II correspondientes a la evaluación del incremento combinado de Pb y Zn en *A. vulgatissima* (subcapítulo IV-a) y *L. brasiliense* (subcapítulo IV-b).

Capítulo V: En este último capítulo se desarrollan las conclusiones y consideraciones finales, y se plantean recomendaciones para futuras investigaciones.

Resumen

Las marismas son ambientes intermareales que poseen gran importancia ecológica y económica, y proveen innumerables servicios ecosistémicos. En ciertas costas, estos ambientes están siendo amenazados por elevadas concentraciones de metales derivadas de diversas actividades antrópicas. Los metales no son biodegradables, por lo que perduran en el ambiente y en los organismos, y se bioacumulan a lo largo de las cadenas tróficas. Cuando ingresan a las marismas, los metales biodisponibles pueden ser absorbidos por la vegetación y acumulados en la raíz, tallo, hojas y otros tejidos. Especialmente, las plantas halófitas presentan adaptaciones a elevadas salinidades y suelen ser capaces de habitar sitios contaminados por metales. Los metales se clasifican como esenciales y no esenciales para las plantas, según el requerimiento y la función que desempeñen en los procesos fisiológicos y metabólicos. En particular el plomo (Pb) no forma parte de los elementos esenciales, resultando tóxico en muy pequeñas concentraciones; mientras que el zinc (Zn) es un micronutriente esencial que está asociado a diversos procesos metabólicos, es un componente de una gran variedad de enzimas, influencia la permeabilidad de la membrana y la estabilidad de algunos componentes celulares, entre otras funciones. Sin embargo, este metal resulta tóxico en concentraciones elevadas.

Entre las técnicas de remediación de sitios contaminados por metales, la fitorremediación es una técnica efectiva, de bajo costo y con numerosos beneficios ecológicos, la cual utiliza plantas con capacidad para inmovilizar, absorber y/o acumular metales del medio. Por otro lado, en el contexto de estudios de monitoreo, los biomarcadores son utilizados como herramientas de detección temprana de la contaminación, permitiendo detectar la presencia de un contaminante y estimar la cantidad del mismo, de forma rápida, continua y a bajo costo. En este sentido, diversas respuestas bioquímicas, fisiológicas y morfométricas en las plantas expuestas a metales son utilizados como biomarcadores de estrés.

Existen diversos estudios en los que se han reportado niveles elevados de metales en distintos sitios costeros y marismas de la Patagonia, los cuales son absorbidos por plantas halófitas. Por eso es importante comprender como es la interacción entre estas plantas y los metales, ya que proporciona una visión del potencial que poseen las distintas

especies para tolerar, retener y/o acumular metales a los fines de ser utilizadas en procesos de fitorremediación. En este marco, el objetivo general de esta tesis es cuantificar y comparar la acumulación de Pb y Zn en la raíz y biomasa aérea de *Limonium brasiliense* y *Atriplex vulgatissima* sometidas a diferentes concentraciones de dichos metales, de manera individual y combinada, evaluando a su vez la tolerancia de estas dos especies a estos metales, a través de parámetros de crecimiento, fisiológicos, bioquímicos y morfométricos como biomarcadores de estrés. Para evaluar el efecto del incremento de Pb y Zn en *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* se llevaron a cabo experimentos de estrés en cámara de cultivo en los cuales las plantas fueron sometidas a diferentes concentraciones de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y Zn (0, 100 y 200 μM Zn) de manera individual y combinada. Al finalizar los experimentos, se determinó la concentración (cc) de Pb y Zn en la raíz y en la biomasa aérea. Además, se calcularon los factores de bioconcentración ($\text{FBC} = [\text{cc de metal en la raíz}] / [\text{cc de metal en la solución}]$), de bioacumulación ($\text{FBA} = [\text{cc de metal en la biomasa aérea}] / [\text{cc de metal en la solución}]$) y de translocación ($\text{FT} = [\text{cc de metal en la biomasa aérea}] / [\text{cc de metal en la raíz}]$), para evaluar la capacidad de cada especie para remediar estos metales. Asimismo, se determinaron los siguientes biomarcadores: biomasa seca, crecimiento relativo, contenido de agua, eficiencia del fotosistema II, concentración de pigmentos (clorofila a, clorofila b y carotenoides), actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, guaiacol peroxidasa y catalasa), daño a membranas mediante el contenido de malondialdehído (MDA) y variaciones en la forma de las hojas. Por último, se calculó el índice biológico de respuesta integrada versión 2 (IBRV2) utilizando los valores de la mayoría de los biomarcadores mencionados anteriormente. Se observó que todas las plantas de *A. vulgatissima* y *L. brasiliense* sobrevivieron a las concentraciones de Pb y Zn a las que fueron expuestas, de manera individual y combinada, manteniendo constante su biomasa. Además, ambas especies mostraron patrones similares de acumulación de Pb y Zn en sus órganos, concentrando Pb principalmente en sus raíces ($\text{FBC} > 1$ y $\text{FT} < 1$) y Zn en la biomasa aérea ($\text{FBA} > 1$ y $\text{FT} > 1$), lo que las hace adecuadas para la fitoestabilizar Pb y fitoextraer Zn. La concentración de pigmentos en *A. vulgatissima* se redujo únicamente frente a la adición de 200 μM Zn en el experimento individual; mientras que en *L. brasiliense* disminuyó por la adición individual de 50 μM Pb y frente a la adición de Zn tanto en el experimento individual como combinado (Pb + Zn). Ambas especies

mostraron una gran capacidad para tolerar y adaptarse a los niveles estudiados de Pb y/o Zn mediante la regulación de la actividad fotosintética y antioxidante. Sin embargo, en los experimentos de incremento individual el aumento de los niveles de MDA mostró indicios de estrés en respuesta a las concentraciones más altas de Pb y Zn en *A. vulgatissima* y frente al nivel más alto de Zn en *L. brasiliense*. La forma de la hoja de *A. vulgatissima* y *L. brasiliense*, mostró ser un carácter plástico debido a que la adición de Pb y/o Zn generó variaciones morfométricas, como la esbeltez de la lámina y proyección del pecíolo, y particularmente en *A. vulgatissima*, se observaron sutiles prolongaciones en la zona basal del limbo asociadas al incremento de Zn. Esto indica que la morfología de la hoja puede ser utilizada como indicador de la presencia de Pb y/o Zn. Por último, según el IBRV2 para ambas especies los tratamientos 50 μM Pb y 200 μM Zn, solos o combinados, presentaron mayor valor del índice y por lo tanto mayor estrés. El IBRV2 resultó ser una herramienta sencilla y útil para diferenciar, visualizar y evaluar de manera integral los efectos del Pb y Zn en el estado de salud de las plantas. Los indicios de estrés en cada especie, reflejados por los distintos biomarcadores utilizados, dependieron del biomarcador utilizado y del tratamiento aplicado. Además, los parámetros de fluorescencia de la clorofila, la concentración de pigmentos, el contenido de MDA y el análisis morfogeométrico resultaron ser herramientas eficientes para evaluar los efectos del estrés causados por estos metales, mostrando sensibilidad en los diferentes tratamientos.

Abstract

Salt marshes are intertidal environments of great ecological and economic importance, providing numerous ecosystem services. However, on certain coasts, these environments are threatened by high concentrations of metals derived from various anthropogenic activities. Since metals are not biodegradable, they persist in the environment and organisms and bioaccumulate along food chains. When entering the salt marshes, vegetation can absorb bioavailable metals that accumulate in tissues such as the root, stem, and leaves. Halophytic plants are adapted to high salinities and can often thrive in metal-contaminated areas. Metals are classified as essential or non-essential for plants, depending on their role in physiological and metabolic processes. Lead (Pb) is a non-essential element and is toxic even in low concentrations. On the other hand, Zinc (Zn) is an essential micronutrient that plays a crucial role in various metabolic processes. It is a component of numerous enzymes, affecting membrane permeability and cellular components stability, among other functions. However, high concentrations of zinc can also be toxic.

Phytoremediation is an effective and low-cost technique for remediating sites contaminated by metals. It offers numerous ecological benefits by using plants that can immobilize, absorb, and/or accumulate metals from the environment. Biomarkers are used as tools for early contamination detection in monitoring studies, allowing for the quick and continuous estimation of pollutant presence and quantity at low cost. Various biochemical, physiological, and morphometric responses in plants exposed to metals are used as stress biomarkers. Several studies have reported high levels of metals in different coastal sites and marshes of Patagonia, which halophyte plants absorb. Therefore, understanding the interaction between plants and metals is crucial as it provides insight into the potential of different species to tolerate, retain, and/or accumulate metals for use in phytoremediation processes.

The aim of this thesis was to quantify and compare the accumulation of Pb and Zn in the root and aerial biomass of *Limonium brasiliense* and *Atriplex vulgatissima*. The two species were subjected to different concentrations of these metals, individually and in combination. The tolerance of these species was evaluated through growth, physiological, biochemical, and morphometric parameters as stress biomarkers. To

assess the individual and combined effects of increasing Pb (0, 50, and 100 μM Pb) or Zn (0, 100, and 200 μM Zn) on *L. brasiliense* and *A. vulgatissima*, stress experiments were conducted in a culture chamber. The concentration (cc) of Pb and Zn in root and aerial biomass was determined at the end of the experiments. Additionally, to evaluate the ability of each species to remediate these metals, bioconcentration (BCF= [cc of metal in root] / [cc of metal in solution]), bioaccumulation (BAF= [cc of metal in aerial biomass] / [cc of metal in solution]), and translocation (FT= [cc of metal in aerial biomass] / [cc of metal in root]) factors were calculated. The study also measured several biomarkers, including dry biomass, relative growth, relative water content, photosystem II efficiency, pigment concentration (chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids), antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutamate peroxidase, and catalase), membrane damage by malondialdehyde (MDA) content, and leaf shape variations. The integrated biological response index version 2 (IBRv2) was calculated using most of the abovementioned biomarkers. It was observed that all *A. vulgatissima* and *L. brasiliense* plants survived the Pb and Zn concentrations to which they were exposed, individually and combined, while maintaining their biomass constant. Both species exhibited similar patterns of Pb and Zn accumulation in their tissues. Pb was primarily concentrated in their roots (FBC > 1 and FT < 1), while Zn was concentrated in the aerial biomass (FBA > 1 and FT > 1). This makes them ideal for phytostabilizing Pb and phytoextracting Zn. In the single experiment, only the addition of 200 μM Zn reduced pigment concentration in *A. vulgatissima*, while in *L. brasiliense*, it was decreased by the single addition of 50 μM Pb and by the addition of Zn in both the single and combined (Pb + Zn) experiment. Both species demonstrated a high capacity to tolerate and adapt to the studied levels of lead (Pb) and/or zinc (Zn) by regulating their photosynthetic and antioxidant activity. However, in single increment experiments, increased malondialdehyde (MDA) levels indicated signs of stress in response to higher concentrations of Pb and Zn in *A. vulgatissima* and higher levels of Zn in *L. brasiliense*. The study showed that the leaf shape of *A. vulgatissima* and *L. brasiliense* is a plastic character, as the addition of Pb and/or Zn resulted in morphological variations, such as the slenderness of the lamina and projection of the petiole. In particular, subtle prolongations were observed in the basal zone of the blade and were associated with the increase of Zn in *A. vulgatissima*. These findings suggest that leaf morphology is an

indicator of the presence of Pb and/or Zn. Finally, according to IBRv2, both species showed higher stress levels with the 50 μM Pb and 200 μM Zn treatments, either alone or combined. IBRv2 is a simple and useful tool for differentiating, visualizing, and comprehensively evaluating the effects of Pb and Zn on plant health. The signs of stress in each species depended on the biomarker used and the treatment applied. In addition, chlorophyll fluorescence parameters, pigment concentration, MDA content and morphogeometric analysis proved to be efficient tools for evaluating the effects of stress caused by these metals, showing sensitivity in the different treatments.

CAPÍTULO

Introducción general



1.1. Marismas

Las marismas son ambientes intermareales donde el lento movimiento de agua genera la acumulación de sedimentos finos que luego son colonizados por especies de plantas halófitas, cuya distribución es en bandas paralelas a la línea de costa y se correlaciona con la elevación topográfica (Adam 1993) (Fig. 1.1). Además, los patrones de zonación de la vegetación dentro de cada marisma responden a la salinidad, a los influjos de marea, a la disponibilidad de nutrientes, así como a procesos de facilitación y competencia entre las especies de plantas (Zedler *et al.* 2008, Giuliani y Bellucci 2019). Estos ecosistemas están distribuidos a lo largo de la mayoría de las costas del mundo, en la zona de transición entre el mar y la tierra, de modo que albergan flora y fauna provenientes de ambos ambientes (Weis *et al.* 2017, Giuliani y Bellucci 2019, Roe *et al.* 2021) (Fig. 1.2). Existen marismas de naturaleza estrictamente marina, como las marismas de marea, así como aquellas que poseen un aporte de agua dulce proveniente de la desembocadura de los ríos, como algunos estuarios, deltas o humedales costeros (Sánchez *et al.* 2007, Mitsch *et al.* 2015).

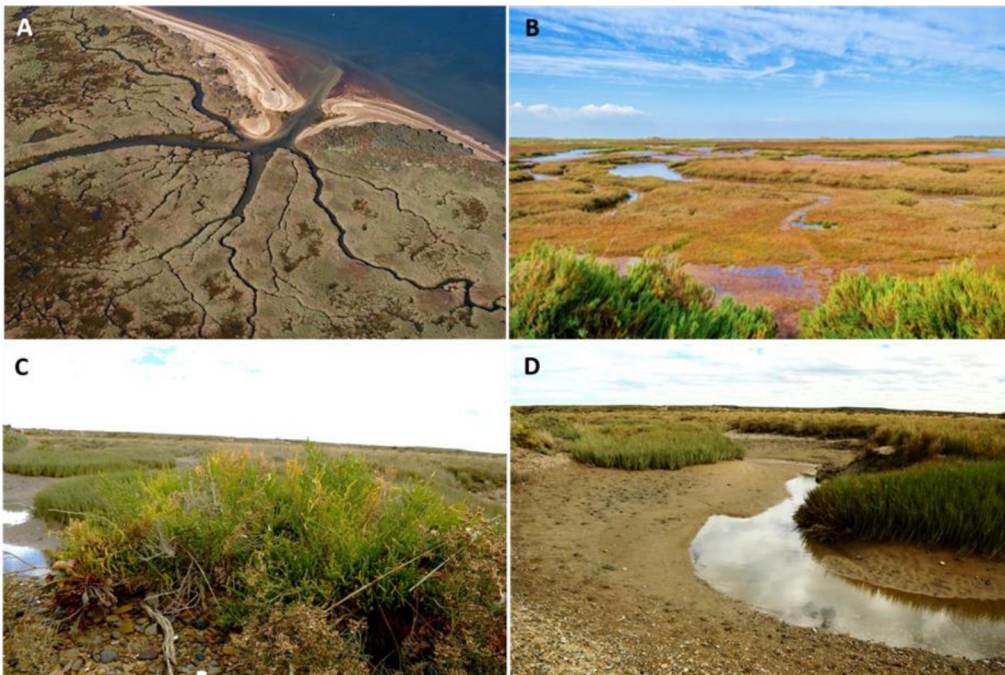


Figura 1.1: Imágenes de marismas. (A) Vista aérea de marisma del suroeste de España. Foto tomada por José Antonio Fernández en 2011, (B) Marisma de Norfolk en Inglaterra explotada turísticamente y (C, D) Diferentes sitios de la marisma de Riacho en Península Valdés, Argentina.

Las marismas poseen gran importancia desde el punto de vista ecológico y económico, y proveen innumerables servicios ecosistémicos (Giuliani y Bellucci 2019, zu Ermgassen *et al.* 2021). Desde la perspectiva ecológica proveen alimento, hábitat, refugio y lugar de reproducción a numerosas especies de anélidos, crustáceos, moluscos y peces, muchos de ellos de importancia comercial (Weis *et al.* 2017). Además, muchas marismas funcionan como sitios de parada obligatoria para el descanso y la alimentación de diversas aves migratorias (Greenberg *et al.* 2014). Estos ambientes poseen una elevada productividad primaria y cumplen un rol clave en el ciclado de nutrientes y en los procesos asociados a la nitrificación. Por otro lado, actúan como sumidero y fuente de carbono, siendo uno de los ecosistemas más productivos del mundo (Chmura *et al.* 2003, Sousa *et al.* 2010, Couto *et al.* 2013, Weis *et al.* 2017, Huxham *et al.* 2018). Al mismo tiempo, las marismas desempeñan un papel clave en la protección costera mediante la atenuación y estabilización de las olas e inundaciones previniendo la erosión (Gedan *et al.* 2011, Giuliani y Bellucci 2019). Asimismo, a menudo funcionan como filtros naturales de sedimentos y contaminantes (Zedler *et al.* 2008, Mitsch *et al.* 2009, Alam *et al.* 2021). Por último, debido a su complejidad en cuanto a características geomorfológicas, a la composición florística y a los paisajes que presentan, estas poseen un gran valor social, ya que son utilizadas para el turismo, recreación, pesca, educación e incluso investigación (Zedler *et al.* 2008, Barbier *et al.* 2011) (Fig. 1.1 B y D).

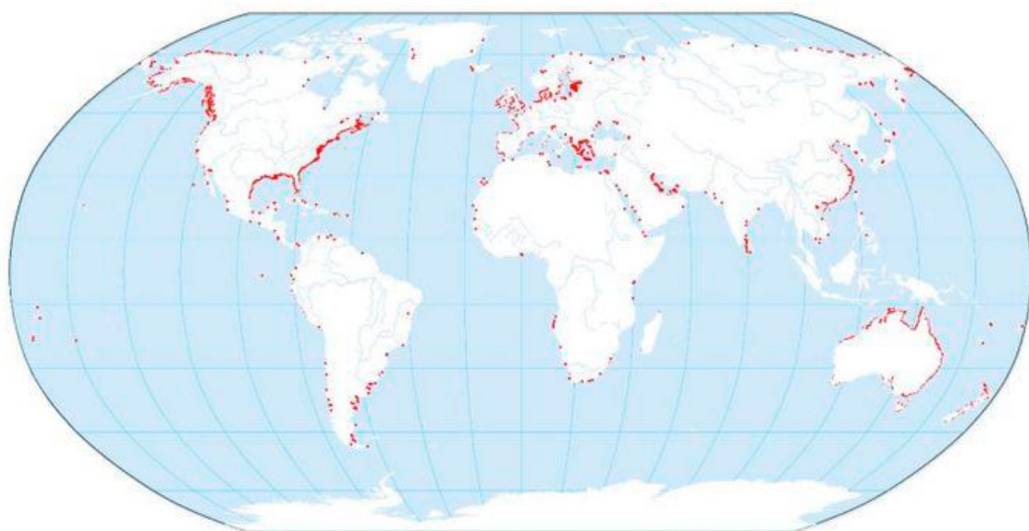


Figura 1.2: Distribución global de marismas. Imagen tomada de Mcowen *et al.* 2017.

Como se mencionó anteriormente, las marismas albergan una vegetación halófila característica, compuesta por diversas especies herbáceas, juncos y arbustos (Weis *et al.* 2017, Sarika y Zikos 2021). Estas plantas cumplen un rol clave tanto en la evolución, como en la dinámica y funcionamiento ecológico de estos ambientes (Löhmus *et al.* 2020, Cahoon *et al.* 2021). A nivel global, generalmente las marismas están dominadas por una o más especies de pastos perennes del género *Spartina* y arbustos de la familia Amaranthaceae, de los géneros *Arthrocnemum*, *Atriplex*, *Chenopodium*, *Salicornia*, *Sarcocornia* y *Suaeda* (Zedler *et al.* 2008). Particularmente en las marismas de la Patagonia Argentina la vegetación está representada principalmente por *Sarcocornia perennis*, *Spartina densiflora*, *Spartina alterniflora*, *Atriplex vulgatissima*, *Limonium brasiliense* y *Suaeda divaricata* (Bortolus *et al.* 2009, Idaszkin *et al.* 2011, Bertiller *et al.* 2017) (Fig. 1.3).



Figura 1.3: (A) *Sarcocornia perennis*, (B) *Spartina alterniflora*, (C) *Atriplex vulgatissima* y (D) *Limonium brasiliense*.

Las plantas halófitas abarcan alrededor del 1% de la flora conocida a nivel global (Wungrampha *et al.* 2020) y constituyen el 6.5% de la flora argentina (Brignone *et al.* 2019). En particular, el género *Atriplex* es el más representado englobando un total de 55 especies, de las cuales 45 son nativas (Brignone *et al.* 2019). La mayoría de las plantas

de este género dominan la flora de hábitats inhóspitos y adversos como estepas, desiertos, salares y zonas costeras (Čalasan *et al.* 2022). Específicamente, *A. vulgatissima* Speg. (Amaranthaceae) es un arbusto perenne densamente ramificado (Fig. 1.3 C). Esta halófito habita ambientes salinos y costeros del sur de Argentina (Neuquén, Chubut y Santa Cruz) y del centro de Chile (Beeskow *et al.* 2015, Brignone *et al.* 2016). En la marisma Riacho (Península Valdés, Chubut, Argentina) es una de las plantas dominantes de la comunidad de especies en la zona alta de la marisma (Bertiller *et al.* 2017). En cuanto a su morfología este arbusto puede superar el metro de altura, tiene una elevada producción en biomasa y un sistema de raíces profundas. Posee hojas pequeñas, linear-elípticas de 7-5 x 2-5 mm, con un pequeño pecíolo y dispuestas de manera alterna (www.floraargentina.edu.ar).

Por otro lado, *L. brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) es un subarbusto o arbusto perenne, que generalmente no supera los 40 cm de alto, posee un pequeño tallo y hojas de un tamaño de lámina y pecíolo considerablemente mayor que el resto de las plantas con las que comparte su hábitat (www.floraargentina.edu.ar, Beeskow *et al.* 2015, Gancedo *et al.* 2018). Esta especie se distribuye a lo largo de ambientes costeros de Argentina, Uruguay y el sur de Brasil. Al igual que *A. vulgatissima* predomina en zonas altas de las marismas (Beeskow *et al.* 2015, Bertiller *et al.* 2017) (Fig. 1.3 D). Tradicionalmente *L. brasiliense* se ha utilizado con fines medicinales (Murray *et al.* 2004, Blainski *et al.* 2017, Gancedo *et al.* 2018).

1.1.1. Contaminación de marismas: los metales como un caso particular

A pesar de la importancia y beneficios enunciados previamente, desde hace décadas las marismas están sujetas al aporte de diversos tipos de contaminantes, viéndose de esta manera afectada la integridad y el funcionamiento de las mismas (Barbier *et al.* 2011). En este sentido, se considera que son uno de los ecosistemas más vulnerables y amenazados a escala global (Convención de Ramsar sobre los Humedales 2018). Según Mcowen y colaboradores (2017) la pérdida de marismas a nivel global oscila entre un 25% y 50% y se estima que su cobertura actual es de aproximadamente 5Mha.

En particular, las marismas aledañas a ciudades, zonas industriales y puertos son susceptibles al ingreso de especies invasoras y diversas sustancias xenobióticas, incluidos los metales traza (Gilby *et al.* 2021, Roe *et al.* 2021). Aunque los metales son

componentes naturales de la corteza terrestre y se encuentran en el agua, plantas y animales de forma inherente, la actividad industrial intensiva junto a las formas de producción y consumo han producido un incremento sustancial en sus concentraciones en estos ambientes (Wójcik *et al.* 2017). En este sentido es importante destacar que los metales no son biodegradables, por lo que perduran en el ambiente y en los organismos, y se bioacumulan a lo largo de las cadenas tróficas (Mitra *et al.* 2022, Oladoye *et al.* 2022).

Los metales pueden ingresar a las marismas por diversas vías, a través de procesos de escorrentía y lixiviación desde el continente, desde la atmósfera o a través de los cuerpos de agua que inundan periódicamente las marismas (Roe *et al.* 2021). Una vez que los metales ingresan a las marismas se dispersan en su interior con cada marea e interactúan tanto con el suelo como con la comunidad biótica. Estos elementos, pueden permanecer en el suelo en formas biológicamente no disponibles (Hung y Chmura 2007, Botté *et al.* 2010) o bien ser absorbidos por la vegetación, acumulados en raíces y rizomas o en los tallos y hojas (Reboreda y Caçador 2007, Lutts y Lefèvre 2015, Negrin *et al.* 2020).

Diversos estudios realizados en sitios costeros y marismas de la Patagonia revelaron presencia de metales, indicando en algunos casos concentraciones de riesgo y bioacumulación en la biota, mientras que otros trabajos demostraron contaminación baja o moderada. Algunos autores reportaron la presencia de metales como Zn, Cu, Cr, Hg, Pb, Sn, Cd y As, en sedimentos, suelos, macroalgas, plantas e invertebrados en diferentes sitios de la Bahía de San Antonio (Río Negro, Argentina) (Gil *et al.* 1999, Esteves *et al.* 2004, Vázquez *et al.* 2007, Gil *et al.* 2015, Primost *et al.* 2017). Además, varios trabajos realizados en la marisma de San Antonio demuestran un marcado gradiente de contaminación en el suelo y plantas (Idaszkin *et al.* 2015, 2017; Pollicelli *et al.* 2018). Por otro lado, la marisma de Rawson (Chubut, Argentina), presentó bajo impacto antrópico (Idaszkin *et al.* 2014), mientras que en suelos y plantas de marismas rocosas del Golfo Nuevo (Chubut, Argentina) se detectó la presencia de Pb, Ni y Cr en concentraciones calificadas como moderadas a severas, siendo dicho enriquecimiento asociado a la actividad portuaria e industrial (Idaszkin *et al.* 2020).

1.2. Tolerancia de especies halófitas a la presencia de metales

Las plantas halófitas presentan una marcada tolerancia a diversos estresores (Flowers *et al.* 2010, Nikalje *et al.* 2019a, b, c) y demuestran eficacia en la restauración de suelos

salinos (Saddhe *et al.* 2020, Karakas *et al.* 2020) y contaminados por metales (Liang *et al.* 2017a, Aziz y Mujeeb 2022). En este sentido, se piensa que los mecanismos adaptativos que les permite hacer frente a elevadas concentraciones de iones tóxicos como Na⁺ y Cl⁻, les otorgan una ventaja en la tolerancia y acumulación de metales (Lutts y Lefèvre 2015, Van Oosten *et al.* 2015, Samiei *et al.* 2020, Rahman *et al.* 2021). Algunos mecanismos descritos indican diversas estrategias como el secuestro de iones tóxicos en vacuolas o paredes celulares para minimizar el efecto del estrés oxidativo, la acumulación y excreción de iones tóxicos en tricómas y glándulas de la sal y la succulencia de las hojas (Lombardi *et al.* 2022, García Caparrós *et al.* 2022, Singh *et al.* 2023). Otros mecanismos fisiológicos incluyen el aumento en el número de cloroplastos, el mantenimiento de la actividad fotosintética y del gradiente de potencial de agua, la síntesis de solutos orgánicos para mantener el potencial osmótico y el incremento en la actividad enzimática antioxidante (Hamed *et al.* 2013, Singh *et al.* 2023). Por otro lado, la resistencia a los metales puede verse facilitada por proteínas de bajo peso molecular como fitoquelatinas y metalotioneínas, las cuales se unen a los metales formando complejos evitando de este modo la toxicidad dentro de la célula (Cobbett y Goldsbrough 2002).

Estudios realizados en distintas especies dentro del género *Atriplex* demostraron la capacidad de estas plantas para rehabilitar suelos degradados, y retener metales (Pb y Zn entre otros) en la rizosfera o acumularlos en su biomasa (Jordan *et al.* 2002, Manousaki y Kaloegerakis 2009, Bankaji *et al.* 2019, Kumari *et al.* 2019, Ma *et al.* 2022). Las estrategias más descritas para estas especies indican acumulación en raíces o la translocación y acumulación en la biomasa aérea en niveles muy superiores a las concentraciones del suelo. Por ejemplo, Kachout y colaboradores (2012) determinaron en *A. hortensis* y *A. rosea* una alta tolerancia y acumulación de metales como Cu, Pb, Ni y Zn. Por otro lado, investigaciones llevadas a cabo en plantas del género *Limonium* demostraron la capacidad de ciertas especies para tolerar y acumular en sus raíces y biomasa aérea metales como Cu, Cd, Cu, Zn y Pb, resultando de esta manera útiles para monitorear y remediar ambientes enriquecidos por estos metales (Martínez-Sánchez *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2020). Estudios recientes realizados con *L. brasiliense* indicaron que, en condiciones experimentales, frente al aumento de concentraciones externas de Cu (en combinación con enmienda de compost de algas) o Pb (con y sin adición de sal), esta

especie es capaz de tolerar y retener estos metales en sus raíces (Idaszkin *et al.* 2019, 2023; Gibilisco *et al.* 2020, 2022).

1.3. Los metales y las plantas

Según el requerimiento y la función que desempeñen en los procesos fisiológicos y metabólicos en las plantas, los metales pueden clasificarse como esenciales y no esenciales (Azcón-Bieto y Talón 2000, Sandeep *et al.* 2019). Metales esenciales como el Fe, Cu, Mn, Mo, Ni, Cl, Co y Zn, son requeridos en pequeñas cantidades para llevar a cabo diversas funciones vitales, por lo que se denominan “micronutrientes esenciales” (Nagajyoti *et al.* 2010). Estos desempeñan un papel clave en diversas funciones bioquímicas y fisiológicas, participando en la síntesis y actividad de diversas enzimas, interviniendo en el proceso de fotosíntesis, entre otras (Sidhu *et al.* 2019).

En contraposición, el As, Se, Cd, Hg y Pb no son requeridos para el correcto desarrollo y crecimiento de las plantas, por lo que son considerados metales no esenciales (Sandeep *et al.* 2019). La mayoría de las plantas demuestran ser sensibles a la presencia de metales no esenciales, e incluso a concentraciones elevadas de metales esenciales. Los efectos nocivos de los metales pueden detectarse a diferentes niveles según el grado de daño causado, el metal en cuestión, el tiempo de exposición y el momento del desarrollo de la planta, entre otros factores (Asati *et al.* 2016). El exceso de metales puede causar distintos efectos adversos en las plantas, como la inhibición el crecimiento y la reducción de la tasa de asimilación, respiración y la toma de nutrientes (Gjorgieva Ackova *et al.* 2018, Bharti y Sharma 2022). Además, pueden producir estrés oxidativo afectando distintos procesos fisiológicos y bioquímicos (Ghori *et al.* 2016).

1.3.1. Particularidades del Pb

El Pb se encuentra naturalmente en los suelos en concentraciones promedio de 27 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias 2011). Este metal puede hallarse en forma de ion libre, unido a moléculas inorgánicas (Cl⁻, OH⁻, SO₄⁻², CO₃⁻² y HCO₃) o a compuestos orgánicos (aminoácidos, ácido fúlvico y compuestos húmicos) (Kumar *et al.* 2020). Las elevadas concentraciones registradas en la naturaleza se atribuyen principalmente al enriquecimiento por fuentes antrópicas debido a que es utilizado en la industria como un componente de pinturas, aerosoles, agroquímicos, combustibles y baterías (Wuana y

Okieimen 2011, Asati *et al.* 2016, Zulfiqar *et al.* 2019). También forma parte de municiones y aleaciones con otros metales (Kabata-Pendias 2011).

Más del 80% de la extracción de Pb proviene de minerales o rocas de yacimientos subterráneos, mientras que el 20% restante procede de galerías subterráneas y explotación a cielo abierto (Sindelar 1987). En este sentido uno de los minerales explotados más importantes es la galena (PbS), conocida como Pb brillante, que con frecuencia se encuentra asociado a la blenda o esfalerita (ZnS) (Sindelar 1987, Kabata-Pendias 2011, Wójcik *et al.* 2017). El procedimiento de obtención de Pb conlleva una serie de etapas, que abarcan desde la perforación inicial hasta la detonación de explosivos, la posterior trituración de los minerales, la concentración y purificación (Sindelar 1987). Estas acciones generan una transformación en el entorno paisajístico, provocando cambios en la estructura del suelo y perturbando los ecosistemas junto con la diversidad biológica que habita en ellos (Oyarzun *et al.* 2011). Además, es importante resaltar que estos procesos pueden potencialmente producir la contaminación del suelo, agua y organismos (Aguilar Ruiz *et al.* 2003, Oyarzun *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2018).

El Pb es considerado uno de los elementos más peligrosos, debido a los efectos tóxicos que puede producir en los seres vivos, incluido el hombre (ATSDR 2022, Mitra *et al.* 2022). En particular, este metal no forma parte de los elementos esenciales para las plantas, por lo que resulta tóxico en muy pequeñas concentraciones (Sandeep *et al.* 2019). Los niveles estándares de Pb indican concentraciones menores al 1 mg kg⁻¹ de peso seco, tanto en raíces como en hojas; siendo los límites permisibles 3 mg kg⁻¹ de peso seco (Aziz y Mujeb 2022). La capacidad de absorción de este metal varía entre especies, y depende de su biodisponibilidad y concentración en el suelo (Kabata-Pendias 2011).

El Pb puede ser incorporado desde el aire por las hojas o ser absorbido por las raíces, generalmente en forma pasiva, y luego al unirse a los grupos carboxilo del ácido urónico o a los polisacáridos de la superficie celular de la raíz puede ser retenido en este tejido o ser transportado hacia la biomasa aérea de la planta (Kabata-Pendias 2011, Pourrut *et al.* 2011). La mayor parte del Pb se almacena en las raíces, sin embargo, algunas especies pueden traslocar y acumular una mayor proporción de este metal en su biomasa aérea (Egendorf *et al.* 2020, Mujeeb *et al.* 2021). Aquellas especies que pueden acumular más de 1000 mg kg⁻¹ Pb en su biomasa aérea, en concentraciones superiores a las del suelo,

son consideradas hiperacumuladoras (Van der Ent y colaboradores 2013, Baker *et al.* 2020). Según Zulfiqar y colaboradores (2019) existen al menos 33 especies de plantas con potencial hiperacumulador para el Pb.

La toxicidad por Pb en las plantas se manifiesta mediante signos visibles como clorosis, necrosis, senescencia y pérdida de turgencia debido al déficit de agua (Pourrut *et al.* 2011, Hirve *et al.* 2020). Además, el Pb puede inhibir la germinación, producir efectos negativos en el crecimiento y la producción de biomasa, generar alteración en el proceso fotosintético y en el contenido de pigmentos, y alterar la estabilidad de la membrana plasmática (Zulfiqar *et al.* 2019, Ghori *et al.* 2019, Małkowski *et al.* 2019). Por otro lado, reduce el contenido de nutrientes esenciales y de proteínas, modifica la actividad enzimática y aumenta los niveles de radicales libres, conduciendo en muchas ocasiones a estrés oxidativo (Kabata-Pendias 2011, Duarte *et al.* 2015, Hirve *et al.* 2020).

1.3.2. Particularidades del Zn

El Zn se encuentra en la corteza terrestre en concentraciones medias de 70 mg kg⁻¹, siendo el ion libre (Zn⁺²) la forma más común y móvil en la que se encuentra, pero puede presentarse acomplexado a distintos componentes en soluciones en el suelo, como ZnCl⁺, ZnOH⁺, ZnHCO₃⁺ y Zn(OH)₂, entre otros (Kabata-Pendias 2011). Las concentraciones de este metal en los ecosistemas se han incrementado en forma sustancial debido a que es ampliamente utilizado en la industria como catalizador de diversos productos químicos, en pinturas y tintes, pesticidas, plásticos y caucho. Además, forma parte de aleaciones, baterías y electrodomésticos (Wuana y Okieimen 2011, Kabata-Pendias 2011). Por otra parte, es utilizado por la industria farmacéutica en la elaboración de cosméticos y productos odontológicos (Kumar *et al.* 2020).

Al igual que el Pb, más del 80% de la producción total del Zn proviene de operaciones mineras subterráneas, mientras que del 20% restante, solo un 8% se extrae mediante la explotación de canteras a cielo abierto y un 12% se obtiene a través de la combinación de ambos métodos (SAC 2000). Una vez que se ha extraído de la tierra, el mineral concentrado es sometido a un proceso de calcinación a una temperatura de 950 °C. Tras la oxidación, el Zn se convierte en polvo y se somete a un proceso de lixiviación con ácido sulfúrico diluido. Posteriormente, la solución resultante se neutraliza y los elementos contaminantes son eliminados a través de un proceso de filtración (SAC 2000). En

consecuencia, la minería de este metal puede producir contaminación por productos químicos y metales, degradación ambiental y pérdida de la biodiversidad (Oyarzun *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2018, Hasnaoui *et al.* 2020).

El Zn es considerado un micronutriente esencial para las plantas ya que está asociado a diversos procesos metabólicos (Kaur y Garg 2021). Se estima que los requerimientos esenciales, tanto para raíces como hojas, oscilan entre 15 y 20 mg kg⁻¹ de peso seco, mientras que los límites permisibles no superan los 60 mg kg⁻¹ (Aziz y Mujeb 2022). Una de sus principales funciones, es catalítizar y activar gran variedad de enzimas desempeñando un rol importante durante el desarrollo, la reproducción y la señalización de varios procesos (Balafrej *et al.* 2020). Además, influye en la permeabilidad de la membrana y la estabilidad de algunos los componentes celulares (Nagajyoti *et al.* 2010, Kabata-Pendias 2011). Por otro lado, interviene en la síntesis de enzimas y proteínas involucradas en la síntesis y estabilidad del ADN (Castillo-González *et al.* 2018, Noulas *et al.* 2018). El Zn es indispensable en la fotosíntesis y en el metabolismo de carbohidratos (Tsonev y Cebola Lidon 2012). También interviene en mecanismos de defensa frente a factores de estrés biótico y abiótico (Kabata-Pendias 2011).

Generalmente el ion libre Zn⁺² es la forma comúnmente absorbida por las raíces, implicando gasto de energía. Si bien este proceso puede ser lineal con las concentraciones de Zn en suelo o en la solución, depende también de la especie planta y de las condiciones físico-químicas del medio (Kabata-Pendias *et al.* 2011, Mitra *et al.* 2022). El Zn presenta elevada movilidad en la planta, por vía apoplásto o simplásto, y en su captura, transporte y compartimentalización, están implicados una amplia variedad de transportadores celulares (Kaur y Garg 2020). Una vez dentro puede ser acumulado en vacuolas, cloroplastos, en la base de los tricomas, en el mesófilo de la hoja, en membranas celulares y epidermis de tallos y hojas (Kabata-Pendias *et al.* 2011, Kaur *et al.* 2021). Algunas especies alcanzan los 3000 mg kg⁻¹ de Zn en su biomasa aérea, superando a su vez las concentraciones del medio, por lo que se denominan hiperacumuladoras (Van der Ent *et al.* 2013, Baker *et al.* 2020). En este sentido, Balafrej y colaboradores (2020) señalan que se han identificado aproximadamente 450 especies hiperacumuladoras de Zn, entre ellas, varias especies de la familia de las *Brassicaceae*, exhibiendo concentraciones mayores a 10000 mg/kg.

La toxicidad por Zn se manifiesta en la alteración de distintos procesos bioquímicos, fisiológicos y metabólicos, y en signos como clorosis y disminución del crecimiento y desarrollo, entre otros (Kabata-Pendias 2011, Ghori *et al.* 2019, Balafrej *et al.* 2020, Hirve *et al.* 2020, Kaur *et al.* 2021). Además, puede causar anomalías en el crecimiento y en la elongación celular (Di Baccio *et al.* 2003). Asimismo, la elevada absorción de Zn puede dar lugar a deficiencia de metales como el Fe, Mg, Mn, Cu y otros nutrientes (Kabata-Pendias 2011, Asati *et al.* 2016). Por otro lado, debido a que el Zn cumple un rol importante en la conductancia estomática, concentraciones inapropiadas de este metal pueden modificar la fijación de CO₂ (Sagardoy *et al.* 2010) y producir una reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos y un aumento de la actividad antioxidante (Ivanov *et al.* 2012).

1.4. Biorremediación y fitorremediación

Frente a la necesidad imperante de disminuir las concentraciones de metales del ambiente y con el fin de reducir su impacto en los diversos ecosistemas se han desarrollado una amplia variedad de tecnologías para el tratamiento y/o remediación de los mismos (Azubuike *et al.* 2016, Mosa *et al.* 2016, Khalid *et al.* 2017, Mitra *et al.* 2022). Las técnicas físico-químicas tradicionales de remediación como el lavado de suelo, la vitrificación, la remoción e incineración del suelo, entre otros, producen cambios tanto en la estructura y propiedades del suelo como en la biota. Dichas alteraciones en ocasiones son irreversibles (Khalid *et al.* 2017). En contraposición, la biorremediación surge como una práctica ecológicamente más amigable, menos invasiva y más económica (Ashraf *et al.* 2019, Siingh 2021). Específicamente, la biorremediación consiste en el uso de microorganismos (hongos, bacterias y algas) y/o plantas para degradar, detoxificar, mineralizar o transformar los contaminantes (Azubuike *et al.* 2016, Raza *et al.* 2019, Siingh 2021). La selección del organismo a utilizar y el tipo de proceso empleado dependen de la naturaleza del contaminante (hidrocarburo, agroquímico, agua residual, metales, etc.), del grado de contaminación, del tipo de ambiente, de la localización del contaminante, entre otros (Azubuike *et al.* 2016, Roe y MacFarlane 2022).

En particular, la fitorremediación aprovecha la capacidad que poseen determinadas especies de plantas, para inmovilizar, filtrar, degradar, destruir y volatilizar contaminantes, como ocurre con algunos compuestos orgánicos; o bien absorber y

acumular contaminantes, como sucede con los metales (Negrin *et al.* 2020, Shen *et al.* 2022, Yang *et al.* 2022). Existen diversos tipos de fitorremediación de acuerdo a la interacción metal-planta, entre las que pueden mencionarse la rizofiltración, rizoextracción, fitovolatilización, fitoestabilización y fitoextracción (Negrin *et al.* 2020, Latif *et al.* 2023). Específicamente, cuando las plantas absorben un metal y lo translocan y concentran en su biomasa aérea (tallos, hojas u otras estructuras) pueden actuar como fitoextractoras o fitoacumuladoras. Por el contrario, cuando las plantas inmovilizan el metal en sus tejidos subterráneos o bien inducen su precipitación en la zona de la rizosfera, son utilizadas para fitoestabilizar y prevenir la migración y biodisponibilidad del metal en el ambiente (Ali *et al.* 2013, Mocek-Płóciniak *et al.* 2023).

Respecto a los diferentes procesos de fitorremediación, dependiendo como sea la interacción planta-metal, las especies son clasificadas como: indicadoras, exclusoras o hiperacumuladoras (Ali *et al.* 2013). Por un lado, cuando una planta transloca los metales a sus estructuras aéreas, reflejando de esta manera las concentraciones que hay en el medio que las rodea, se la denomina indicadora (Bonanno *et al.* 2018, Van der Ent *et al.* 2013). Se la denomina exclusora si la planta impide el ingreso del metal por diversos procesos o bloquea su transporte a los órganos aéreos, restringiendo su acumulación a las raíces (Sheoran *et al.* 2011, Ali *et al.* 2013, Oladoye *et al.* 2022). Por último, aquellas especies que poseen un potencial para acumular y concentrar metales en sus estructuras aéreas en niveles muy superiores a las concentraciones del suelo y sin presentar signos de toxicidad, se denominan hiperacumuladoras (Van der Ent *et al.* 2013, Sheoran *et al.* 2016, Oladoye *et al.* 2022).

La efectividad de los procesos de fitorremediación depende de la habilidad de la planta de adaptarse a las condiciones ambientales y de la facilidad para ser cultivada y cosechada (Khalid *et al.* 2017, Pandey y Souza-Alonso 2019). También influyen características propias de la especie como la tasa de crecimiento, la producción de biomasa, la morfología y profundidad del sistema radical. En relación a esto existen en general dos estrategias compensatorias ampliamente utilizadas. La primera consiste en la selección de plantas con una alta capacidad para acumular metales en los órganos aéreos junto con un menor desarrollo en biomasa; mientras que la otra incluye plantas con elevada producción en biomasa y una menor capacidad para concentrar metales (Ali

et al. 2013, Awa y Hadibarata 2020). Además de lo mencionado anteriormente la efectividad depende de la capacidad propia de cada especie para tolerar al/los metal/les en cuestión.

La capacidad de una planta para acumular metales puede ser descrita mediante distintos índices tales como el factor de bioacumulación, de bioconcentración y de translocación (Andrejić *et al.* 2018). Se denomina factor de bioconcentración (FBC) a la relación entre la concentración de determinado metal en la raíz y su concentración en el medio (es decir, en el suelo o solución) (Chan Kee *et al.* 2018); mientras que el factor de bioacumulación (FBA) se corresponde con la relación entre la concentración de metal en la biomasa aérea de la planta respecto a su concentración en el medio (Ghafouri *et al.* 2022). Por último, el factor de translocación (FT) expresa la relación entre la concentración de un determinado metal en la biomasa aérea y su concentración en la raíz (Liang *et al.* 2017b). En relación a los procesos de fitorremediación, las especies de plantas que exhiben un $FBC > 1$ y $FT < 1$ resultan útiles para procesos de fitoestabilización, debido a los niveles de acumulación en la raíz. Cuando presentan valores $FBA > 1$ y $FT > 1$ pueden utilizarse en procesos de fitoextracción, ya que muestran una considerable translocación y acumulación en la biomasa aérea (Ghafouri *et al.* 2022). En relación a esto último, diferentes especies halófitas como *Cressa cretica*, *Suaeda fruticosa*, *Aeluropus lagopoides*, *Halopyrum mucronatum*, *Sporobolus virginicus* y *Atriplex* spp., entre otras, tienen elevado potencial para fitoextraer Pb y/o Zn debido a que presentan $FBA > 1$ y $FT > 1$ (Aziz y Mujeeb 2022). En la Patagonia, la exploración a campo y mediante experimentos, demostró la capacidad de *S. densiflora*, *C. truxillensis*, *S. perennis* y *L. brasiliense* para fitoestabilizar y fitoextraer metales como Fe, Cd, Cu, Zn y Pb (Idaszkin *et al.* 2014, 2015, 2023; Gibilisco *et al.* 2020, 2021).

El empleo de la fitorremediación trae aparejados distintos beneficios para el ambiente y la sociedad ya que es una técnica ecológica y sustentable y requiere de un bajo costo de instalación y mantenimiento. Otro beneficio de esta biotecnología es la doble función que cumplen las plantas en ambientes degradados, donde no solo extraen los metales del medio, sino que además previenen la erosión eólica e hídrica mediante la fijación del suelo, permitiendo la colonización de nuevas especies (Wójcik *et al.* 2014, Pandey y Souza-Alonso 2019, Latif *et al.* 2023). Sin embargo, una de las mayores limitaciones de la

fitorremediación es el periodo de tiempo requerido para completar dicho proceso, desde unos pocos meses (6) a varios años (15) (Ghori *et al.* 2016, Khalid *et al.* 2017, Pandey y Bajpai 2019, Wang y Delavar 2023).

1.5. Biomarcadores

Para evaluar el impacto de la contaminación y la eficacia de las medidas de remediación y recuperación de sitios contaminados se utilizan distintos biomarcadores. Un biomarcador hace referencia a una respuesta medible que indica la condición de un organismo frente a un determinado contaminante y que responde a la concentración del contaminante (WHO 1993, Ferrat *et al.* 2003). Es decir, los biomarcadores reflejan la relación que existe entre el agente xenobiótico y el estado biológico del organismo, y pueden medirse a distintos niveles: molecular, celular, tejidos y órganos (McCarty *et al.* 1996, Lionetto *et al.* 2019).

Los biomarcadores son utilizados como una herramienta de detección temprana de contaminación a nivel de organismo o individuo, antes de que los daños sean trasladados y reportados a nivel de población, comunidad o especie (Lam y Gray 2003, Lionetto *et al.* 2019, Kadim y Risjani 2022). Además, no solo permiten detectar la presencia de un contaminante sino también determinar o estimar la cantidad del mismo, incluso en concentraciones muy bajas (Lionetto *et al.* 2019). En este sentido los biomarcadores contribuyen a las políticas de control de la contaminación al momento de remediar y monitorear un determinado sitio afectado. Idealmente, se espera que el biomarcador sea específico para un contaminante, aunque esto raramente ocurre y que a su vez pueda ser aplicable a diversas especies (Hampel *et al.* 2016, Cazenave *et al.* 2021).

Existen dos tipos de biomarcadores según sean de exposición o de efecto. Los primeros hacen referencia a la detección *per se* del agente xenobiótico, un metabolito o producto de la interacción de éste dentro del organismo; mientras que los biomarcadores de efecto indican por medio de parámetros mensurables, ya sea nivel morfológico, fisiológico, bioquímico, o conductual, las consecuencias biológicas del contaminante (Wójcik *et al.* 2017, Lomartire *et al.* 2021). En general, se utiliza una batería de biomarcadores a nivel individual, lo cual otorga una visión global de lo que ocurre en el organismo (Maresca *et al.* 2018, Idaszkin *et al.* 2019, Lionetto *et al.* 2019, El-Agri *et al.* 2022, Leung *et al.* 2022).

En particular, los biomarcadores de crecimiento y morfológicos son fáciles de medir y proporcionan información valiosa sobre la forma, tamaño, estructura y disposición de distintas estructuras de la planta (Appalasamy *et al.* 2017, Jiang *et al.* 2019, Muro-Gonzalez *et al.* 2020, Krayem *et al.* 2021). Incluyen, el desarrollo en biomasa, la altura, el número de hojas, número de estomas, entre otros (Fodor 2002, Ghori *et al.* 2019). Estos parámetros son ampliamente utilizados en estudios de fitotoxicidad por metales y en diversos estudios se ha demostrado que el enriquecimiento con metales como Pb o Zn puede alterar el estado normal de los mismos (Zulfiqar 2019, Kaur y Garg 2021).

Por otro lado, es sabido que la morfología de las plantas está determinada genéticamente, sin embargo, diversos estudios morfométricos encontraron una relación estrecha entre la variación en forma en varias estructuras anatómicas, como en sépalos, pétalos y hojas y un factor contaminante demostrando que la forma es un carácter plástico (Klisarić *et al.* 2014, Pollicelli *et al.* 2018, Zlatic *et al.* 2023). Particularmente, estudios previos señalan una asociación entre el aumento de las concentraciones de metales Pb, Zn y Cu y la presencia de hojas con formas ahusadas en la especie *Cressa truxillensis* (Pollicelli *et al.* 2018) Por lo tanto, el análisis de la forma de las hojas podría proporcionar información valiosa sobre la interacción de las plantas con el ambiente y su capacidad de adaptación (Nicotra *et al.* 2011). El estudio de estas variaciones morfométricas asociadas a la contaminación puede realizarse mediante la aplicación de la morfometría geométrica (MG) (Vujić *et al.* 2015a, Smith 2016, Pollicelli *et al.* 2018, Idaszkin *et al.* 2019). Este método permite el estudio de las variaciones en la forma pura (*shape*, ver glosario) con gran nivel de detalle (ver Anexo) (Kendall *et al.* 2009). Como dato primario, la MG utiliza las coordenadas cartesianas en x,y (2D) o x,y,z (3D) de puntos homólogos (denominados *landmarks*, ver glosario) que se encuentran en todos los objetos bajo estudio. Una de las ventajas de la MG respecto a la morfometría tradicional (basada en distancias lineales o ángulos entre puntos) es que las variables de forma y del tamaño (*size*, ver glosario) de los organismos se pueden estudiar por separado, debido a que se vuelven independientes luego de realizar una serie transformaciones sobre las coordenadas cartesianas (Bookstein 1997, Adams *et al.* 2004). Además, como a lo largo de los análisis estadísticos se conserva la información geométrica, se pueden visualizar los resultados tanto en magnitud como en la dirección del cambio en forma a través de distintos métodos gráficos como grilla de deformación,

lollipop y *wireframe* (ver glosario) (Zelditch *et al.* 2004). Sobre la base del uso de la MG, se ha postulado a la forma de la hoja como un biomarcador temprano de estrés (Klisarić *et al.* 2014; Smith 2016; Pollicelli *et al.* 2018; Idaszkin *et al.* 2019, 2023).

Asimismo, los biomarcadores fisiológicos y bioquímicos son ampliamente utilizados por su grado de sensibilidad y se enfocan en los procesos y funciones internas de las plantas (Krayem *et al.* 2021). En este contexto, es fundamental considerar que diferentes factores regulan e intervienen el ingreso y la salida de agua de una planta (Barceló y Poschenrieder 1990). En relación con esto, existe evidencia de que niveles fitotóxicos de metales como Cd, Cr, Ni, Hg, Al, Zn y Pb disminuyen el contenido de agua en la planta (Hirve *et al.* 2020, Małkowski *et al.* 2019). Algunos mecanismos descritos incluyen el bloqueo o cambio en la conductividad de acuaporinas, lo que produce cambios en la permeabilidad de las membranas, cambios en el equilibrio osmótico, modificación de diversos factores que intervienen en la absorción de agua por las raíces y disminución en la conductancia estomática y en la tasa de transpiración (Barceló y Poschenrieder 1990, Małkowski *et al.* 2019).

Por otro lado, los procesos relacionados a la generación de energía necesaria para el crecimiento y desarrollo de las plantas pueden ser modificados por diversos factores estresantes (Krayem *et al.* 2021, Benavides-Mendoza y Francisco-Francisco 2023). En este sentido, se ha demostrado que la alteración estructural y funcional del aparato fotosintético produce la disminución en la concentración de pigmentos y en la eficiencia fotosintética junto a un aumento de la fotorrespiración (Rai *et al.* 2016, Souri *et al.* 2019). Los pigmentos clorofilas y carotenoides, contenidos en las membranas de los cloroplastos, son los responsables de absorber la luz. Estos se encuentran asociados con proteínas formando complejos supramoleculares llamados fotosistema I y II. Cuando una molécula de clorofila es excitada por la luz, la energía absorbida puede ser disipada durante tres procesos competitivos entre sí: fotoquímico, fluorescencia y disipación térmica (Benavides-Mendoza y Francisco-Francisco 2023). Si bien en condiciones normales el proceso fotoquímico es muy eficiente, frente a situaciones de estrés o alta luminosidad este proceso se vuelve menos eficiente. En estos casos, la energía contenida en el excitón (cuasipartícula proveniente del fotón) debería ser transformada en energía química contenida en los enlaces de la molécula Nicotinamida Adenina Dinucleotido

Fosfato reucida (NADPH). Por el contrario, si el excitón se transforma nuevamente en fotones de longitud de onda mayor que el fotón original y estos son reemitidos por el aparato fotoquímico, se produce lo que se conoce como fluorescencia (Tambussi y Graciano 2010). Además, durante este proceso puede producirse radiación o disipación térmica. De este modo, mientras mayores sean estas emisiones (fluorescencia y calor) menor será la eficiencia del proceso fotoquímico en transformar la energía de la luz en potencial reductor. Por lo tanto, los parámetros relacionados a la fluorescencia de la clorofila, los cuales indican la eficiencia del proceso fotoquímico y son altamente sensibles frente a procesos de estrés, se utilizan frecuentemente como biomarcadores para medir el impacto de los contaminantes (Benavides-Mendoza y Francisco-Francisco 2023). En relación a esto, diversos estudios encontraron que la presencia de metales como Cd, Cu, Pb y Zn, entre otros, producen una disminución de la concentración de pigmentos y aumento en la fluorescencia de la clorofila. Esto se debe a que pueden unirse a diversos sitios del fotosistema II, afectando la estructura del cloroplasto y la cadena transportadora de electrones, así como interferir en la síntesis y degradación de los pigmentos (Fodor 2002, Costa *et al.* 2018, Ghori *et al.* 2019, Krayem *et al.* 2021).

Frente a diversos tipos de estrés, las plantas pueden producir un aumento de radicales libres o ROS por sus siglas en inglés “*reactive oxygen species*” (Hampel *et al.* 2016, Munne-Bosch y Pinto-Marijuan 2016, Maurya 2020). Un radical libre es una especie química, átomo o molécula, que posee un electrón desapareado, por lo cual resulta altamente reactivo y al acumularse es dañino para los componentes celulares y moléculas de importancia biológica como el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos (Munne-Bosch y Pinto-Marijuan 2016). En las plantas el exceso de metales puede generar directa o indirectamente ROS (Dietz *et al.* 1999, Bankaji *et al.* 2019). Como resultado de estos procesos el O₂ puede reducirse a radical hidroxiperoxilo (HO₂*-), radical superóxido (O₂*-), radical hidroxilo (OH*) y/o peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Hampel *et al.* 2016, Munne-Bosch y Pinto-Marijuan 2016). Entre ellos, los primeros dos radicales poseen una vida media corta y no son fácilmente difusibles por las membranas, sin embargo, son altamente reactivos frente a otras moléculas y pueden oxidar aminoácidos como histidina, metionina y triptófano. Mientras que el último, tiene una vida media más larga y se ha demostrado que oxida grupos tiol (-SH). Por su parte, el radical hidroxilo (OH*)

posee una alta radiactividad frente a moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Munne-Bosch y Pinto-Marijuan 2016).

En respuesta al incremento de las ROS, las plantas halófitas han desarrollado un complejo sistema antioxidante, el cual les permite sobrevivir a elevadas concentraciones salinas reduciendo los efectos nocivos y manteniendo las condiciones internas equilibradas o estables (Lutts y Lefèvre 2015, Singh *et al.* 2023). Este sistema de defensa emplea mecanismos no enzimáticos y enzimáticos, que actúan sinérgicamente para disminuir la concentración de ROS (Mittler 2002, Pirzadah *et al.* 2020). Los mecanismos no enzimáticos comprenden la producción de: glutatión, ácido ascórbico, prolina, compuestos fenólicos, carotenoides y flavonoides, fitoquelantinas y metalotioninas; mientras que los enzimáticos incluyen cambios en la actividad antioxidante de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), entre otras (Munne-Bosch y Pinto-Marijuan 2016, Maurya 2020, Iqbal *et al.* 2020, Peng *et al.* 2022). En cuanto a la respuesta enzimática, el primer mecanismo de defensa involucra a la enzima SOD, la cual actúa frente al radical superóxido O_2^{*-} convirtiéndolo en moléculas menos dañinas como H_2O_2 y O_2 (Fig. 1.5.1). Luego, mediante la actividad de peroxidasas y catalasas (APx, GPx y CAT) el peróxido puede ser transformado en moléculas menos nocivas como el H_2O y O_2 (Fig. 1.5.1). (Thakur *et al.* 2017, Usman *et al.* 2020, Arora *et al.* 2021).

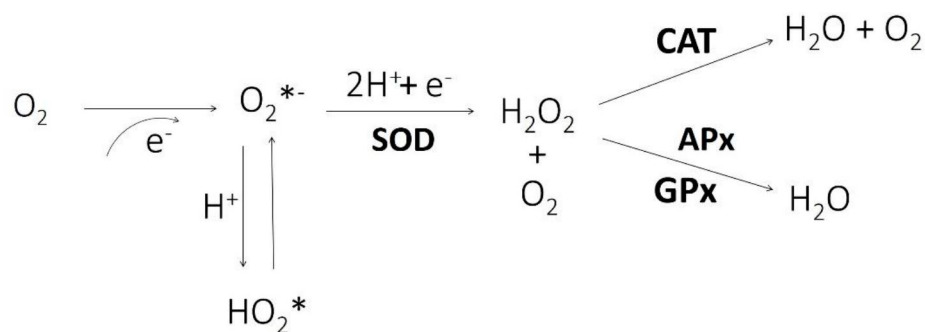


Figura 1.5.1: Ruta de detoxificación de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células vegetales. El superóxido (O_2^{*-}) es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente el H_2O_2 es descompuesto en agua (H_2O) y O_2 por la enzima catalasa (CAT), o reducido a agua por las enzimas peroxidasas: ascorbato peroxidasa (APx) y guaiacol peroxidasa (GPx).

Finalmente, cuando la producción de radicales libres supera la capacidad antioxidante, es decir, hay un desbalance entre los mecanismos de defensa y las ROS, se produce estrés

oxidativo y en consecuencia daño celular (Tsikas 2017). Uno de los principales blancos en los cuales actúan las ROS son los lípidos que componen las membranas biológicas, dando como resultado de este proceso la peroxidación lipídica y conduciendo en algunos casos a la lisis y muerte celular (Yin *et al.* 2011, Hampel *et al.* 2016). Este proceso complejo implica la formación y propagación de radicales lipídicos, la captación de oxígeno, el reordenamiento de los dobles enlaces en los lípidos insaturados y la eventual destrucción de los lípidos de membrana (Yin *et al.* 2011). Una forma indirecta de medir este daño es cuantificando la producción de malondialdehído (MDA), el producto final de la peroxidación lipídica. A esta medición se la conoce también con el nombre de *TBARS*, por sus siglas en inglés “*thiobarbituric reactive substances*”, el cual reacciona con el MDA produciendo una sustancia colorida cuantificable espectrofotométricamente (Tsikas 2017, Morales y Munné-Bosch 2019). Como se ha registrado en diversas especies de plantas frente a la exposición a metales (como Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn), el aumento en los valores de este marcador indica estrés oxidativo y daño de membranas (Dey *et al.* 2007, Kaur *et al.* 2015a, Singh *et al.* 2015, Małkowski *et al.* 2019).

1.6. Índice de Respuesta Integrada

Como se explicó en la sección anterior, en las prácticas de monitoreo es importante el uso conjunto de diversos tipos de biomarcadores que sean complementarios y que ofrezcan una visión global de la respuesta del organismo frente al agente xenobiótico (Lomartire *et al.* 2021). Sin embargo, la interpretación y el análisis de toda la información capturada puede ser una tarea compleja. Por esta razón, resulta útil resumir toda la información obtenida mediante el uso de índices integradores que reflejen numérica y/o gráficamente la susceptibilidad a los contaminantes y permitan evaluar y comparar el grado de contaminación entre diferentes sitios, épocas o tratamientos (El-Agri *et al.* 2022, Magara *et al.* 2022, Si *et al.* 2016). En este sentido, Sanchez y colaboradores (2013) desarrollaron el índice *IBRv2*, por las siglas en inglés de “*Integrated Biological Response Versión 2*”, como una alternativa para evitar los problemas que enfrentaba el índice *IBR* (*Integrated Biological Response*) inicialmente propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002). El índice *IBRv2* integra, en un solo valor, biomarcadores basados en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. A diferencia del *IBR*, su cálculo es independiente del arreglo espacial de los biomarcadores en el gráfico de estrella y muestra la inducción o inhibición de cada biomarcador en relación con un control o nivel basal. De esta manera

el *IBRV2* se basa en el concepto de desvío y su valor resulta de la suma de las desviaciones entre el control y los tratamientos (ver Anexo) (Sanchez *et al.* 2013).

1.7. Importancia de esta tesis en el marco teórico establecido

Comprender como es la interacción entre las plantas y los metales proporciona una visión del potencial fisiológico que poseen las distintas especies de plantas para tolerar y acumular estos elementos. Esto adquiere una importancia crucial al momento de abordar la eliminación, reducción y monitoreo de la contaminación generada por los metales. Además, el empleo de técnicas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas, resultan de gran utilidad a la hora de caracterizar la tolerancia de las diferentes especies a los metales, sin la necesidad de tener que realizar costosos análisis de concentraciones de metales, tanto en la biomasa vegetal como en el suelo, brindando información sobre el efecto que estos contaminantes producen en las plantas. Asimismo, permiten monitorear de forma rápida, continua y no destructiva los efectos deletéreos de la contaminación. Por otro lado, es importante el conocimiento sobre especies nativas como potenciales fitoremediadoras. En este sentido, el estudio de especies nativas y en particular de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* como potenciales especies remediadoras de metales aún requiere de esfuerzos de investigación. Dentro de este marco, los resultados obtenidos en esta tesis ofrecen información útil en el campo de la bioremediación, sirviendo como base para el establecimiento de estrategias efectivas de restauración y conservación de las marismas y otros ambientes contaminados por estos metales.

1.8. Objetivo general

Evaluar el uso de distintas respuestas ecofisiológicas y morfométricas como biomarcadores de contaminación en dos especies de plantas de marismas patagónicas, específicamente *L. brasiliense* y *A. vulgatissima*, expuestas a diferentes concentraciones de Pb y Zn, y determinar la capacidad de estas especies de extraer y acumular estos metales en sus tejidos.

1.8.1. Objetivos específicos, hipótesis y predicciones

- I. Cuantificar y comparar la acumulación de Pb y Zn en la biomasa aérea y radical de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a diferentes concentraciones de dichos metales de manera individual, y evaluar la tolerancia de cada especie a través de parámetros de crecimiento y distintas respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas asociadas al aumento en las concentraciones individuales de Pb y Zn.

A partir de este objetivo se plantean 3 hipótesis con sus predicciones derivadas:

Hipótesis 1a: La concentración de Pb y Zn en los tejidos de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* se corresponde con la cantidad de Pb o Zn añadida a la solución de riego.

Predicción 1a: La concentración de Pb y Zn aumentará en los tejidos de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* conforme incrementa individualmente la concentración de Pb y Zn adicionados a la solución de riego.

Hipótesis 1b: Las variables de crecimiento, bioquímicas y fisiológicas utilizadas reflejan en *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* el efecto producido por el incremento individual de Pb y Zn adicionados a la solución de riego.

Predicción 1b: Las variables de crecimiento, bioquímicas y fisiológicas utilizadas reflejarán mayor estrés en las plantas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a concentraciones individuales más elevadas de Pb y Zn en la solución de riego.

Hipótesis 1c: Existe variación morfológica de las hojas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* asociada a la concentración de Pb o Zn.

Predicción 1c: Las hojas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* de aquellos tratamientos con mayor concentración de Pb o Zn presentarán formas lanceoladas con pecíolos alargados.

- II. Cuantificar y comparar la acumulación de Pb y Zn en la biomasa aérea y radical de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a diferentes concentraciones combinadas de Pb y Zn, y evaluar la tolerancia de cada especie a través de parámetros de crecimiento y distintas respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas asociadas al aumento combinado de dichos metales.

Hipótesis 2a: La concentración de Pb y Zn en los tejidos de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* depende de los efectos de la interacción entre estos metales cuando se los aplica de manera conjunta a la solución de riego.

Predicción2a: La concentración de Pb y Zn en los tejidos de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* será menor a cuando se los aplican en la solución de riego de manera conjunta.

Hipótesis 2b: Las variables de crecimiento, bioquímicas y fisiológicas utilizadas reflejan en *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* el efecto producido por la presencia conjunta del Pb y Zn adicionados en solución de riego.

Predicción 2b: Las variables de crecimiento, bioquímicas y fisiológicas utilizadas reflejarán mayor estrés en las plantas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a concentraciones más elevadas de Pb y Zn cuando son añadidos de forma combinada en la solución de riego.

Hipótesis 2c: Existe variación morfológica de las hojas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* asociada a la presencia simultánea de Pb y Zn.

Predicción 2c: Las hojas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* de aquellos tratamientos con mayores concentraciones de Pb y Zn presentarán formas más lanceoladas con pecíolos alargados.

CAPÍTULO

Metodología general



2.1. Recolección de semillas y germinación

Para recolectar las semillas de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* se seleccionó la marisma de Riacho (42° 25' S, 64° 37' O), localizada en la Reserva Natural Península Valdés, Chubut, (Fig. 2.1). Dicha marisma fue nombrada sitio RAMSAR en el año 2012 debido a su importancia ecológica y con el objeto de preservar su biodiversidad (Ramsar 2012, Bertiller *et al.* 2017). La marisma de Riacho presenta muy bajo impacto antrópico debido a que la población humana asentada en las costas del Golfo San José se limita a unas pocas familias cuya actividad principal es la pesquería artesanal (Santa Ana 2004, Lompré *et al.* 2020). Por otro lado, las concentraciones pseudototales de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en el suelo de esta marisma indicaron escasa contaminación y estar asociadas a un origen natural (Idaszkin *et al.* 2012). Las semillas de ambas especies fueron colectadas en abril del 2018 y se conservaron en oscuridad a 4 °C hasta el momento de la germinación. Cabe destacar que la germinación y el posterior desarrollo de los experimentos de incremento individual y combinado de Pb y Zn, se realizaron bajo las mismas condiciones para ambas especies, durante el año 2019 para *L. brasiliense* y en el 2020 para *A. vulgatissima*.

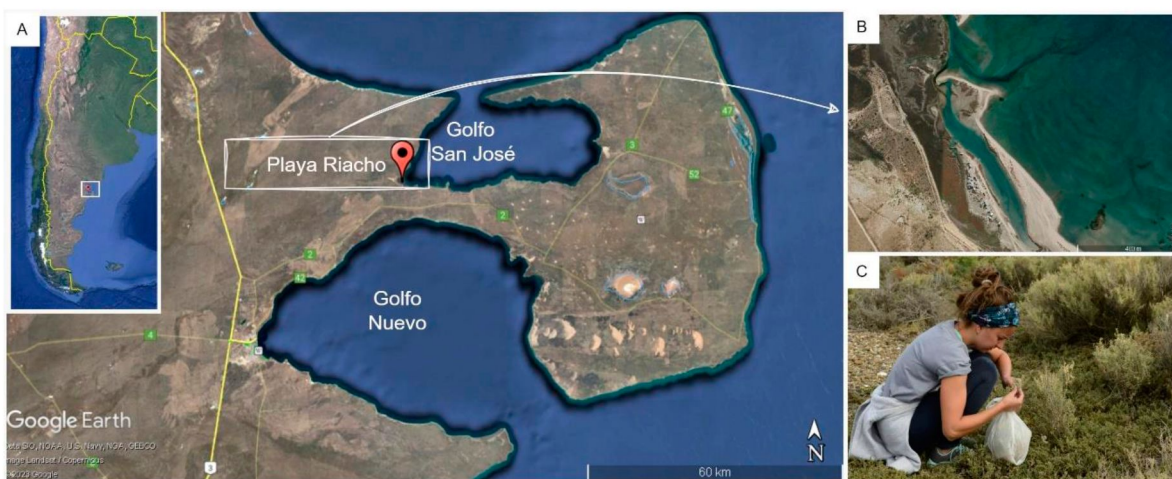


Figura 2.1: (A) Sitio de recolección de semillas de *A. vulgatissima* y *L. brasiliense* en Marisma Riacho. (B) Vista aérea de la marisma. (C) Foto al momento de la colecta de semillas de *A. vulgatissima*.

Las semillas se germinaron en placas de Petri con papel filtro (Fig. 2.2 A y B) y agua destilada, en cámara de cultivo simulando fotoperíodo y temperaturas promedio de primavera en la zona de recolección, es decir alternando períodos de luz de 16 h a 25 °C con períodos de oscuridad de 8 h a 12 °C y con humedad relativa promedio de 50-60% (Gul *et al.* 2013). Ocurrida la germinación las plántulas se trasplantaron a germinadores con perlita como sustrato hasta el momento en que las plántulas con dos o mas hojas verdaderas alcanzaron entre 3 y 5 cm de altura (Fig. 2.2 C, D y E), momento en el cual se

transplantaron a macetas individuales con perlita (Fig. 2.4 A) (Idaszkin *et al.* 2019). Cabe mencionar que se seleccionó un sustrato inerte para lograr que los metales adicionados en la solución de riego estén biodisponibles para poder evaluar su efecto evitando las interferencias que podría introducir *per se* la heterogeneidad propia del suelo. Durante la etapa de crecimiento las plantas se regaron con solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon 1938).

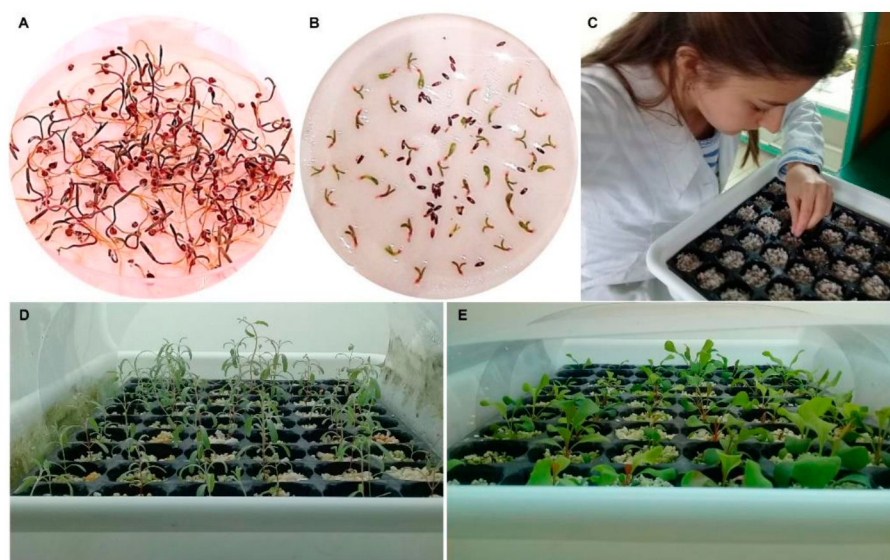


Figura 2.2: Semillas y plántulas de (A) *A. vulgatissima* y (B) *L. brasiliense*. (C) Trasplante de plántulas a bandejas germinadoras. Plántulas de (D) *A. vulgatissima* y (E) *L. brasiliense* en estado avanzado de crecimiento

Previo al inicio de cada experimento se cosecharon 10 plantas de cada especie, las cuales fueron divididas en tejidos aéreos y subterráneos, se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se secaron a 45 °C hasta alcanzar peso constante. Este peso fue registrado como peso seco inicial (PS_1), para posterior cálculo del crecimiento relativo (ver sección 3.1).

2.2. Experimentos de estrés en cámara de cultivo

Los experimentos se iniciaron luego de seis meses de aclimatación y crecimiento para las plantas de la especie *L. brasiliense*, y luego de doce meses para *A. vulgatissima*, de modo que las plantas poseían un desarrollo en biomasa que permitía determinar las variables respuestas propuestas.

2.2.1. Experimentos de estrés por incremento individual de Pb o Zn

Para evaluar el efecto del Pb y Zn de manera individual sobre *L. brasiliense* y *A. vulgatissima*, se realizaron cuatro experimentos con tres tratamientos cada uno, resultantes del incremento individual de Pb o Zn para cada especie (Fig. 2.3). En el experimento con Pb se utilizó: un tratamiento control (0 μM Pb) y dos concentraciones crecientes, una de 50 μM Pb (10,38 mg/L) y otra de 100 μM Pb (20,78 mg/L). Para el experimento del incremento de Zn se utilizó: un tratamiento control (con la mínima concentración de Zn contenida en la solución Hoagland) y dos concentraciones crecientes, una de 100 μM Zn (6,52 mg/L) y la otra de 200 μM Zn (13,05 mg/L) (Fig. 2.3). Para formar la solución de riego se adicionó a la solución Hoagland la cantidad apropiada de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, según el tratamiento (Fig. 2.4). Los tratamientos fueron asignados al azar a 5 bandejas (de 10 cm de profundidad y 40 cm largo) las cuales contenían 10 macetas cada una, también asignadas aleatoriamente (Fig. 2.4). Iniciado el experimento se regó semanalmente con 1 L de solución de riego y se registró el nivel en la bandeja (aproximadamente 2 cm). Este nivel se mantuvo constante a lo largo del experimento entre riegos, mediante el agregado de solución Hoagland en la bandeja, con el objeto de evitar cualquier variación en la concentración de metales debido a la evaporación. Además, en cada riego se intercambié la posición de las plantas en la bandeja y se realizó una rotación aleatoria de las bandejas dentro de la cámara. El pH de la solución fue monitoreado y ajustado a 6,5. La solución de riego se renovó semanalmente en su totalidad durante la duración del experimento, la cual fue de 35 días ($t= 35$) para *L. brasiliense* y de 42 días ($t= 42$) para *A. vulgatissima*.

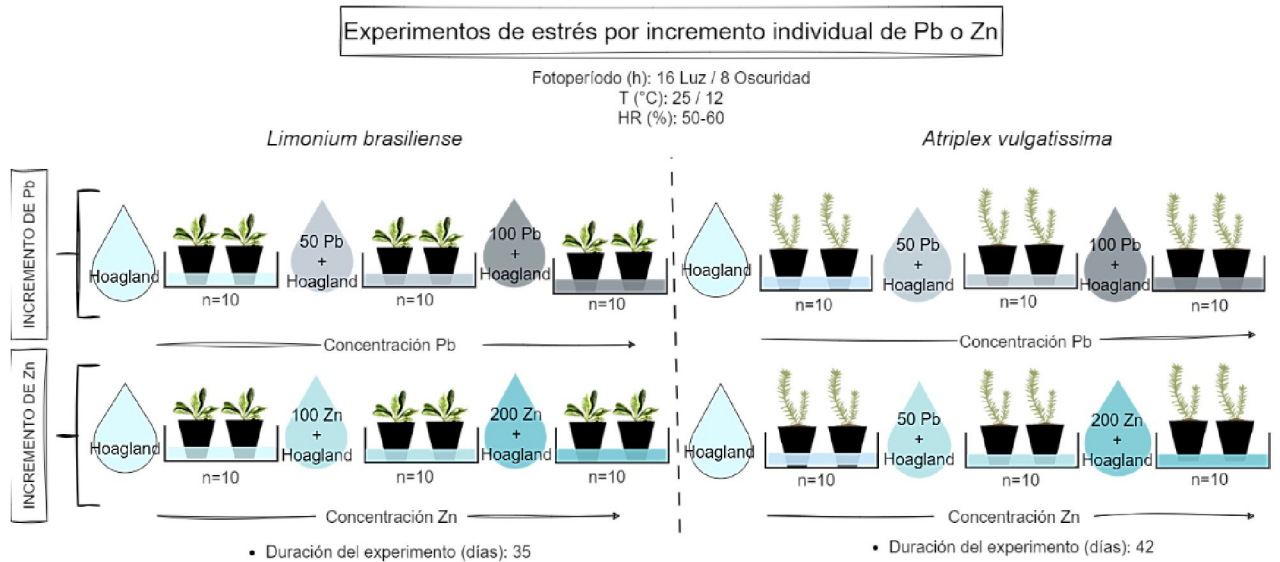


Figura 2.3: Representación esquemática del diseño experimental para evaluar el efecto individual del incremento de Pb y Zn en (izquierda) *L. brasiliense* y (derecha) *A. vulgatissima*.

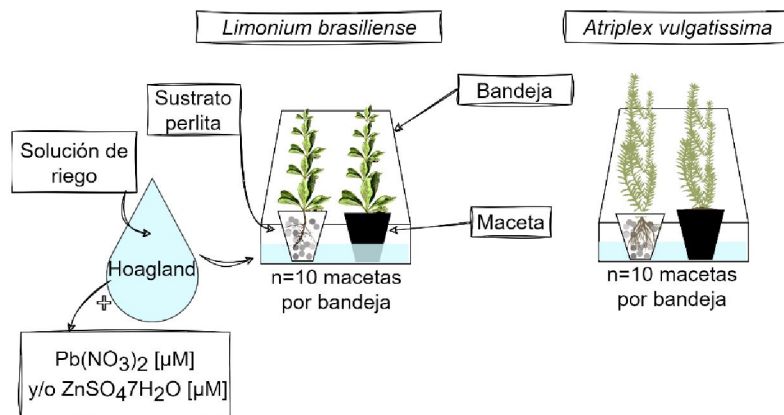


Figura 2.4: Detalle de la bandeja de un tratamiento tipo de cada uno de los experimentos para *L. brasiliense* (izquierda) y *A. vulgatissima* (derecha).

2.2.2. Experimentos de estrés por efecto combinado de Pb y Zn

Para evaluar el efecto combinado del incremento de Pb y Zn en *L. brasiliense* y *A. vulgatissima*, se realizó un experimento para cada especie. Los experimentos consistieron en nueve tratamientos resultantes de la combinación de las concentraciones individuales de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y Zn (0, 100 y 200 μM Zn). Los mismos se correspondieron a un control (0 μM Pb), 50 μM Pb, 100 μM Pb, 100 μM Zn, 200 μM Zn, 50 μM Pb + 100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 μM Pb + 200 μM Zn, 100 μM Pb + 200 μM Zn. Los tratamientos fueron asignados al azar a nueve bandejas con 10 macetas cada una, asignadas aleatoriamente (Fig. 2.4, Fig. 2.5, Fig. 2.6 y Fig. 2.7). Al igual que en los experimentos anteriormente descritos, al inicio se regó con 1 L de la solución de riego y

se registró el nivel en la bandeja (aproximadamente 2 cm). La solución de riego consistió de solución Hoagland y la cantidad apropiada de $Pb(NO_3)_2$ y $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. El pH de la solución fue monitoreado y ajustado a 6,5. Cada bandeja se regó semanalmente con 1 L de la solución de riego correspondiente según el tratamiento, procurando mantener el nivel constante entre riegos. Además, en cada riego se intercambió la posición de las macetas en la bandeja y se realizó una rotación aleatoria de las bandejas dentro de la cámara como se mencionó en la sección 2.2.1.

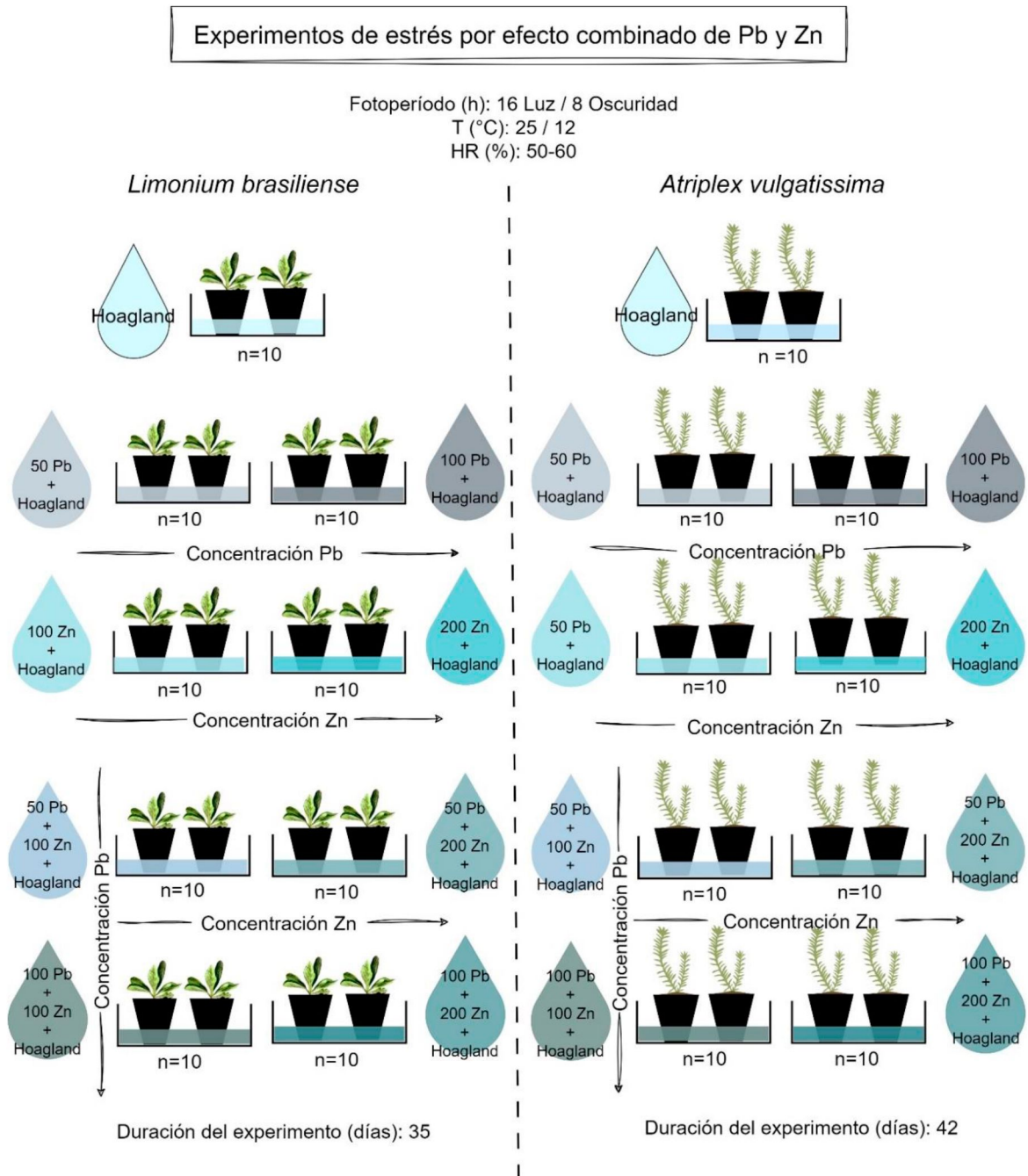


Figura 2.5: Representación esquemática del diseño experimental para evaluar el efecto del incremento combinado del de Pb y Zn en (izquierda) *L. brasiliense* y (derecha) *A. vulgatissima*.

Cabe mencionar que la elección de los metales a manipular (Pb y Zn), estuvo motivada por resultados preliminares que muestran incrementos de los niveles de estos metales en suelos de marismas patagónicas, los cuales son absorbidos por la vegetación presente (Idaszkin *et al.* 2014, 2015, 2017; Pollicelli *et al.* 2018). Asimismo, las concentraciones seleccionadas se basaron en los niveles de metales biodisponibles detectados para dichas marimas y en otros trabajos previos (Sagardoy *et al.* 2009, Wu *et al.* 2013, Dresler *et al.* 2017, Pollicelli *et al.* 2018, Idaszkin *et al.* 2019). Por otro lado, la elección de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* se basó en la capacidad de estas especies de habitar ambientes estresantes como los de la marisma, en el alto porcentaje de germinación, crecimiento y desarrollo en biomasa de ambas especies, y en la anatomía de las hojas, la cual permite que sean estudiadas mediante el uso de la morfometría geométrica.

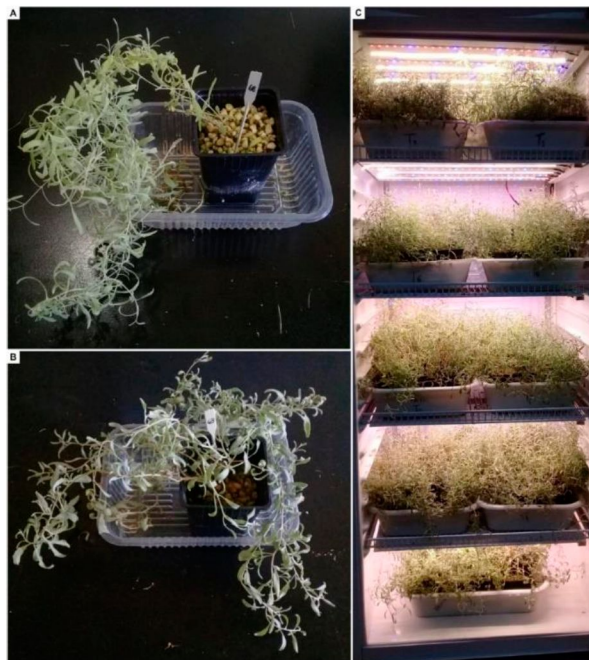


Figura 2.6: Plantas de *A. vulgatissima* (A, B) en macetas individuales. (C) Plantas de *A. vulgatissima* al inicio experimento.



Figura 2.7: (A) Trasplante de *L. brasiliense* a macetas individuales. (B, C) Distribución aleatoria de macetas en bandejas y posterior asignación de los tratamientos. (D) Plantas de *L. brasiliense* al inicio del experimento.

2.3. Determinaciones de variables respuesta al finalizar cada experimento

2.3.1. Determinación de la concentración de metales Zn y Pb

Al finalizar los experimentos, se cosecharon las plantas de todos los tratamientos, se lavaron con agua destilada, se separaron en biomasa aérea y radical, se pesaron para determinar el peso húmedo y luego se secaron para el cálculo de las variables de crecimiento (ver a continuación sección 2.3.2). Posteriormente, el material seco de 5 plantas seleccionadas al azar, se trituró y homogeneizó utilizando un mortero (Fig. 2.8A y B) ($n= 5$ de biomasa radical y $n= 5$ de biomasa aérea). Luego se separó una alícuota de 0,5 g por muestra la cual fue digerida con 10 ml de ácido nítrico concentrado (Merck) en digestor microondas (*NovaWAVE SA*) a 180 °C durante 10 min (Fig. 2.8 C, D y E). A continuación, cada tubo se enrasó a 45 ml con agua ultrapura (tipo Mili-Q) y se homogenizó la solución siguiendo el método normalizado EPA 3052 (USEPA 1996). Cada muestra se almacenó en frascos individuales y se conservó en heladera hasta su medición (aproximadamente 30 días). La determinación de los metales se realizó mediante Espectrometría Óptica de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES Agilent 720) (Fig. 2.8 F). La calidad de los datos analíticos se aseguró mediante estudios de precisión y exactitud, utilizando materiales de referencia certificados, siguiendo la metodología EPA 200.7 (USEPA 1994).



Figura 2.8: Diferentes etapas en la extracción ácida para la determinación de metales. (A, B) Trituración de la biomasa aérea y radical. (C) Pesaje de biomasa aérea y raíz y colocación en tubos. (D) Homogenización de la muestra vegetal con el ácido. (E) Tubos luego de la digestión ácida en horno microondas. (F) Determinación de metales en ICP-OES.

2.3.1.1. Factor de Bioconcentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación

Para evaluar la eficiencia de la acumulación de los metales, se calculó el factor de bioconcentración (FBC), el de bioacumulación (FBA) y el de translocación (FT), definidos como: $FBC = \frac{\text{concentración de metal en la raíz}}{\text{concentración de metal en la solución}}$, $FBA = \frac{\text{concentración de metal en la biomasa aérea}}{\text{concentración de metal en la solución}}$ y $FT = \frac{\text{concentración de metal en la biomasa aérea}}{\text{concentración de metal en la raíz}}$, respectivamente (Ghori *et al.* 2016, Chan Kee *et al.* 2018, Ghafouri *et al.* 2022,).

2.3.2. Variables de Crecimiento

Como se indicó en la sección anterior (2.3.1), una vez finalizado cada experimento, se cosechó la biomasa vegetal de las macetas que componían cada tratamiento (n= 10 plantas por tratamiento de cada experimento). Las plantas se lavaron cuidadosamente con agua destilada para remover la perlita, se separaron biomasa radical y aérea y se pesaron para registrar el peso húmedo (PH). Posteriormente, ambos órganos se secaron a 45 °C hasta alcanzar peso constante y se determinó el peso seco (PS₂), para el posterior cálculo de la biomasa y el crecimiento relativo. La biomasa aérea fue estimada mediante

el PS₂ y el cálculo del crecimiento relativo (CR) se realizó mediante la ecuación $(\ln PS_2 - \ln PS_1) / t$, donde t se corresponde a la duración del experimento en días y PS₁ con el peso seco aéreo promedio de las 10 plantas cosechadas antes de iniciar el experimento (ver sección 2.1). Cabe mencionar que en el cálculo de las variables de crecimiento no se tuvo en cuenta la biomasa cosechada para las determinaciones bioquímicas.

2.3.3. Variables Fisiológicas

Para cada planta (n= 10 plantas por tratamiento de cada experimento) se determinó el contenido de agua (CA) en la biomasa aérea como: $CA (\%) = (PH - PS_2) / PH * 100$, donde PH representa el peso húmedo y PS₂ el peso seco de la biomasa aérea de cada tratamiento (Jin *et al.* 2017).

Al finalizar los experimentos y previo a la cosecha de hojas para los análisis de las otras variables respuesta evaluadas, se midió la fluorescencia de la clorofila (n= 10 plantas por tratamiento de cada experimento; 1 hoja por planta) mediante el uso de un fluorímetro portátil FluorPen FP100 (*Photon Systems Instruments, Drasov, Republica de Czech*). Este equipo permite medir rápidamente el rendimiento cuántico del fotosistema II, otorgando los valores de la eficiencia del fotosistema II ($\Phi_{psII} = (F'_m - F'_o) / F'_m$) en plantas adaptadas a la luz (30 min), donde F'_m y F'_o se corresponden a la fluorescencia máxima y a la fluorescencia mínima en hojas iluminadas con luz roja lejana; y de la eficiencia máxima del fotosistema II ($Q_y = F_m - F_o / F_m$) en plantas adaptadas a la oscuridad (30 min) (Maxwell y Johnson 2000, Tambussi y Graciano 2010), donde F_m y F_o se corresponden a la fluorescencia máxima y mínima, respectivamente (Fig. 2.9).



Figura 2.9: Momento previo a la medición de la fluorescencia de la clorofila en las plantas de *L. brasiliense* expuestas 30 min a la luz solar.

2.3.4. Variables Bioquímicas

Al final de los experimentos, previo a la cosecha de la biomasa total de las plantas, se seleccionaron al azar plantas de cada tratamiento de las cuales se extrajeron 0,7 g de hojas frescas (n= 5 plantas por tratamiento de cada experimento), que luego se fijaron en N₂ líquido y se almacenaron (a - 80 °C) en bolsas separadas según la determinación específica: 0,1 g para el análisis de pigmentos, 0,3 g para evaluación de la actividad enzimática y 0,3 g para determinación del daño a las membranas. Cabe mencionar que dicha biomasa cosechada no fue incluida en los cálculos de biomasa aérea.

Para la extracción, purificación y cuantificación de pigmentos fotosintéticos 0,1 g de tejido foliar se liofilizaron por 48 h en condiciones de oscuridad para evitar la fotodegradación de los pigmentos y luego se registró el peso seco. Posteriormente se homogeneizó cada muestra vegetal en 10 ml de acetona al 80% y se almacenó durante 1 h a 4 °C (Fig. 2.10 A). Luego cada homogenato fue centrifugado durante 10 min a 5000 rpm para luego colectar el sobrenadante y determinar la absorbancia mediante el uso de espectrofotómetro a 470, 647 y 663 nm (Fig. 2.10 B). Los cálculos para la cuantificación de clorofila a, clorofila b, y carotenoides se realizaron aplicando las fórmulas de Lichtenthaler (1987).

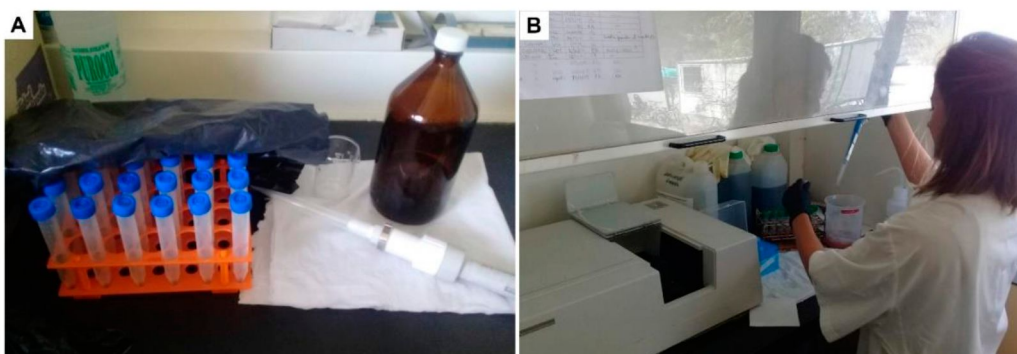


Figura 2.10: (A) Proceso de extracción y (B) determinación de pigmentos fotosintéticos.

Para la determinación de la actividad enzimática 0,3 g de tejido foliar se homogenizaron en 8 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,6), conteniendo 1mM EDTA (Fig. 2.11 A). Luego los homogenatos fueron centrifugados a 8923 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante fue subdividido en alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos Eppendorf y conservadas en ultrafreezer (-80 °C) hasta el momento de la preparación de los medios de reacción para las determinaciones enzimáticas (Fig. 2.11 B, C y D).

La determinación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se realizó utilizando la técnica de Marklund y Marklund (1974) monitoreando la reducción del pirogalol a 325 nm durante 60 s con una lectura cada 10 s. La mezcla de reacción contenía 550 μL de buffer fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0), 360 μL de agua de calidad MiliQ, 80 μL de pirogalol (3 mM) y 10 μL of extracto vegetal.

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APx) se determinó según Tiryakioglu y colaboradores (2006) siguiendo la disminución de la absorbancia a 290 nm durante 60 s con una lectura cada 5 s. La mezcla de reacción contenía 2,72 μL de H_2O_2 , 100 μL del extracto enzimático, 2 mM, 894 μL de buffer fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0) y 2,5 μL de L-ascorbato.

La actividad de la enzima guaiacol peroxidasa (GPx) se determinó según Bergmeyer y colaboradores (1974) siguiendo la disminución de la absorbancia a 470 nm durante 60 s con una lectura cada 5 s. La mezcla de reacción contenía 200 μL de guaiacol 20 mM y 800 μL de solución obtenidos a partir una mezcla de 5,9 ml de buffer fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0), 100 μL de extracto vegetal y 2 ml de H_2O_2 50 mM.

La actividad de la enzima catalasa (CAT) se estimó según Teranishi y colaboradores (1974) registrando la disminución de la absorbancia cada 5 s durante 60 s a 240 nm debido a la reducción de H_2O_2 . La mezcla de reacción contenía 890 μL buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,6), 100 μL de extracto vegetal y 10 μL de H_2O_2 al 15%.

Para las enzimas CAT y SOD se determinó la auto-oxidación de los sustratos en ausencia del extracto vegetal. La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad enzimática (U) por min por g de peso fresco.

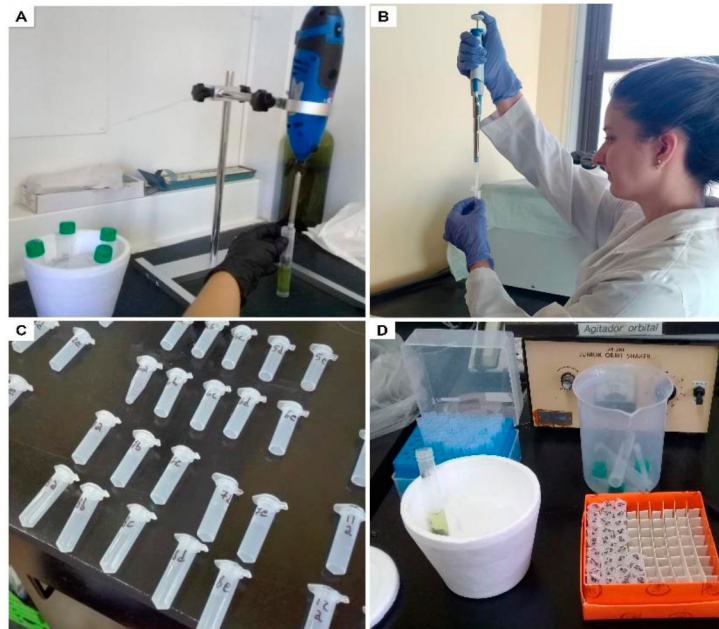


Figura 2.11: Diferentes etapas del proceso de preparación de los extractos para medir la actividad enzimática. (A) Preparación del homogenato. (B, C y D) Subdivisión en alícuotas del sobrenadante en tubos Eppendorf para posterior determinación de la actividad enzimática.

El daño a membranas se estimó mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) por el método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA; Heath y Parcker 1968). Para esto, 0,3 g de tejido foliar se homogenizaron con una solución de ácido tricloroacético al 20% y ácido tioabarbitúrico al 0,5%, en una relación de 0,1 g de tejido vegetal fresco cada 1 ml de solución. La extracción se realizó manteniendo los homogenatos en un baño a 95 °C durante 30 min (Fig. 2.12). Pasado este tiempo la reacción fue interrumpida mediante shock térmico en un baño con hielo. Luego, se centrifugó el homogenato a 4930 rpm durante 5 min a 4 °C y midió la absorbancia del sobrenadante a 532 y a 600 nm. La concentración de MDA se estimó usando el coeficiente de extinción molar $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Figura 2.12: Baño de inversión de los homogenatos.

2.3.5. Variables Morfométricas

VARIABLES DE FORMA

Al finalizar los experimentos, luego de medir los parámetros de fluorescencia de la clorofila y previo a la cosecha total de las plantas, se cosecharon las hojas nuevas totalmente desplegadas. El corte de cada hoja se realizó manteniendo un criterio de homología entre plantas y fue determinado a partir de un corte perpendicular en el sitio de inserción del pecíolo al tallo (ver Anexo). Para la especie *L. brasiliense* se cosecharon tres hojas por planta (n= 3 hojas por planta; 10 plantas por tratamiento de cada experimento) y para *A. vulgatissima* se seleccionaron dos ramas de las cuales se cosecharon tres hojas (n= 6 hojas por planta; 10 plantas por tratamiento de cada experimento). Las hojas fueron herborizadas y luego se digitalizaron mediante el uso de un escáner convencional Epson perfection v37, obteniéndose la imagen de la cara adaxial de la hoja. A cada hoja se le asignó un código identificatorio (ID) que permitió distinguir entre hojas, plantas y tratamientos, en los análisis posteriores. Cabe mencionar que las hojas utilizadas para los análisis de forma fueron incluídas en los cálculos de crecimiento de la biomasa aérea.

Luego se obtuvieron las variables de forma usando la serie de programas computacionales TPS (Rohlf 1999). Para esto, se generó un compilado de imágenes en formato .tps, mediante la serie TPSútil (Rohlf 2017a). Posteriormente, se escalaron las imágenes y se digitalizaron los contornos de las hojas mediante la definición de una configuración de 5 *landmarks* y 20 *semilandmarks* (ver glosario), con el uso del módulo TPSdig2 (Rohlf 2017b) (Fig. 2.13 A y B). Los efectos de arqueado de las hojas, producto de la herborización, se corrigieron mediante el eje definido por los *landmarks* 1, 25 y 24 con la función “*unbend specimens*” del módulo TPSútil. *A posteriori* se procedió a eliminar el *landmark* 25 dado que solo se utilizó con el objetivo de corregir los posibles efectos de arqueado. Además, se realizó el Análisis Generalizado de Procrustes (GPA; ver Anexo) (Dryden y Mardia 1998, Slice *et al.* 2001, Klingenberg *et al.* 2002). Previo a dicho análisis, se deslizaron los *semilandmarks* mediante el uso del módulo TPSRelw (Rohlf 2017c), con la finalidad de lograr una homología matemática entre los distintos individuos. Para ello se utilizó un algoritmo matemático que minimiza la energía de curvatura entre la magnitud del cambio en forma de cada hoja y el individuo consenso calculado por la

superposición de Procrustes para todos los individuos (Gunz *et al.* 2005). Finalmente, las coordenadas alineadas de Procrustes fueron utilizadas como nuevas variables de forma en los subsecuentes análisis (ver sección 2.5.2).

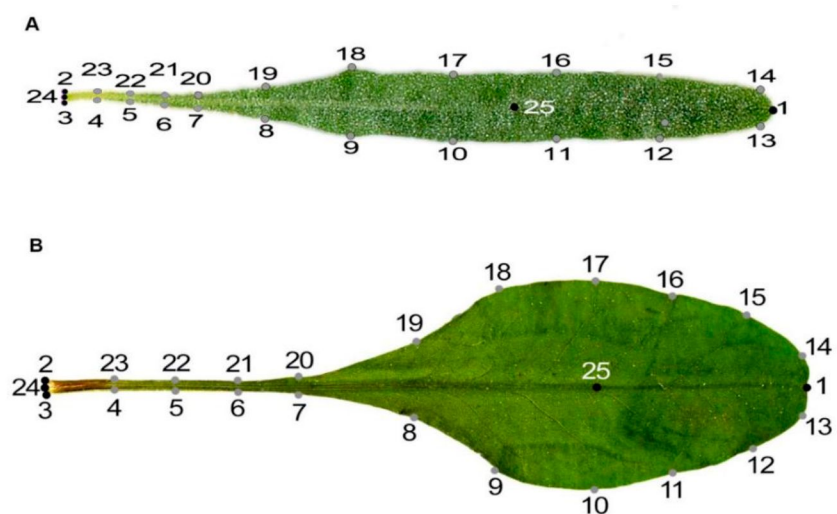


Figura 2.13: Configuración 2D de *landmarks* (puntos negros) y *semilandmarks* (puntos grises) utilizados para capturar la forma de la hoja de (A) *A. vulgatissima* y (B). *L. brasiliense*. *Landmarks*: (1) ápice, (2) lado izquierdo del pecíolo, (3) lado derecho del pecíolo, (24) punto medio entre los *landmarks* 2 y 3, (25) centroide de la lámina en la nervadura central. *Semilandmarks*: (4-13; 14-23) dispuestos a lo largo del contorno del pecíolo y la lámina.

Durante el proceso de digitalización y antes de realizarse los análisis estadísticos, se eliminaron todas las hojas que presentaban algún tipo de daño no propio del tratamiento con metales. Del mismo modo las hojas que naturalmente se encontraban por fuera de la distribución de la muestra fueron consideradas “atípicas u *outliers*” y en consecuencia fueron eliminadas (Tabla 2.3.5.1).

Tabla 2.3.5.1: Número de hojas final incluidas en los análisis morfométricos para cada tratamiento y especie: *A. vulgatissima* y *L. brasiliense*

Tratamiento (μM)	<i>Atriplex vulgatissima</i>	<i>Limonium brasiliense</i>
0	59	30
50 Pb	52	28
100 Pb	59	30
100 Zn	54	30
200 Zn	57	26
50 Pb + 100 Zn	53	30
50 Pb + 200 Zn	56	26
100 Pb + 100 Zn	57	27
100 Pb + 200 Zn	58	27

Tamaño de la hoja

Por otro lado, se calculó para cada hoja cosechada ($n= 3$ hojas por planta en *L. brasiliense* y $n= 6$ hojas por planta de *A. vulgatissima* de 10 plantas por tratamiento en cada caso por experimento) un estimador insesgado del tamaño denominado *centroid size* (CS). El CS se calculó como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde el conjunto de *landmarks* y *semilandmarks* al centroide que ellos definen (Zelditch et al. 2004). Además, se midió el largo y ancho de la hoja, como la distancia lineal (cm) comprendida entre los *landmarks* 1 y 24 y entre 10 y 17, respectivamente.

2.4. Índice biológico de respuesta integrada (IBRv2)

Se calculó el IBRv2 (Sanchez *et al.* 2013) para cada tratamiento usando el tratamiento control como nivel de referencia, mediante la función *ibrv2_index* del paquete *IBRtools* (Resende *et al.* 2022) en R v4.0.1 (R Core Team 2023). La desviación entre el tratamiento control y cada biomarcador, para cada tratamiento, fue representado mediante un gráfico de estrella o diagrama radial. El área por fuera del control refleja inducción mientras que por debajo refleja inhibición del biomarcador.

2.5. Análisis estadísticos

2.5.1. Análisis estadísticos para variables de crecimiento, fisiológicas y bioquímicas

Los datos relacionados a las variables respuesta (a excepción de las variables de forma) fueron evaluados mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) usando el modelado *Generalized Least Squares* (GLS) mediante la función *gls* del paquete *nlme* (Pinheiro y Bates 2006). En el caso de la evaluación del incremento individual de los metales Pb o Zn, se realizó un ANOVA de un factor (Pb o Zn como factores fijos). Para evaluar la interacción entre los dos metales, mediante el incremento combinado de Pb y Zn, se realizó un ANOVA de dos factores (Pb*Zn). Los supuestos fueron verificados sobre los residuos del modelo, tanto gráfica como estadísticamente. Para evaluar la normalidad se utilizó la prueba de Shapiro–Wilk y para la homogeneidad de varianzas la prueba de Levene. Para las variables donde no se cumplía el supuesto de homogeneidad se realizó el modelado de varianza mediante las funciones disponibles del paquete *nlme* (*varIdent* y *varPower*) y se seleccionó el mejor modelo teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés) (Pinheiro y Bates 2006). Para las variables respuesta de los

experimentos donde el ANOVA de un factor fue significativo ($P < 0,05$), se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey (Zar 1999). Para las variables de los experimentos del incremento combinado de Pb y Zn, donde el ANOVA de dos factores mostró efecto significativo de la interacción Pb*Zn ($P < 0,05$), se realizaron comparaciones de efectos simples dentro de cada nivel de ambos factores. Es decir, se comparó entre niveles de Zn dentro de cada nivel de Pb (Zn|Pb) y se comparó entre niveles de Pb para cada nivel de Zn (Pb|Zn). En los casos donde la interacción entre Pb y Zn fue no significativa ($P > 0,05$) y alguno de los efectos principales (Pb y/o Zn) fue significativo ($P < 0,05$), se realizaron comparaciones múltiples para cada factor mediante la prueba de Tukey (Zar 1999).

2.5.2. Análisis morfométricos de las hojas

Los análisis morfométricos de la hoja de *A. vulgatissima* y *L. brasiliense*, realizados para los experimentos de incremento individual de Pb o Zn, contemplaron todos los tratamientos en el caso del Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y del Zn (0, 100 y 200 μM Zn). Por otro lado, para poder analizar e interpretar los cambios en la forma de la hoja asociados únicamente a la presencia conjunta de Pb y Zn, los análisis realizados en ambas especies solo contemplaron al control (0 Pb + 0 Zn) y a los tratamientos que contenían simultáneamente Pb y Zn, es decir, 50 μM Pb + 100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 μM Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn.

Se estudió la presencia de alometría (ver glosario) mediante la regresión multivariada entre la forma (coordenadas alineadas de Procrustes) como variable dependiente y el tamaño (CS) como variable independiente (Bookstein 1991, Monteiro 1999). La cantidad de variación explicada por la alometría se cuantificó como el porcentaje total de la variación en forma explicada por el modelo de regresión (Klingenberg y McIntyre 1998). La significancia del modelo se evaluó mediante pruebas de permutación con 1000 iteraciones.

Con el objetivo de describir y observar el espectro de variación de la forma de las hojas (definido en los principales ejes del morfoespacio), sin la presencia de alometría, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) de la matriz de varianzas-covarianzas (Rohlf y Archie 1984). Luego mediante un gráfico de dispersión se representaron las primeras 2 componentes principales mostrando el cambio en forma

explicado por dichos ejes. Por otro parte, con el objetivo de determinar las componentes de forma que maximizaron las diferencias entre tratamientos, se realizó un Análisis de Variables Canónicas (ACV). Además, para poner a prueba la diferencia entre formas medias debido a la presencia de el/los metales Pb o/y Zn, se utilizó un Análisis Multivariado de la Varianza (MANOVA). Además, se realizó un Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA-MDGC utilizando las Componentes Principales (CPs) que explicaban el 99% de la variación en forma y se calculó las distancias de Mahalanobis entre las formas medias de las hojas de los tratamientos. Todos los análisis morfogeométricos se realizaron con el programa computacional MorphoJ (Klingenberg 2008) y los análisis estadísticos MANOVA y UPGMA-MDGC en el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

CAPÍTULO

Evaluación del incremento individual de Pb y Zn en *Atriplex vulgatissima* y *Limonium brasiliense*.



Pollicelli MP, Márquez F, Pollicelli MD, Idaszkin YL (2023) Screening of tolerance of *Atriplex vulgatissima* under zinc or lead experimental conditions. An integrative perspective by using the integrated biological response index (IBRv2). *Chemosphere* 341:140110.

Pollicelli MP, Márquez F, Idaszkin YL (2024) Towards a comprehensive understanding of zinc tolerance in *Limonium brasiliense* as a useful tool for environmental remediation and monitoring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 31(17): 25299-25311.

Introducción

El estudio y la comprensión de cómo las plantas acumulan y toleran los metales resulta de suma importancia para su aplicación en prácticas de fitorremediación de ambientes contaminados. En particular, metales como el Pb y Zn son contaminantes que pueden encontrarse en el suelo y el agua y su acumulación en el medio ambiente representa un problema para la salud de los ecosistemas y la calidad de vida humana. En este sentido, este capítulo contribuye al conocimiento de cómo *Atriplex vulgatissima* y *Limonium brasiliense* responden a la presencia de Pb o Zn, proporcionando información valiosa para futuras estrategias de remediación ambiental y conservación de ecosistemas. Asimismo, resalta la importancia de utilizar una batería de biomarcadores complementarios, así como la implementación de un índice que permita evaluar de manera integral la magnitud del efecto de la contaminación producida por estos metales, especialmente en el contexto del desarrollo de metodologías para la remediación ambiental y restauración de áreas contaminadas por metales.

En el presente capítulo se presentan y discuten los resultados de los experimentos de incremento individual de los metales Pb y Zn para las especies seleccionadas detallados en el capítulo II (metodología general) y correspondientes a abordar el objetivo específico: I: Cuantificar y comparar la acumulación de Pb y Zn en la biomasa aérea y radical de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a diferentes concentraciones de dichos metales de manera individual, y evaluar la tolerancia de cada especie a través de parámetros de crecimiento y distintas respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas asociadas al aumento en las concentraciones individuales de Pb y Zn.

Subcapítulo I: *Atriplex vulgatissima*

3.1. Resultados

3.1.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación

Respecto a los resultados obtenidos en el experimento de Pb, la concentración de este metal en ambos órganos fue significativamente mayor en los tratamientos donde se adicionó Pb a la solución de riego que en el control (ANOVA raíz: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P < 0,05$; Tabla 3.1.1). El FBC fue 11 y 6 veces superior a la unidad en el tratamiento 50 y 100 μM Pb, respectivamente; mientras que el FT < 1 y el FBA fue ligeramente superior a la unidad para ambos tratamientos de Pb (Tabla 3.1.1).

En cuanto al experimento de Zn, los resultados indicaron que la concentración de este metal fue significativamente mayor en los tratamientos con Zn añadido a la solución de riego, tanto en la raíz como en la biomasa aérea (ANOVA raíz: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P < 0,05$; Tabla 3.1.1). El índice FBC fue 39 y 25 veces superior a la unidad en los tratamientos 100 y 200 μM Zn, respectivamente. Por otro lado, el FT fue levemente superior a la unidad para los tratamientos con Zn; mientras que el FBA fue 41 y 22 veces superior a la unidad en los tratamientos 100 y 200 μM Zn, respectivamente (Tabla 3.1.1).

Tabla 3.1.1: Media \pm error estándar ($n = 4$ o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo) en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los diferentes tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y el experimento de Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en *A. vulgatissima*. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamiento (μM)	[Raíz] ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	[Aéreo] ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	FBC	FBA	FT	
Pb	0	9,81 \pm 6,66 b	1,25 \pm 0,37 b	-	-	0,27 \pm 0,05
	50	120,7 \pm 25,93 a	15,2 \pm 5,19 a	11,6 \pm 2,5	1,46 \pm 0,54	0,27 \pm 0,09
	100	130,2 \pm 18,20 a	41,0 \pm 22,40 a	6,3 \pm 0,88	1,97 \pm 1,07	0,28 \pm 0,11
Zn	0	49,5 \pm 5,94 B	26,7 \pm 6,03 B	-	-	0,56 \pm 0,11
	100	257,6 \pm 20,34 A	269,5 \pm 28,66 A	39,5 \pm 3,11	41,3 \pm 9,8	1,12 \pm 0,24
	200	327,4 \pm 33,39 A	287,7 \pm 17,97 A	25,1 \pm 5,72	22 \pm 3,1	1,1 \pm 0,25

3.1.2. Parámetros de crecimiento

Todas las plantas de *A. vulgatissima* sobrevivieron a los tratamientos de Zn y Pb y no manifestaron daños visibles y/o signos de clorosis en ninguno de los dos experimentos (Fig. 3.1.1). Además, el aumento de las concentraciones de Pb o Zn no tuvo un impacto

significativo en la biomasa, tanto en la raíz como en la parte aérea (ANOVA raíz: [Pb], $P > 0,05$, ANOVA aéreo: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA raíz: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.1.2 A-B). Coincidentemente, el crecimiento relativo no varió significativamente frente al aumento de los metales en cada experimento (ANOVA CR: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA CR: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.1.2 C-D).

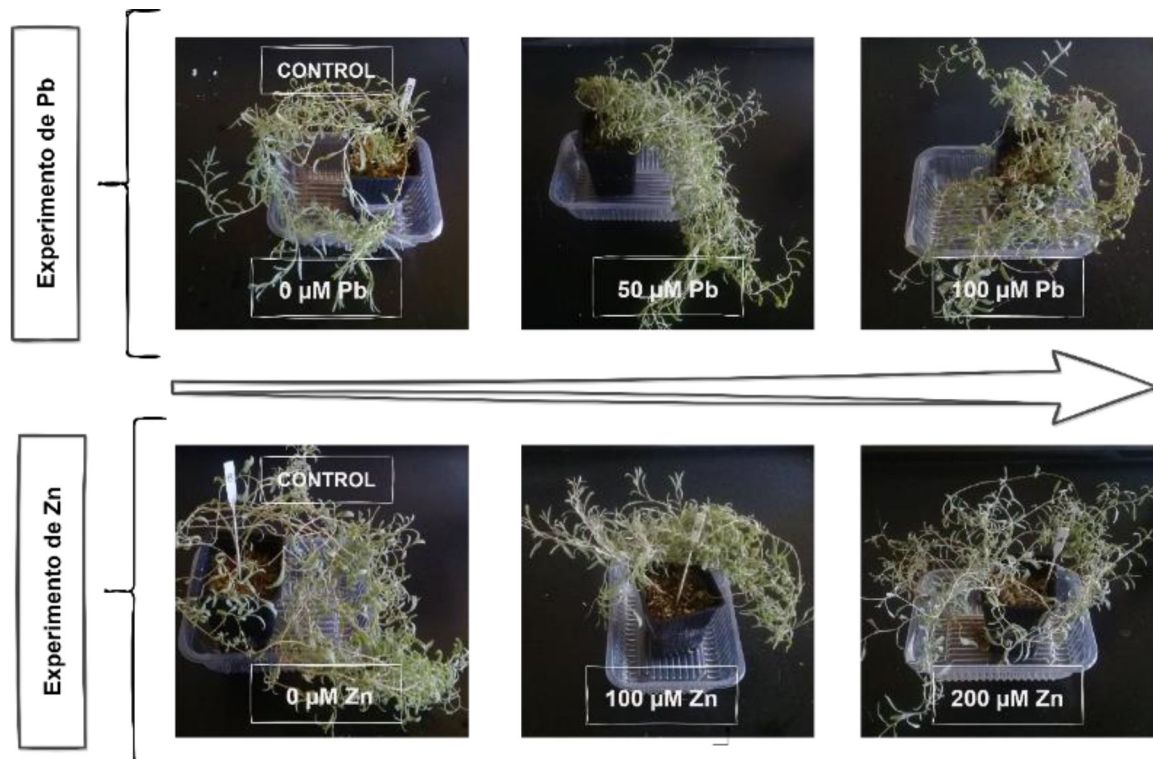


Figura 3.1.1: Fotografía de plantas *A. vulgatissima* al finalizar los experimentos de Pb (arriba): 0, 50 y 100 μM Pb, y de Zn (abajo): 0, 100 y 200 μM Zn.

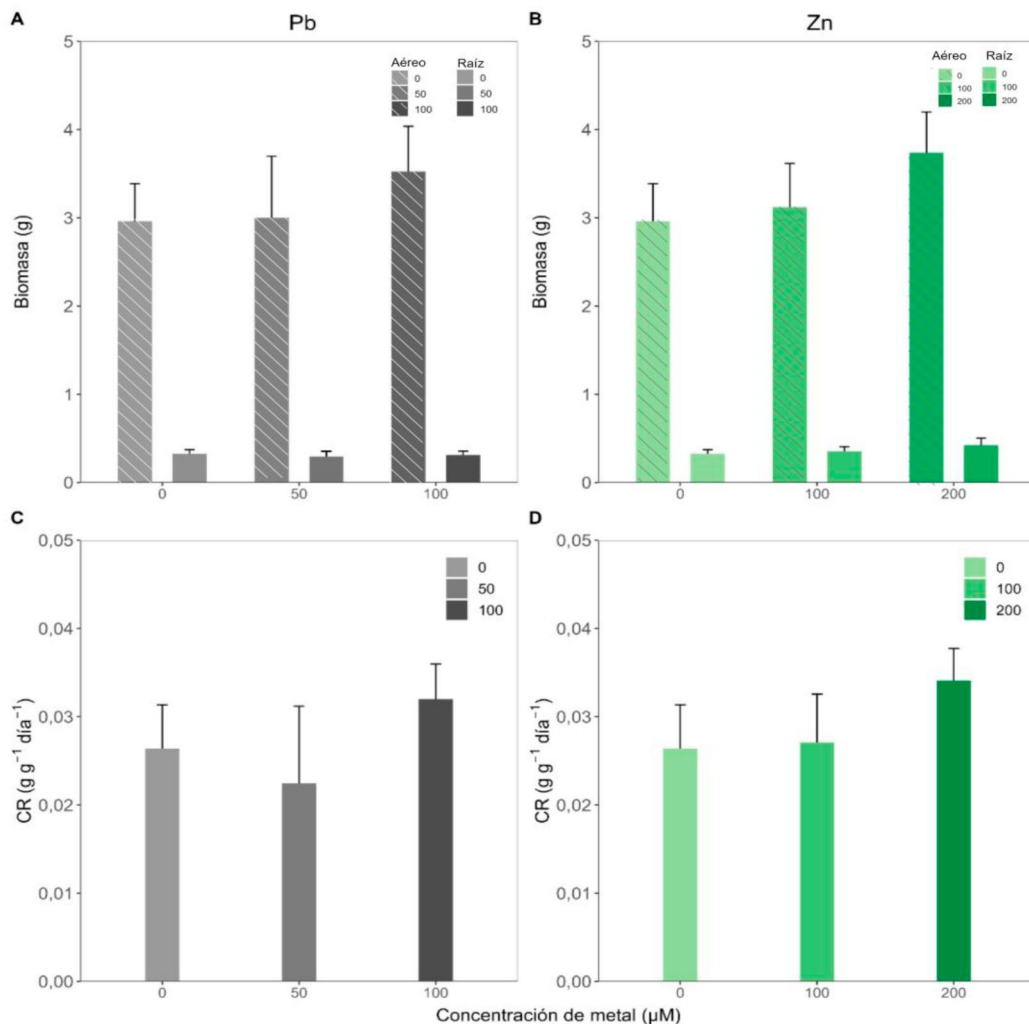


Figura 3.1.2: Parámetros de crecimiento en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n=10$). Panel izquierdo: tratamientos del experimento Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Biomasa aérea y raíz, y (C, D) crecimiento relativo.

3.1.3. Parámetros fisiológicos

El CA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos en el experimento de Pb (ANOVA CA: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.1.3 A). Por otro lado, en el experimento de Zn, esta variable fue significativamente menor en el tratamiento 200 μM Zn (ANOVA CA: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.1.3 B).

Respecto a los parámetros de eficiencia del fotosistema II, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos del experimento de Pb tanto para el parámetro Q_y como para Φ_{psII} (ANOVA Q_y : [Pb], $P > 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.1.3 C). Lo mismo ocurrió con los tratamientos del experimento de Zn (ANOVA Q_y : [Zn], $P > 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.1.3 D).

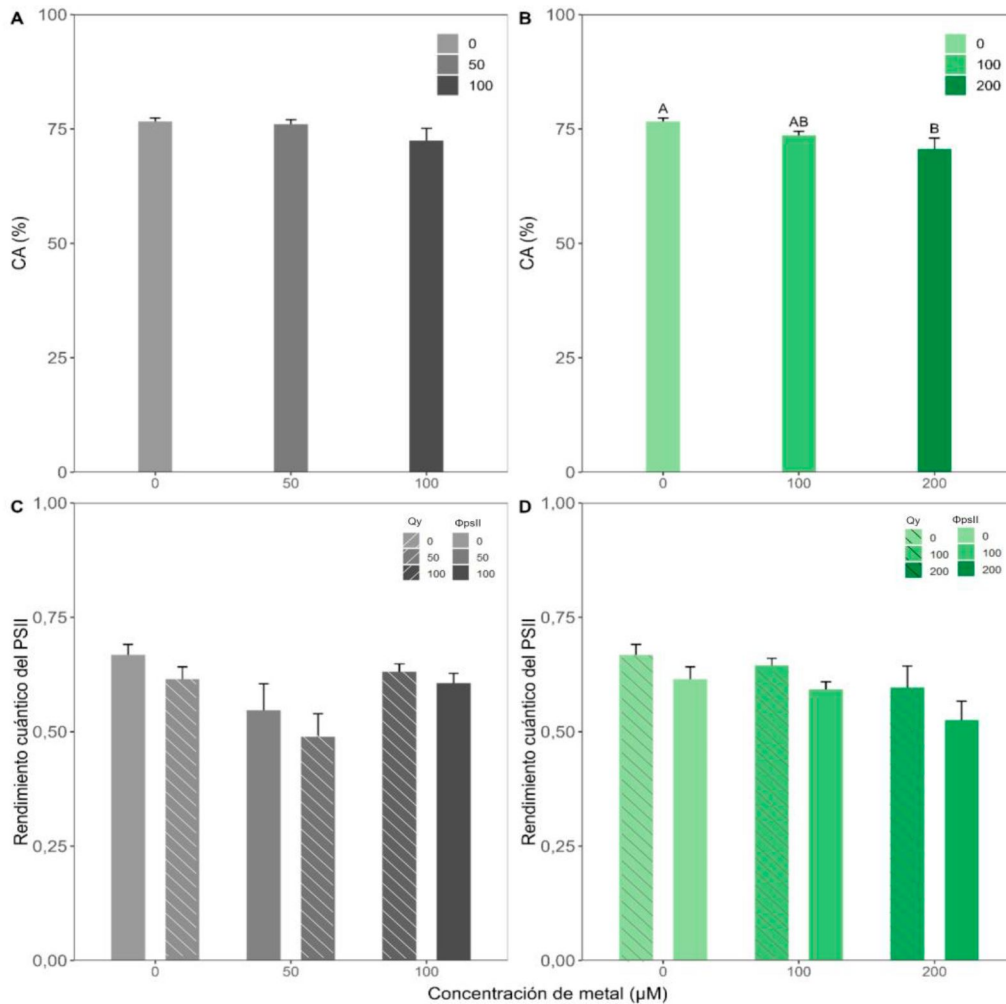


Figura 3.1.3: Parámetros fisiológicos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n=10). Panel izquierdo: tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Contenido de agua (CA) y (C, D) rendimiento cuántico del fotosistema II, donde Φ_{psII} representa la eficiencia del fotosistema II y Q_y la eficiencia máxima del fotosistema II. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

3.1.4. Parámetros bioquímicos

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides entre los tratamientos del experimento de Pb (ANOVA clorofila a: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.1.4 A-B-C). Por otro lado, la concentración de clorofila a y carotenoides fue significativamente menor en el tratamiento 200 μM Zn que el resto de los tratamientos del experimento de Zn, mientras que la clorofila b solo mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento 200 μM Zn (ANOVA clorofila a: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA clorofila b: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA carotenoides: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.1.4 D-E-F).

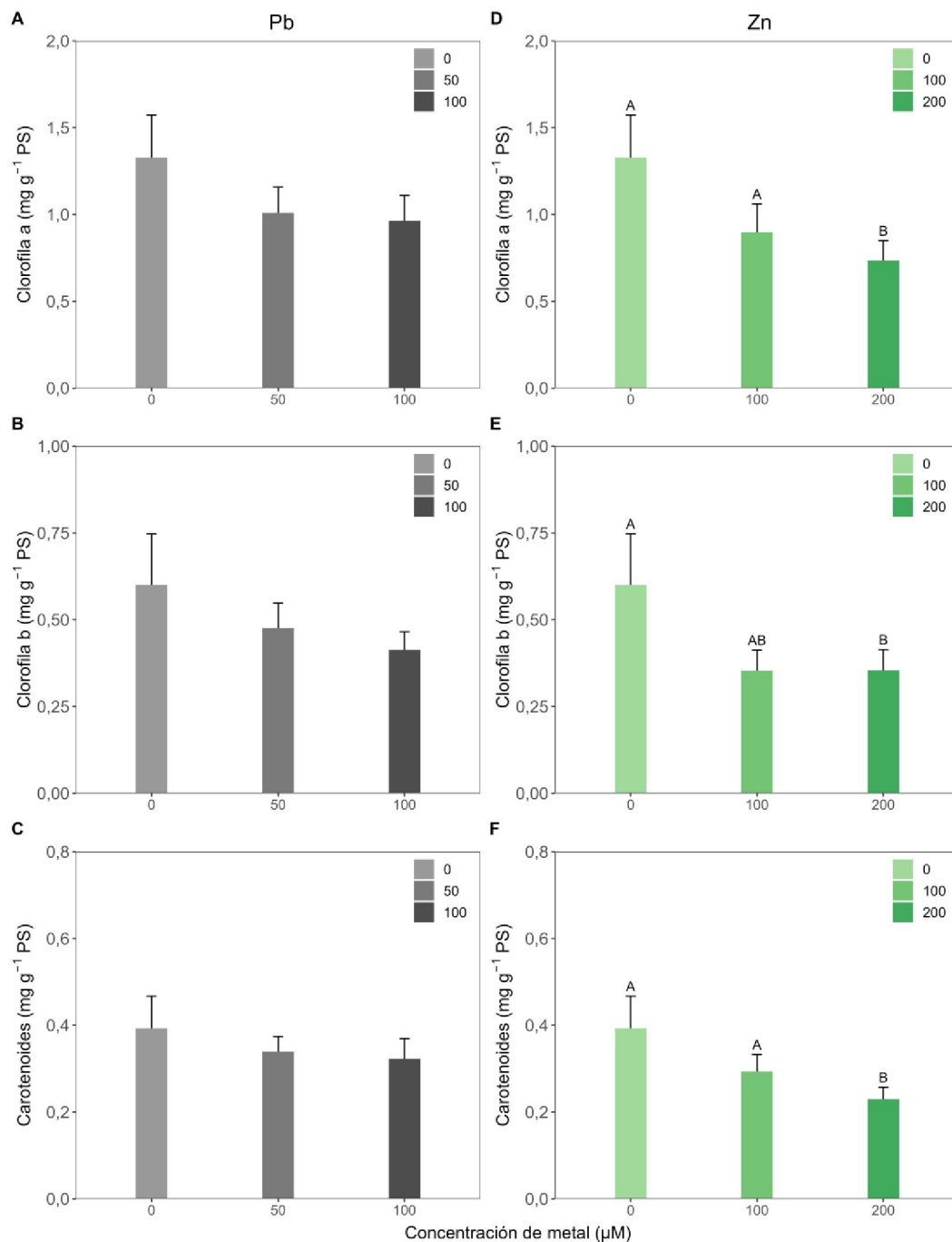


Figura 3.1.4: Concentración de pigmentos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n=10$). Panel izquierdo (A, B, C): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (D, E, F): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

En ambos experimentos la actividad enzimática en hojas de *A. vulgatissima* mostró un comportamiento diferencial de acuerdo al tipo de enzima y a la concentración del metal. El contenido de Pb no tuvo efecto significativo en la actividad de las enzimas SOD y GPx (ANOVA SOD: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA GPx: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.1.5 A-C). En cuanto a la actividad de la enzima APx, se observó un aumento significativo en su actividad en el

tratamiento de 50 μM de Pb (ANOVA APx: [Pb], $P < 0,05$; Fig. 3.1.5 B). Respecto a la enzima CAT, su actividad fue significativamente menor en el tratamiento 100 μM Pb (ANOVA CAT: [Pb], $P < 0,05$; Fig. 3.1.5 D). Por otro lado, en el experimento de Zn, la actividad SOD fue significativamente mayor en los tratamientos con Zn en solución de riego. La actividad GPx fue menor en el tratamiento 200 μM Zn respecto del control (ANOVA SOD: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.1.5 E-G), mientras que la actividad de la enzima APx fue mayor en el tratamiento 100 μM Zn (ANOVA APx: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.1.5 F). Finalmente, no se observaron cambios significativos entre tratamientos en la actividad de la enzima CAT (ANOVA CAT: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.1.5 H).

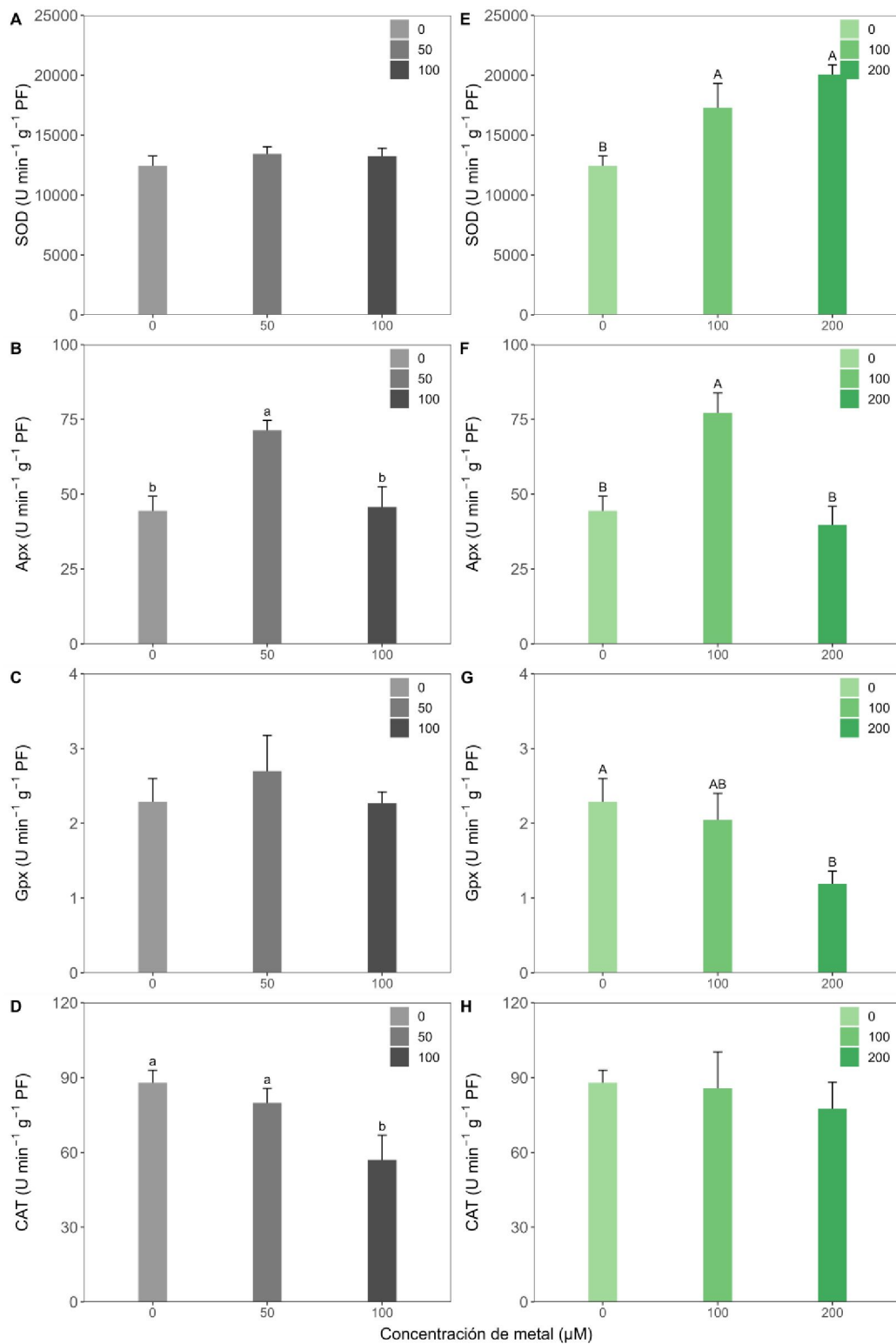


Figura 3.1.5: Actividad enzimática medida en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n=5$). Panel izquierdo (A, B, C, D): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx y (D, H) catalasa, CAT. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Respecto a la peroxidación lipídica, en el experimento de Pb la concentración de MDA fue mayor en el tratamiento 100 μM Pb respecto del control (ANOVA MDA: [Pb], $P < 0,05$; Fig. 3.1.6 A). En el experimento de Zn, la concentración de MDA fue mayor en el tratamiento 100 μM Zn que el tratamiento control (ANOVA MDA: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.1.6 B).

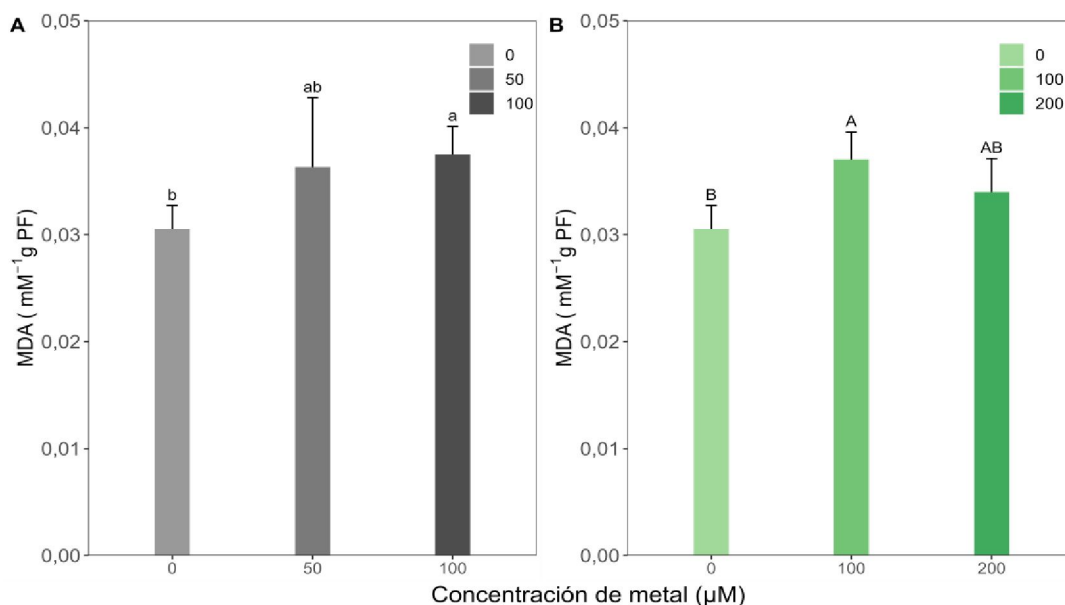


Figura 3.1.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm error estándar; $n=5$). Tratamientos del experimento de (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100, 200 μM Zn). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

3.1.5. Parámetros morfométricos

La regresión alométrica del componente simétrico sobre el tamaño resultó no significativa para el Pb ($P > 0,05$), mientras que en el experimento de Zn fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$), indicando que un 4,14% del total de la variación en forma se debe al cambio en el tamaño. Sin embargo, debido a que este porcentaje fue menor al 5%, este se consideró despreciable (Zeldicth *et al.* 2004) y en los subsiguientes análisis se realizaron sobre las variables originales de forma.

El diagrama de dispersión del Análisis de Componentes Principales (ACP) para el experimento de Pb mostró que las primeras dos componentes principales (CPs) explicaron un 83,32% de la varianza (CP1: 65,65%, CP2: 17,67%; Fig. 3.1.7 A). El espectro de variación en forma de las hojas explicado por estas dos componentes, indicó cambios en la expansión del pecíolo y en la esbeltez y proyección de la lámina. Los valores positivos de la CP1 presentaron formas de hoja con pecíolo proyectado y limbos estrechos;

mientras que los valores negativos presentaron el patrón de forma contrario. La CP2 indicó formas de lámina lanceolada para valores positivos del eje, en tanto los valores negativos expresaron formas de hoja elíptica. Por otro lado, para el experimento de Zn las dos primeras CPs explicaron un 77,89% del total de la variación en forma (CP1: 57,13%, CP2: 20,76%; Fig. 3.1.7 B). Los valores positivos de la CP1 presentaron hojas con lámina retraída desde el ápice y con peciolo proyectado en la dirección opuesta, mientras que hacia los valores negativos presentaron el patrón opuesto. Por otra parte, al igual que en el experimento de Pb, los valores positivos de la CP2 presentaron hojas con lámina lanceolada, en tanto los valores negativos hojas de forma elíptica.

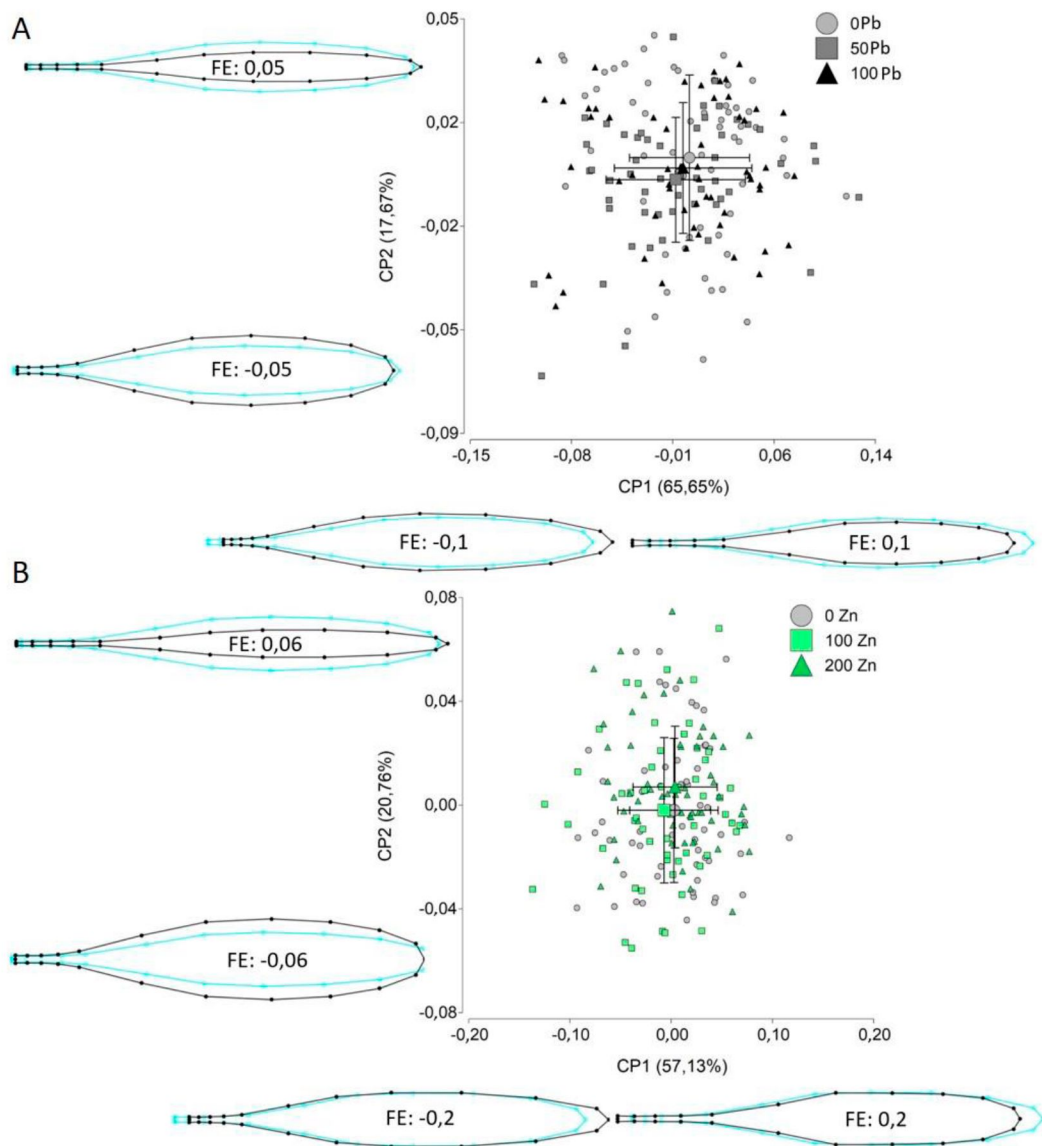


Figura 3.1.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la forma de la hoja de *A. vulgatissima* para los tratamientos del experimento de: (A) Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μ M Zn), mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. En los márgenes se muestra el cambio en la forma (color negro) de la hoja en superposición del consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representada por el contorno (color negro) a lo largo de los valores del eje representado.

El Análisis de Variable Canónicas (AVC) para el experimento de Pb, mostró que el VC1 explicó un 72,28% de la varianza que maximiza la separación entre los tratamientos, en tanto el eje VC2 explicó un 27,71%. El gráfico de dispersión (Fig. 3.1.8 A) evidenció una separación entre los tratamientos sobre ambos ejes, siendo los tratamientos 50 y 100 μ M Pb representados por los valores positivos de los ejes VC1 y VC2, respectivamente, y cuyas hojas poseían forma lanceolada con ápice agudo. Por otro lado, en el experimento

de Zn, los ejes VC1 y VC2 explicaron el 74,32% y 25,67% respectivamente (Fig. 3.1.8 B). Se observó sobre el eje VC1 un gradiente entre los tratamientos 0 > 100 > 200 μM Zn, desde los valores negativos hacia los positivos del eje VC1. Los valores positivos indicaron láminas con ápice angosto y con una ligera expansión en la zona cercana al peciolo, mientras que los valores negativos presentaron el patrón opuesto.

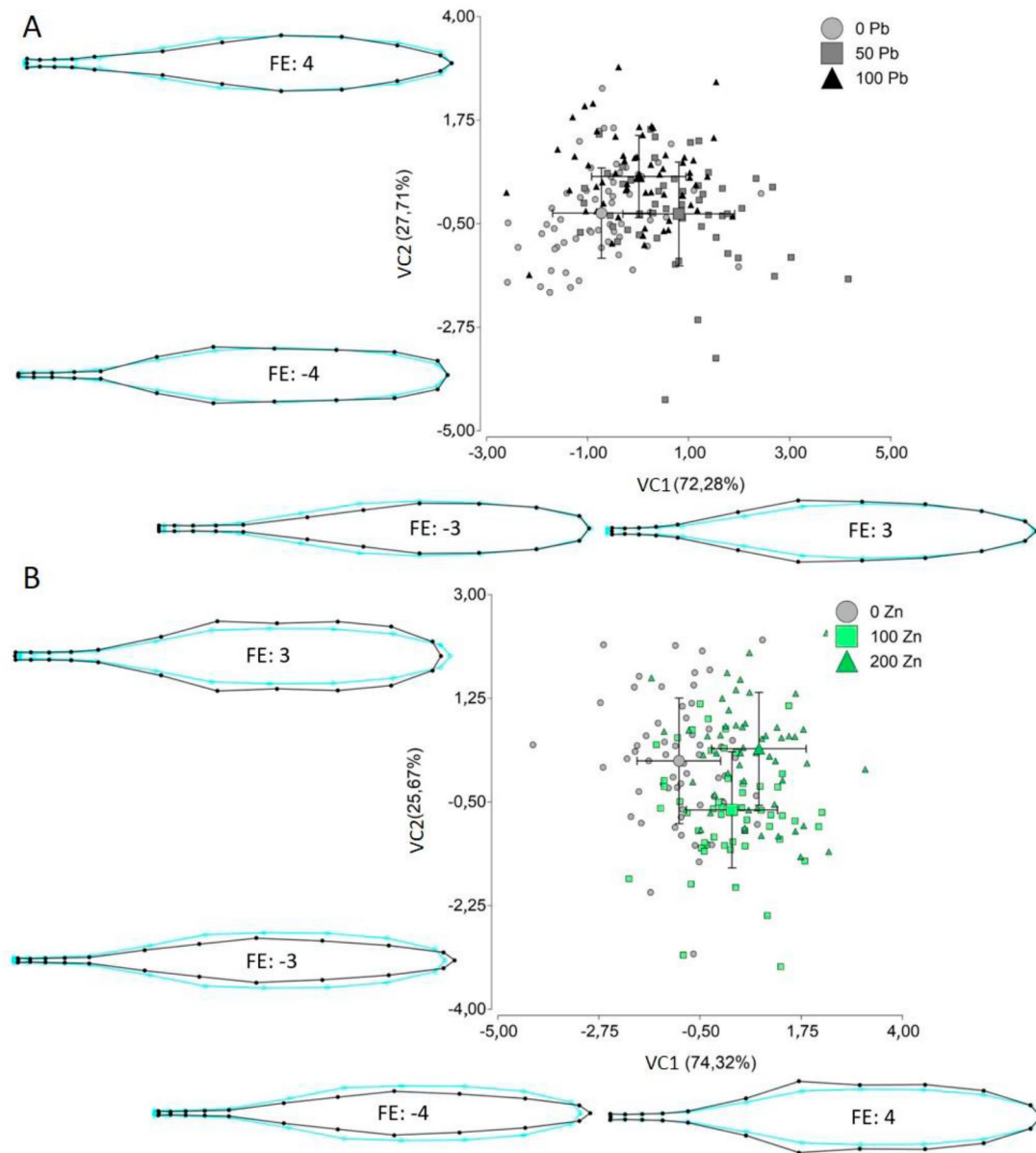


Figura 3.1.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas (AVC) de la forma de la hoja de *A. vulgatissima* para los tratamientos del experimento de: (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes). A los márgenes de cada eje canónico se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) desde la forma consenso (color turquesa) hacia los valores positivos y negativos de cada CP. El factor de escala. (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado.

El MANOVA realizado para las primeras 8 CPs (representando el 99% de la variación total) indicó diferencias significativas entre las formas medias para el experimento de Pb (Pillai, $P = 0,0003$). El análisis de conglomerado distinguió 3 grupos significativamente distintos y la distancia de Mahalanobis fue mínima entre los tratamientos 0 y 100 μM Pb y máxima entre los tratamientos 0 y 50 μM Pb (Fig. 3.1.9, izquierda). Por otro lado, para el experimento de Zn el MANOVA realizado con las primeras 7 componentes CPs (representando el 99% de la variación total) indicó diferencias significativas para la forma de la hoja entre tratamientos (Pillai, $P = 0,0002$). El análisis de conglomerado jerárquico distinguió 2 grupos significativamente distintos y las distancias de Mahalanobis para las formas medias entre el control y el tratamiento 100 μM Zn fue mínima, constituyendo ambos tratamientos un grupo mientras que el tratamiento 200 μM Zn fue el grupo más divergente (Fig. 3.1.9, derecha).

Con respecto al tamaño de la hoja (largo, ancho y *centroid size*, CS) no se observaron diferencias entre tratamientos en el experimento de Pb (ANOVA largo: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA ancho: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA CS: [Pb], $P > 0,05$; Tabla 3.1.2). Por otro lado, en el experimento de Zn tanto el largo como el CS fueron menores en los tratamientos 100 y 200 μM Zn que en el tratamiento control (ANOVA largo: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA ancho: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA CS: [Zn], $P < 0,05$; Tabla 3.1.2).

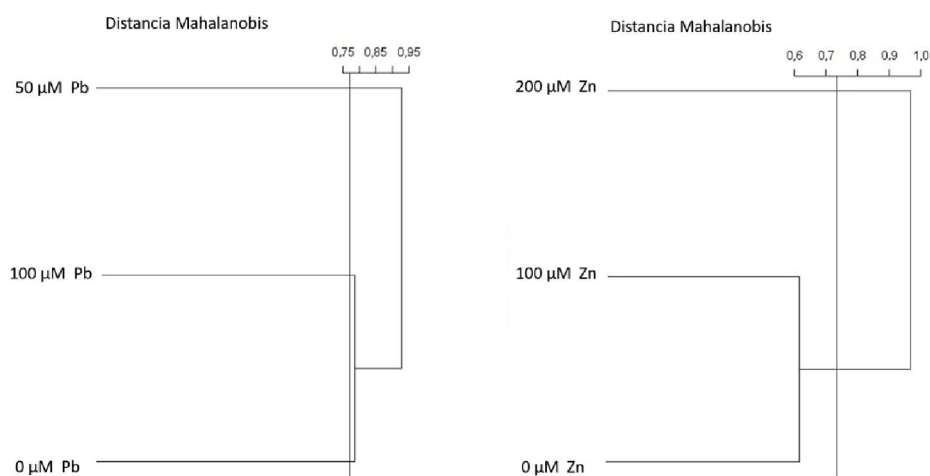


Figura 3.1.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma (n° CPs Pb= 8; n° CPs Zn= 7) entre los tratamientos del experimento de Pb (derecha) y Zn (izquierda). La línea vertical se corresponde con un $P = 0,05$.

Tabla 3.1.2: Media \pm error estándar (n=10) del largo, ancho y *centroid size* (CS) de hojas de *A. vulgatissima* para cada tratamiento del experimento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y del experimento de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamiento	(μ M)	Largo(mm)	Ancho (mm)	CS
Pb	0	27,46 \pm 1,32	3,20 \pm 0,15	48,09 \pm 2,20
	50	25,07 \pm 0,72	2,98 \pm 0,22	43,86 \pm 1,22
	100	25,39 \pm 1,36	3,49 \pm 0,21	44,90 \pm 2,33
Zn	0	27,46 \pm 1,32 A	3,20 \pm 0,15	48,09 \pm 2,20 A
	100	22,8 \pm 0,75 B	2,95 \pm 0,14	39,52 \pm 1,18 B
	200	23,5 \pm 125 B	2,75 \pm 0,11	41,56 \pm 2,15 B

3.1.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada IBRv2

Los valores de IBRv2 en el experimento de Pb fueron de 12,99 y 10,48 para los tratamientos 50 y 100 μ M Pb, respectivamente (Fig. 3.1.10 A-B). En el gráfico de estrellas para el tratamiento 50 μ M Pb, el cual exhibió mayor valor de IBRv2 (12,99), se observó incremento de la actividad de la enzima SOD, APx y GPx y aumento en las concentraciones del MDA. Al mismo tiempo se observó inhibición de la enzima CAT y reducción de la concentración de pigmentos y de la actividad del fotosistema II, cuantificada en los parámetros Qy y Φ psII (Fig. 3.1.10 A). En contraposición, la concentración más alta de Pb (100 μ M Pb) presentó menor valor de IBRv2 (10,48) indicando que las enzimas SOD, APx y GPx permanecieron similares al control, mientras aumentó el MDA y disminuyó la actividad de la enzima CAT junto con la concentración de los todos los pigmentos fotosintéticos (Fig. 3.1.10 B).

Para el experimento de Zn los valores de IBRv2 fueron de 12,52 y 17,27 para los tratamientos 100 y 200 μ M Zn, respectivamente (Fig. 3.1.10 C-D). El tratamiento 200 μ M Zn mostró el mayor valor de IBRv2 y en su gráfico se observó que todos los biomarcadores, excepto el MDA y la enzima SOD, mostraron inhibición prominente (Fig. 3.1.10 D). En cambio, la concentración 100 μ M Zn presentó un IBRv2 de 11,52, como resultado del incremento de las enzimas SOD y APx, junto a un aumento de las concentraciones del MDA. Al mismo tiempo, los pigmentos fotosintéticos presentaron inhibición, sin que se vean afectados los parámetros Qy y Φ psII (Fig. 3.1.10 C).

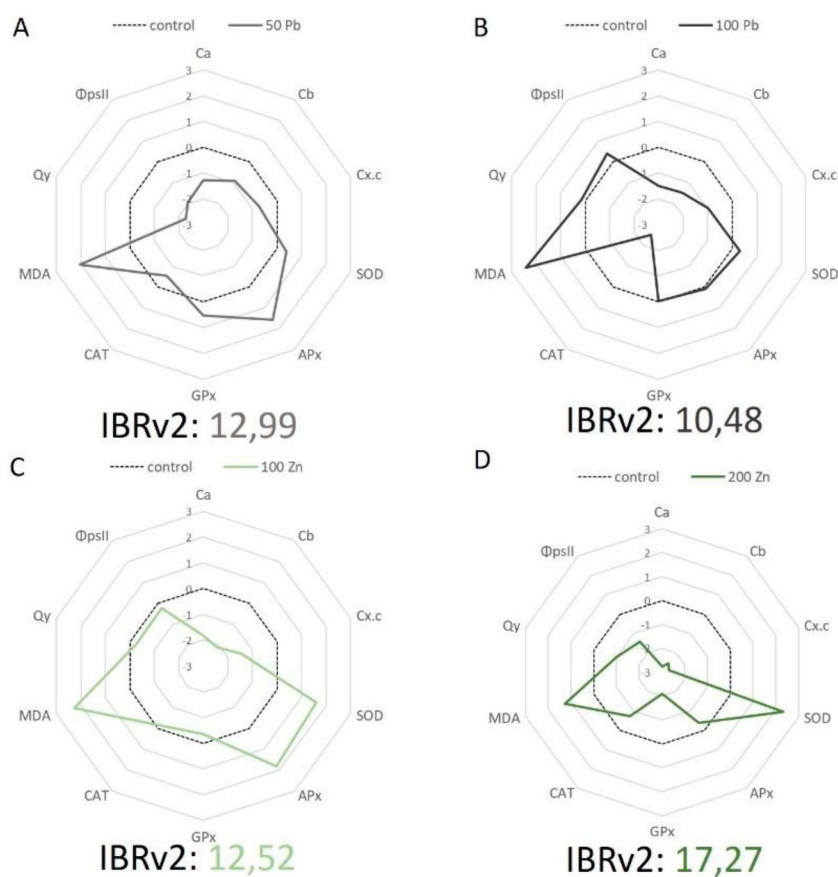


Figura 3.1.10: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes 10 biomarcadores medidos en hojas de *A. vulgatissima*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb; verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición para cada biomarcador respecto al control.

3.1.7. Discusión

Existe un creciente interés en identificar plantas que puedan utilizarse para remediar y monitorear entornos contaminados por metales. En este sentido, diversas especies del género *Atriplex* fueron postuladas como candidatas para programas de fitorremediación y monitoreo (Lotomani *et al.* 2011, Kachout *et al.* 2012, Khodaverdiloo *et al.* 2014, Ma *et al.* 2022). En base a estos antecedentes se llevaron a cabo dos experimentos para determinar la capacidad de *A. vulgatissima* para acumular Pb y Zn, cuando son aplicados individualmente, y se evaluó la tolerancia de esta planta a estos dos metales mediante diferentes respuestas de crecimiento, fisiológicas, bioquímicas y morfométricas.

Respecto a los patrones de acumulación de Pb y Zn en los órganos de *A. vulgatissima*, estos difirieron de acuerdo al experimento. En ambos tratamientos con metales, las concentraciones halladas superaron los niveles estándar para las raíces y hojas ($< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para Pb y $50 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para Zn), y alcanzaron niveles de toxicidad en las hojas (entre $0,6 - 28 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para Pb y $100 - 300 \mu\text{g g}^{-1}$ PS para Zn) (Krämer *et al.* 2010, Aziz y Mujeeb 2022). Estos resultados muestran una alta resistencia por parte de esta especie a estos metales. En particular, la concentración de Pb se incrementó en ambos órganos respecto del control con el aumento de Pb en la solución; no obstante, este metal se acumuló principalmente en las raíces y solo una pequeña cantidad se translocó hacia la biomasa aérea. Además, frente a dosis bajas de Pb *A. vulgatissima* posee mayor capacidad de absorción, ya que cuando se duplicó la concentración de este metal en el medio la capacidad de absorción se redujo a la mitad ($\text{FBC}_{50\text{Pb}} \approx 12 > \text{FBC}_{100\text{Pb}} \approx 6$). El mismo patrón de acumulación fue observado en diversas especies halófitas, tanto en condiciones de campo como experimentales (Yan *et al.* 2010, Idaszkin *et al.* 2017, 2019, Wiszniewska *et al.* 2019, García-Caparrós *et al.* 2022). Se conoce que en general el Pb queda restringido al espacio apoplástico y que barreras de la endodermis, como las bandas de Caspary, podrían detener o prevenir la translocación de este metal desde las raíces hacia la biomasa aérea (Pourrut *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013). Otra opción probable es que el Pb haya sido detoxificado mediante la formación de complejos con ácidos orgánicos, aminoácidos o péptidos, o bien fuese depositado en vacuolas o en paredes celulares permitiendo que solo los iones libres de Pb se transporten hacia las hojas, siendo incluso potencialmente excretado por las glándulas de la sal presentes en ellas (Weis y Weis 2004, Rascio y Navari-Izzo 2011, Gupta *et al.* 2013). Limitar o disminuir la absorción y acumulación de Pb en respuesta a elevadas concentraciones de este metal, se considera una estrategia de defensa para evitar su toxicidad (Kaur *et al.* 2015b). Junto al patrón de acumulación de Pb encontrado en los órganos de *A. vulgatissima*, el factor de bioacumulación $\text{FBC} > 1$ y el $\text{FT} < 1$, sugieren que esta especie podría funcionar como una especie fitoestabilizadora de este metal (Anjum *et al.* 2014).

En relación al Zn, se observó un aumento de su concentración en ambos órganos de *A. vulgatissima* a medida que incrementaba la cantidad de Zn añadida a la solución de riego. Sin embargo, este metal fue mayormente traslocado hacia la biomasa aérea lo que indicaría que esta especie podría considerarse fitoacumuladora de Zn. Este patrón se

reflejó en el FBA de aproximadamente 40 y 20 veces superior a la unidad para los tratamientos de 100 y 200 μM Zn respectivamente, y en el $\text{FT} > 1$ para ambas concentraciones de Zn. Sin embargo, la reducción cerca del 50% del índice FBA entre el tratamiento 100 y 200 μM Zn, podría indicar la existencia de algún mecanismo de saturación en la capacidad de esta especie para acumular Zn en su biomasa aérea. En contraposición, Ouni y colaboradores (2016) demostraron experimentalmente que la especie *Polypogon monspeliensis* (L.), que suele encontrarse en las zonas altas de marismas de California, acumuló este metal activamente en sus raíces y concentró muy poco de él en su biomasa aérea al ser expuesta a un rango de concentraciones de 0-300 ppm Zn ($\approx 4500 \mu\text{M}$ Zn). Estudios realizados en diferentes especies dentro de la misma familia que *A. vulgatissima*, *Amaranthaceae*, mostraron niveles de Zn altos tanto en raíces como hojas ($\text{FBC} > 1$ y $\text{FT} > 1$), sugiriendo acumulación activa de este metal (Alam *et al.* 2021), ya que un FT por encima de la unidad sugiere que la captación ocurre por medio de transportadores activos a través del plasmalema de la raíz (Kumar Yadav *et al.* 2018). Las diferencias observadas en el FT entre los metales estudiados podrían explicarse por la baja movilidad del Pb en comparación con la alta movilidad que tiene el Zn dentro de la planta y a que este metal no es un micronutriente esencial como el Zn (Kabata-Pendias 2011). Se han informado patrones de acumulación similares a los encontrados en *A. vulgatissima* para el Pb y Zn en *A. stocksii* en suelos contaminados de la costa de Karachi, Pakistán (Mujeeb *et al.* 2021).

Para ambos experimentos no se observaron daños de toxicidad visibles, como clorosis o necrosis, a pesar de que las concentraciones de Pb y Zn halladas en la biomasa de *A. vulgatissima* se encontraban dentro de niveles considerados fitotóxicos. Por otro lado, aunque se ha documentado que la contaminación por Pb y Zn afecta diversos parámetros del crecimiento (Zulfiqar *et al.* 2019, Kaur y Garg 2021), se observó que todos los tratamientos produjeron similar biomasa y no mostraron diferencias en el crecimiento relativo. En concordancia, diversos trabajos encontraron resultados similares bajo concentraciones más elevadas de Pb, como el caso de la especie *A. halimus* L. cuando fue sometida a una solución 800 ppm de Pb ($\approx 3860 \mu\text{M}$ Pb) (Manousaki y Kalogerakis 2009) y cuando fue expuesta a un rango de concentraciones desde 0 a 600 μM Pb (Bankaji *et al.* 2019). Asimismo, la halófito *A. verucifera* demostró ser tolerante y mantener sin cambio su biomasa frente a un rango de concentraciones de Pb entre $\approx 1200 - 5000 \mu\text{M}$,

mientras acumulaba elevadas concentraciones de este metal en ambos órganos (Khodaverdilloo *et al.* 2014). Por otro lado, Zhao y colaboradores (2000) trabajando con *Arabidopsis halleri*, considerada una especie hiperacumuladora de Zn, encontraron que la biomasa de raíces y hojas no se vió afectada por el aumento de este metal (1-1000 μM Zn). Los resultados de este subcapítulo sugieren que *A. vulgatissima* presenta mecanismos de tolerancia al Zn y Pb, manteniendo su crecimiento y biomasa sin signos evidentes de toxicidad cuando acumula estos metales en sus órganos.

El contenido de agua de *A. vulgatissima* no se vio afectado por el incremento de Pb, pero experimentó una disminución significativa en respuesta al nivel más alto de Zn, mostrando una reducción del 8% respecto del control. Se sabe que la toxicidad inducida por los metales reduce el contenido de agua (Kabata-Pendias 2011). En particular, niveles altos de Zn en las hojas de una planta pueden perturbar las relaciones hídricas y por lo tanto producir una disminución en el CA (Garg y Singh 2018). Se cree que la mantención equilibrada del balance de agua en las plantas halófitas, a pesar de la adición de metales, podría ser una estrategia u adaptación que les permite a estas plantas mejorar la tolerancia a estos elementos (Singh *et al.* 2023). Los resultados concuerdan con otros biomarcadores medidos en el tratamiento 200 μM de Zn, lo que indicaría cierto grado de estrés debido a la acumulación de Zn en su biomasa aérea.

Por otro lado, la integridad y funcionalidad del aparato fotoquímico de *A. vulgatissima* reflejó cierta tolerancia de esta especie frente al aumento individual de los metales Pb y Zn. Es decir, los datos mostraron que el aumento de cada uno de estos metales no produjo un efecto negativo sobre los parámetros Φ_{psII} y Q_y . La plasticidad fisiológica facilita la rápida adaptación de las especies a ambientes fluctuantes, lo que es crucial para las plantas debido a que no pueden moverse hacia sitios con condiciones favorables (Gratani 2014). Por otro lado, los valores de Q_y del tratamiento control fueron cercanos a 0,75 en ambos experimentos. Si bien se espera que en condiciones óptimas el Q_y se encuentre entre 0,8 y 1, puede variar entre las especies. Por ejemplo, un estudio realizado en *P. monspeliensis* utilizando 3 dosis distintas de Zn (0, 100, 300 ppm) con y sin agregado de sal, mostró que las plantas del tratamiento control presentaron valores de Q_y de aproximadamente entre 0,5 y 0,75, en el control con y sin sal, respectivamente (Ouni *et al.* 2016). Aunque diversos estudios han encontrado que tanto el Pb como el Zn

afectan los parámetros fotosintéticos (Mateos-Naranjo *et al.* 2008, 2018; Stefani *et al.* 1991), otros estudios evidenciaron que la integridad y funcionalidad del aparato fotosintético permaneció constante frente al aumento de Zn. Por ejemplo, la medición de estos parámetros en la halófito *Juncus acutus* no indicó modificación frente a distintos niveles de Zn, entre 0 y 100 mM Zn (0 - 100000 μM), cuando esta especie concentró en su biomasa aérea más de 500 mg kg^{-1} (Mateos-Naranjo *et al.* 2014).

Respecto a los pigmentos fotosintéticos, si bien en ambos experimentos se observa una tendencia a disminuir su concentración, solo la adición de Zn generó reducción significativa en las concentraciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides. Esto probablemente se debe a que el Zn es un elemento altamente móvil dentro de las plantas y se transporta más fácilmente a las hojas que el Pb, como se observó en las concentraciones de Zn detectadas en la biomasa aérea y en los valores del índice FBA. Una vez en las hojas, el Zn puede producir cambios en la estructura de los cloroplastos, inhibir enzimas relacionadas a la biosíntesis de clorofila, aumentar la actividad de la enzima clorofilasa y, por lo tanto, reducir la concentración de pigmentos fotosintéticos (Aggarwal *et al.* 2012, Ouni *et al.* 2016, Rai *et al.* 2016). Contrariamente a los resultados obtenidos en ambos experimentos, un estudio realizado en *A. halimus* con los mismos metales mostró que el contenido de clorofila decreció significativamente con el incremento de Pb (0 a 600 μM de Pb), pero no se vio afectado frente al aumento de Zn (0 a 600 μM de Zn) (Bankaji *et al.* 2019).

La tolerancia de las plantas halófitas a los metales está fuertemente relacionada con un sistema antioxidante efectivo, que actúe de manera sinérgica para eliminar las ROS y mejorar o aliviar condiciones estresantes y sus efectos dañinos, siendo la SOD la primera barrera de defensa contra las ROS (Kumari *et al.* 2019). Los resultados obtenidos indicaron que la actividad de la SOD no mostró diferencias entre tratamientos en el experimento de Pb, pero aumentó con la adición de Zn. El aumento en la actividad de la SOD podría explicarse por la acumulación de Zn hallada en las hojas, lo que puede afectar la estructura de la membrana tilacoidal de los cloroplastos y la activación de la clorofila debido a la sustitución de Mg^{+2} por Zn^{+2} en los sitios donde se produce la fotólisis del agua, y en última instancia producir un aumento de las ROS (Kaur y Garg 2021). En consecuencia, el aumento de niveles de SOD podría resultar una ventaja para *A.*

vulgatissima permitiéndole resistir el estrés oxidativo y mantener el sistema de defensa general ante incrementos de Zn. Estudios realizados en plantas de las especies *Lolium perenne* y *Triticum aestivum* L. también han informado un aumento en la SOD en las hojas bajo diferentes concentraciones de Zn (Bonnet *et al.* 2000, Kanwal *et al.* 2016). Por su parte la actividad APx mostró un fenómeno de hormesis, es decir, un efecto estimulante bajo las concentraciones 50 μ M de Pb y 100 μ M Zn, mientras que, en niveles más altos de estos metales, su actividad fue similar al control (Calabrese *et al.* 2007). En tanto la actividad de la GPx no presentó diferencias entre tratamientos de Pb, pero su actividad fue menor frente al tratamiento de 200 μ M de Zn, probablemente debido a su inactivación por acumulación de H₂O₂. El mismo patrón de actividad en la GPx se describió para la halófito *A. halimus* bajo incremento de Zn (Bankaji *et al.* 2019). Se sabe que tanto la deficiencia como el exceso de metales pueden inhibir o estimular la actividad enzimática dependiendo de varios factores como la especie de planta, el tipo de metal y la dosis del mismo, el tiempo de exposición, etc. (Zulfiqar *et al.* 2019, Kaur y Garg 2021). Por otro lado, la actividad CAT mostró una disminución significativa en el tratamiento de 100 μ M Pb. Esta reducción puede atribuirse a la interferencia de los iones de Pb en la síntesis de la enzima o en el ensamblaje de las subunidades de la enzima, o a su degradación debido a los niveles de ROS (Rascio y Nevari-Izzo 2011). Asimismo, se ha descrito que el Pb disminuye la actividad de la CAT y que a su vez es capaz de inactivar más de 100 enzimas debido a que reemplaza otros metales esenciales en metaloenzimas o bien porque interactúa con grupos funcionales del sitio activo de las enzimas (Zulfiqar *et al.* 2019). Rastgoo y Alemzadeh (2011) describieron el mismo patrón de actividad de la CAT en *Aeluropus littoralis* tratada con diversas dosis de Pb. Un estudio realizado con plantas de arroz expuesto a concentraciones similares de Pb indicó que la CAT no cambió en un corto período, pero su actividad disminuyó luego de 96 horas de tratamiento (Thakur *et al.* 2017).

La concentración de MDA aumentó en respuesta a la exposición al Pb y al Zn indicando cierto grado de daño en las membranas biológicas, lo que podría indicar que los mecanismos de desintoxicación no fueron insuficientes (Sharma y Dubey 2005, Kaur y Garg 2021). Se sabe que la disminución, deficiencia o alteración en la actividad enzimática antioxidante podría aumentar las ROS y en última instancia, alterar la integridad de las membranas (Devi y Prasad 2004). En concordancia con los resultados observados en este

subcapítulo, muchos estudios han informado daño en las membranas en diferentes tejidos de las plantas en respuesta al estrés por Pb o Zn (Dey *et al.* 2007, Kaur *et al.* 2015, Kaur y Garg 2021, Ashraf *et al.* 2017, Thakur *et al.* 2017).

Las variaciones morfométricas en la hoja de *A. vulgatissima* asociadas al incremento de Pb o Zn implicaron principalmente variaciones en la esbeltez de la lámina y en la proyección del pecíolo. Se sabe que fenotipos flexibles permiten conservar el potencial adaptativo de las plantas (Gratani 2014), lo que podría ser crucial en especies que habitan ambientes hostiles y cambiantes como las marismas. El AVC mostró que los cambios de forma de la hoja que maximizaron la separación entre los tratamientos de incremento de Pb, implicaron láminas ahusadas; mientras que, en relación al incremento de Zn, se observaron pequeñas proyecciones de la lámina en la zona basal de la hoja indicando formas ligeramente hastadas. Las diferencias en forma de las hojas en respuesta al incremento del Pb se encontraron sobre ambas componentes del AVC, mientras que en relación al incremento de Zn los cambios en forma se reflejaron principalmente a lo largo del VC1, el cual explicó un alto porcentaje de la variación total (74,32%). A su vez, el análisis de conglomerado distinguió 3 grupos significativamente distintos entre tratamientos de Pb, sin observarse un patrón asociado al incremento de Pb; mientras que, para el Zn este análisis distinguió 2 grupos, observándose un gradiente de variación en forma asociado al incremento de Zn. Las variaciones en forma asociadas a estos metales coinciden parcialmente con estudios anteriores realizados en otras especies halófitas, donde los niveles crecientes de metales junto a otros estresores conducen a láminas lanceoladas con pecíolos proyectados (Pollicelli *et al.* 2018; Idaszkin *et al.* 2019, 2023). Aunque esta tesis no aborda los mecanismos específicos o moleculares que explicarían el cambio en la forma de la hoja, posiblemente estos cambios dependan del rol o interferencia de cada uno de estos metales durante el desarrollo foliar. Por otro lado, el largo, ancho y el CS de la hoja de *A. vulgatissima* no se vio afectado por el aumento de Pb, mientras que solo se redujo el largo y CS con el incremento de Zn. La reducción en el tamaño de la hoja frente al nivel 200 μM Zn en la solución de riego, podría explicarse por la pérdida de turgencia debido al bajo contenido de agua, lo que puede a su vez haber inhibido la división y expansión celular durante el crecimiento (Kaur y Garg 2021). Este hallazgo es consistente con varios estudios que han informado una reducción en el tamaño de las hojas u otras estructuras de las plantas, como sépalos, pétalos y

estambres, como una respuesta adaptativa frente a diferentes contaminantes (Syed *et al.* 2008, Veličković 2010, Mateos-Naranjo *et al.* 2013, Vujić *et al.* 2015a, b).

El índice integrador IBRv2, calculado mediante los 10 biomarcadores medidos en las hojas, mostró que la inducción o inhibición dependió de cada biomarcador y del metal utilizado. Además, los biomarcadores utilizados demostraron ser indicadores sensibles y adecuados para evaluar la tolerancia *A. vulgatissima* al Pb y Zn. El tratamiento 100 μ M de Pb exhibió el valor de IBRv2 más bajo, mientras que el 200 μ M Zn mostró el IBRv2 más alto.

Subcapítulo II: *Limonium brasiliense*

3.2. Resultados

3.2.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación

En el experimento de Pb se observó un aumento significativo de su concentración en la biomasa radical y aérea, con el incremento de Pb en solución de riego (ANOVA raíz: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P < 0,05$; Tabla 3.2.1). El índice FBC fue 15 y 27 veces superior a la unidad para los tratamientos 50 y 100 μM Pb, mientras que los valores de los índices FBA y FT fueron < 1 para ambos tratamientos.

En relación al experimento de Zn se encontró que este metal incrementó su concentración en ambos órganos junto con el aumento de la concentración externa de Zn (ANOVA raíz: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P < 0,05$; Tabla 3.2.1). El índice FBA fue 41 y 30 veces superior a la unidad para los tratamientos 100 y 200 μM Zn, y el FT > 1 para ambas dosis de Zn.

Tabla 3.2.1: Media \pm error estándar ($n = 4$ o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo) en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los diferentes tratamientos de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en *L. brasiliense*. Las letras minúsculas (a, b y c) y mayúsculas (A, B, C) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamiento (μM)	[Raíz] ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	[Aéreo] ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	FBC	FBA	FT
Pb 0	2,4 \pm 1,07 c	0,48 \pm 0,05 c	-	-	0,36 \pm 0,09
Pb 50	161 \pm 22,4 b	3,66 \pm 0,25 b	15,5 \pm 2,15	0,35 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
Pb 100	572 \pm 122 a	14,1 \pm 0,12 a	27,0 \pm 5,9	0,67 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01
Zn 0	30,3 \pm 1,22 C	32,9 \pm 1,66 C	-	-	1,1 \pm 0,09
Zn 100	212 \pm 10,64 B	270 \pm 24,01 B	32,51 \pm 1,82	41,3 \pm 3,68	1,28 \pm 0,13
Zn 200	365,4 \pm 40,20 A	398,2 \pm 31,86A	28,5 \pm 3,08	30,5 \pm 2,44	1,13 \pm 0,13

3.2.2. Parámetros de crecimiento

Todas las plantas de *L. brasiliense* sobrevivieron a los tratamientos aplicados de los experimentos de Pb y Zn, aunque se observó una ligera clorosis en hojas del tratamiento 200 μM del experimento de Zn (Fig. 3.2.1). No se registraron diferencias significativas en la biomasa de raíz y aérea entre los tratamientos del experimento con Pb (ANOVA raíz: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.2 A). Por otro lado, en el experimento

con Zn no se observaron diferencias entre tratamientos para la biomasa aérea (ANOVA aéreo: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.2.2 B), pero se registró disminución significativa en la biomasa de la raíz en el tratamiento 200 μM de Zn (ANOVA raíz: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.2.2 B). En ambos experimentos el crecimiento relativo no mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA CR: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA CR: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.2.2 C-D).



Figura 3.2.1: Fotografía de plantas *L. brasiliense* al finalizar el experimento para el experimento de (arriba): Pb 0, 50 y 100 μM Pb y (abajo): Zn 0, 100 y 200 μM Zn.

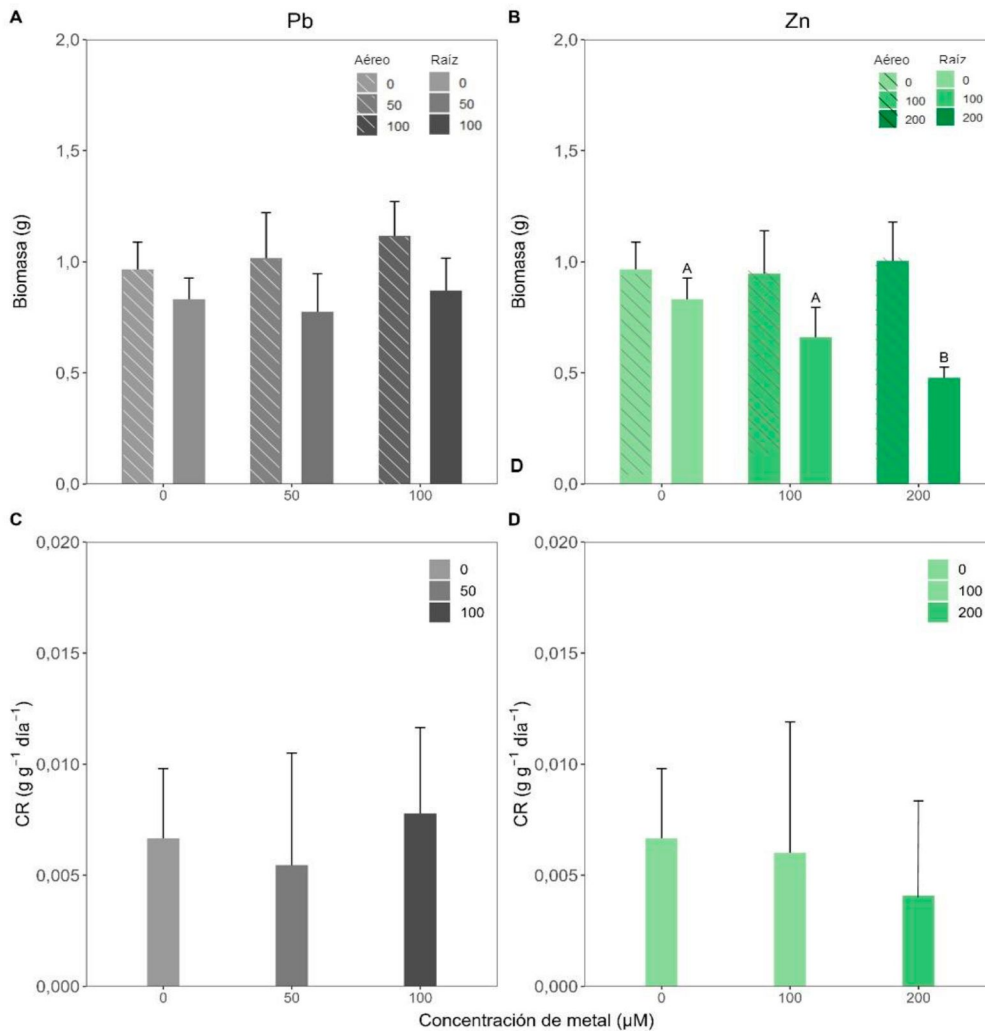


Figura 3.2.2: Parámetros de crecimiento en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n = 10$). Panel izquierdo: tratamientos del experimento Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) Biomasa aérea y raíz y (C, D) crecimiento relativo. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

3.2.3. Parámetros fisiológicos

El contenido CA no varió significativamente entre tratamientos en el experimento con Pb (ANOVA CA: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.3 A); mientras que en el experimento con Zn el CA fue significativamente menor en los tratamientos con Zn que en el control (ANOVA CA: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.2.3 B).

Respecto a los parámetros del fotosistema II, no se encontraron variaciones en el Q_y y Φ_{psII} entre los tratamientos del experimento de Pb (ANOVA Q_y : [Pb], $P > 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.3 C). Por otro lado, en el experimento con Zn en relación al control, el Q_y fue significativamente menor en los tratamientos 100 y 200 μM Zn;

mientras que el Φ_{psII} fue menor en el tratamiento 200 μM Zn (ANOVA Q_y : [Zn], $P < 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.2.3 D).

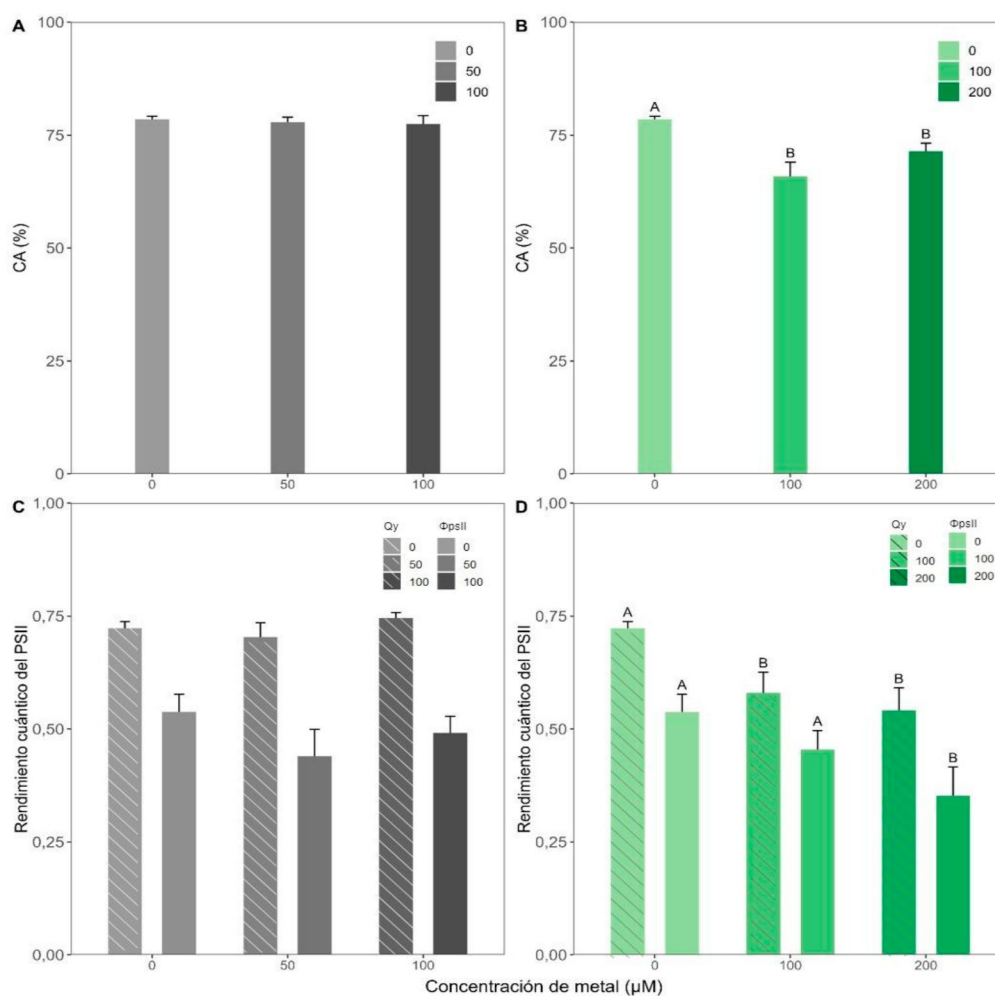


Figura 3.2.3: Parámetros fisiológicos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n = 10$). Panel izquierdo: tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, B) contenido de agua (CA), (C, D) rendimiento cuántico del fotosistema II, donde Φ_{psII} : representa la eficiencia del fotosistema II y Q_y la eficiencia máxima del fotosistema II. Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

3.2.4. Parámetros bioquímicos

En el experimento de Pb la concentración de clorofila a y clorofila b en las plantas del tratamiento 50 μM Pb fue significativamente menor que en el tratamiento control (ANOVA clorofila a: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb], $P < 0,05$; Fig. 3.2.4 A-B); mientras que la concentración de carotenoides no varió entre tratamientos (ANOVA carotenoides: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.4 C). Por otra parte, en el experimento de Zn se observaron concentraciones significativamente menores de clorofila a, clorofila b y

carotenoides en las plantas tratadas con 200 μM Zn (ANOVA clorofila a: $[\text{Zn}]$, $P < 0,05$; ANOVA clorofila b: $[\text{Zn}]$, $P < 0,05$; ANOVA carotenoides: $[\text{Zn}]$, $P < 0,05$; Fig. 3.2.4 D-E-F).

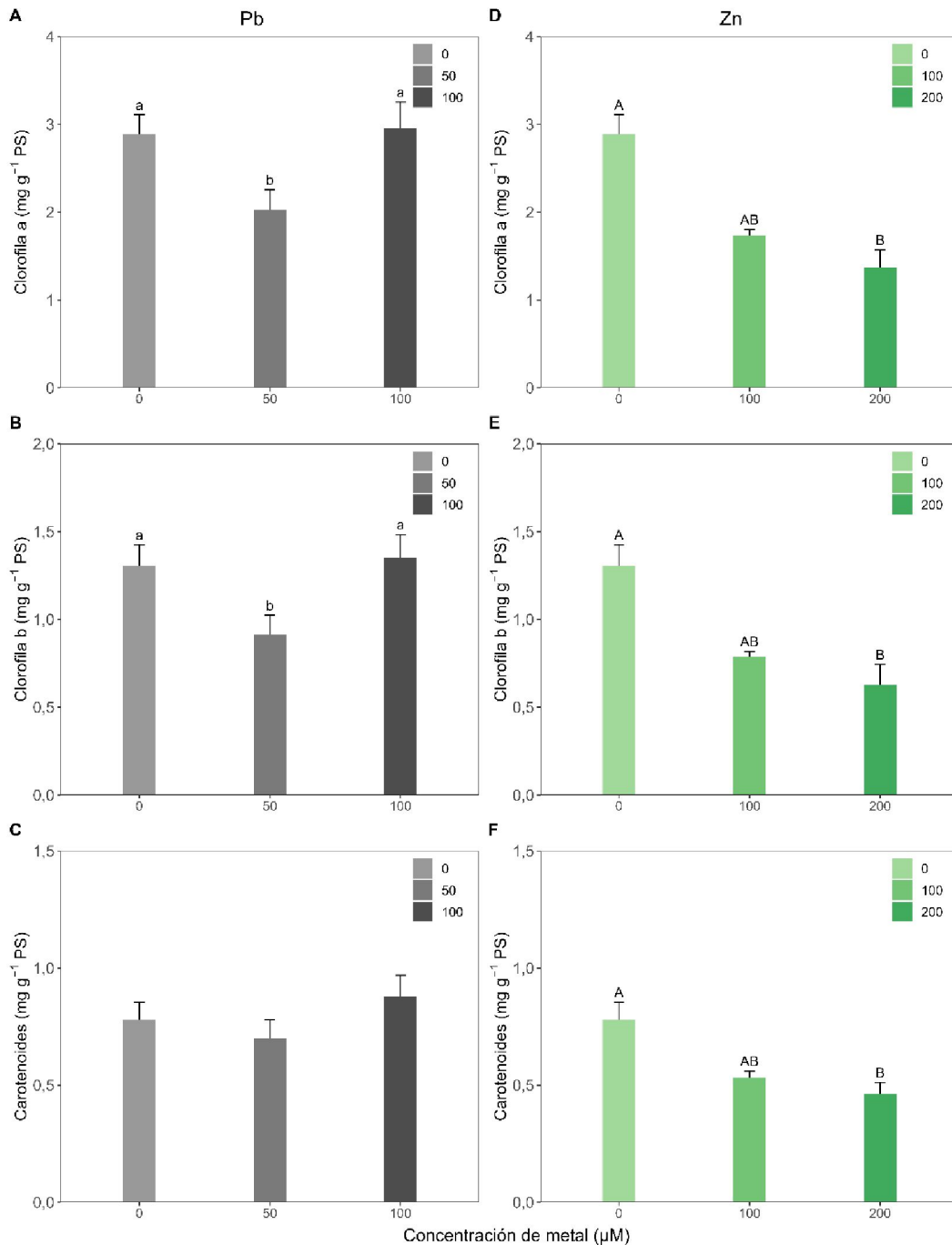


Figura 3.2.4: Concentración de pigmentos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n=10$). Panel izquierdo (A, B, C): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (D, E, F): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Respecto del análisis enzimático en hojas de *L. brasiliense* en ambos experimentos se registró actividad diferencial de acuerdo al tipo de enzima. Para el experimento de Pb no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la actividad de las enzimas SOD, APx y CAT (ANOVA SOD: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA APx: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA CAT: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.5 A-B-D). En cuanto a la enzima GPx, su actividad fue significativamente menor en el control que en los tratamientos 50 y 100 μM Pb (ANOVA GPx: [Pb], $P < 0,05$; Fig. 3.2.5 C).

En cuanto al experimento de Zn, la actividad de las enzimas SOD y CAT no varió significativamente entre tratamientos (ANOVA SOD: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA CAT: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.2.5 E-H). La actividad APx fue mayor en el tratamiento 200 μM Zn (ANOVA APx: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.2.5 F). Por otro lado, la actividad de la enzima GPx fue significativamente mayor en las plantas tratadas con 100 y 200 μM de Zn (ANOVA GPx: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 3.2.5 G).

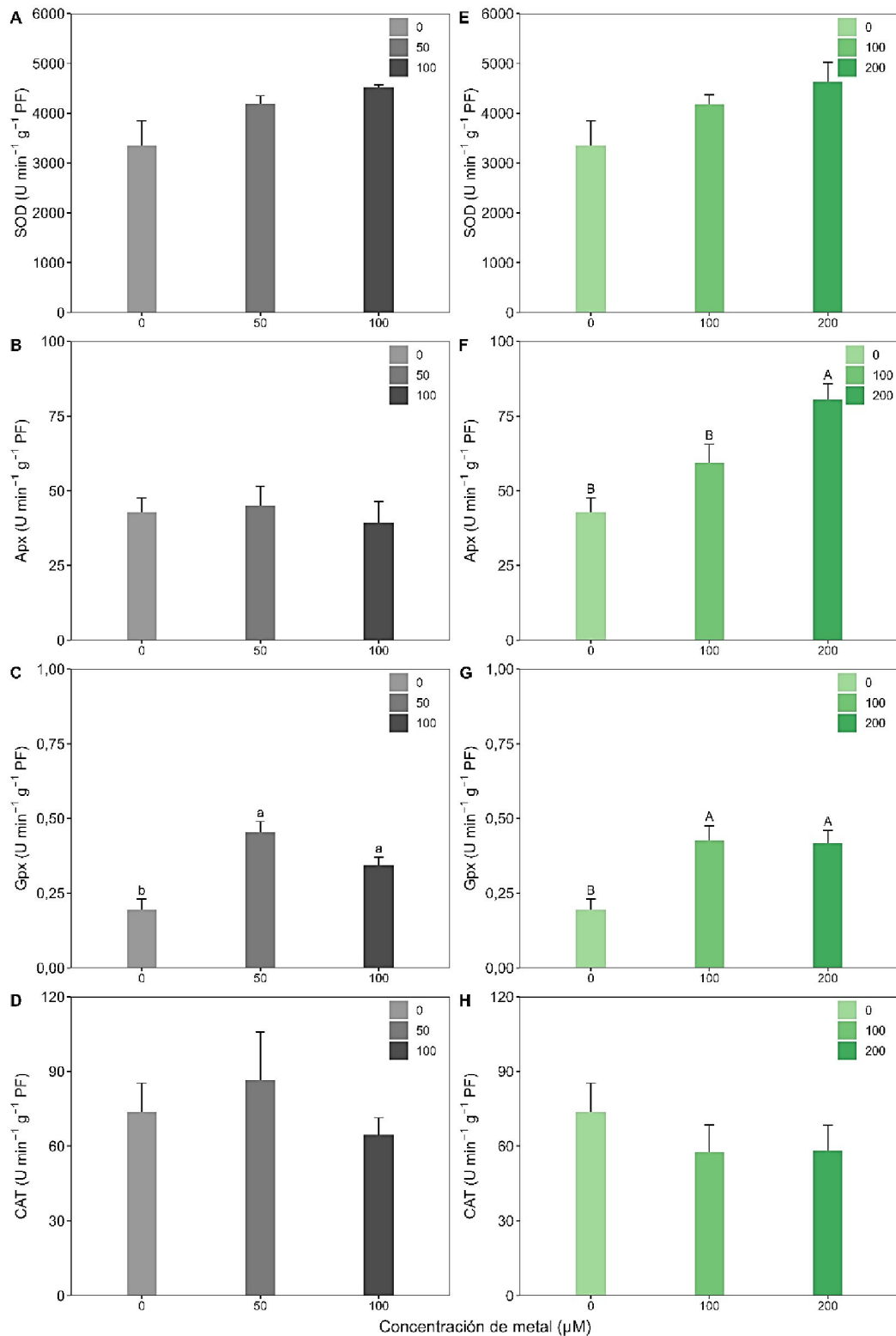


Figura. 3.2.5: Actividad enzimática en hojas de *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n=5$). Panel izquierdo (A, B, C, D): tratamientos del experimento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos del experimento de Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; y (D, H) catalasa, CAT. Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Pb y Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

El daño de membrana cuantificado por el MDA para el experimento de Pb no mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA MDA: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 3.2.6 A). Por otro lado, para el experimento de Zn el MDA fue significativamente mayor en el tratamiento 200 μM Zn (ANOVA MDA: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 3.2.6 B).

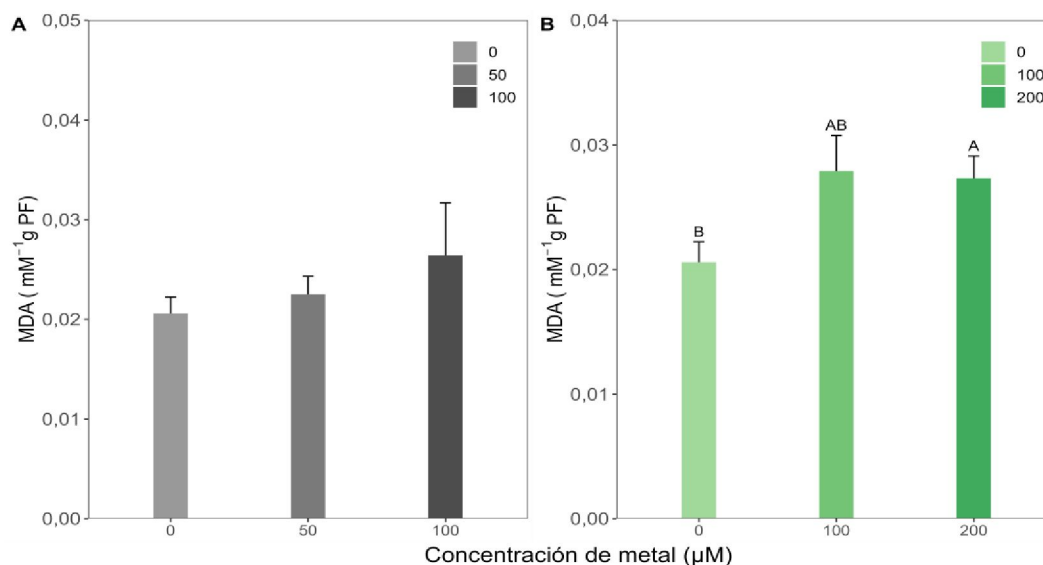


Figura 3.2.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *L. brasiliense* (media \pm error estándar; $n=5$). Tratamientos del experimento (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100, 200 μM Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

3.2.5. Parámetros morfométricos

La regresión alométrica del componente simétrico sobre el tamaño resultó significativa en el experimento de Pb ($P < 0,05$), indicando que solo un 2,76% del total de la variación en forma se debió a la variación en tamaño. Por otro lado, en el experimento de Zn la regresión alométrica también fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$), revelando que solo un 0,26% del total de la variación en forma se debió a la variación en tamaño. Debido a estos porcentajes fueron inferiores al 5% (Zeldicth *et al.* 2004), los subsecuentes análisis de ambos experimentos se realizaron sobre las variables de forma originales.

El diagrama de dispersión del ACP realizado para experimento de Pb indicó que las primeras 2 CPs explicaron un 87,97% de la varianza (CP1: 76,44%, CP2: 11,53%; Fig. 3.2.7 A). El espectro de variación en forma de la hoja estuvo representado por hojas con modificaciones en la esbeltez del limbo y en la proyección del pecíolo. Las hojas que se ubicaron hacia los valores positivos de la CP1 presentaron lámina estrecha con pecíolo proyectado; mientras que las presentes en los valores negativos presentaron pecíolo

retraído y lámina más desarrollada. Por otro lado, la CP2 alojó formas de lámina lanceoladas o ahusadas hacia los valores positivos del eje y formas de lámina globosa en los valores negativos. Por otro lado, la variación explicada por las primeras 2 CPs para el experimento de Zn comprendió el 86,52% del espectro de variación en forma (CP1: 72,52%, CP2: 14,88%; Fig. 3.2.7 B). La CP1 y CP2 expresaron la misma variación en forma hacia los valores positivos y negativos de ambos ejes que el ACP para Pb.

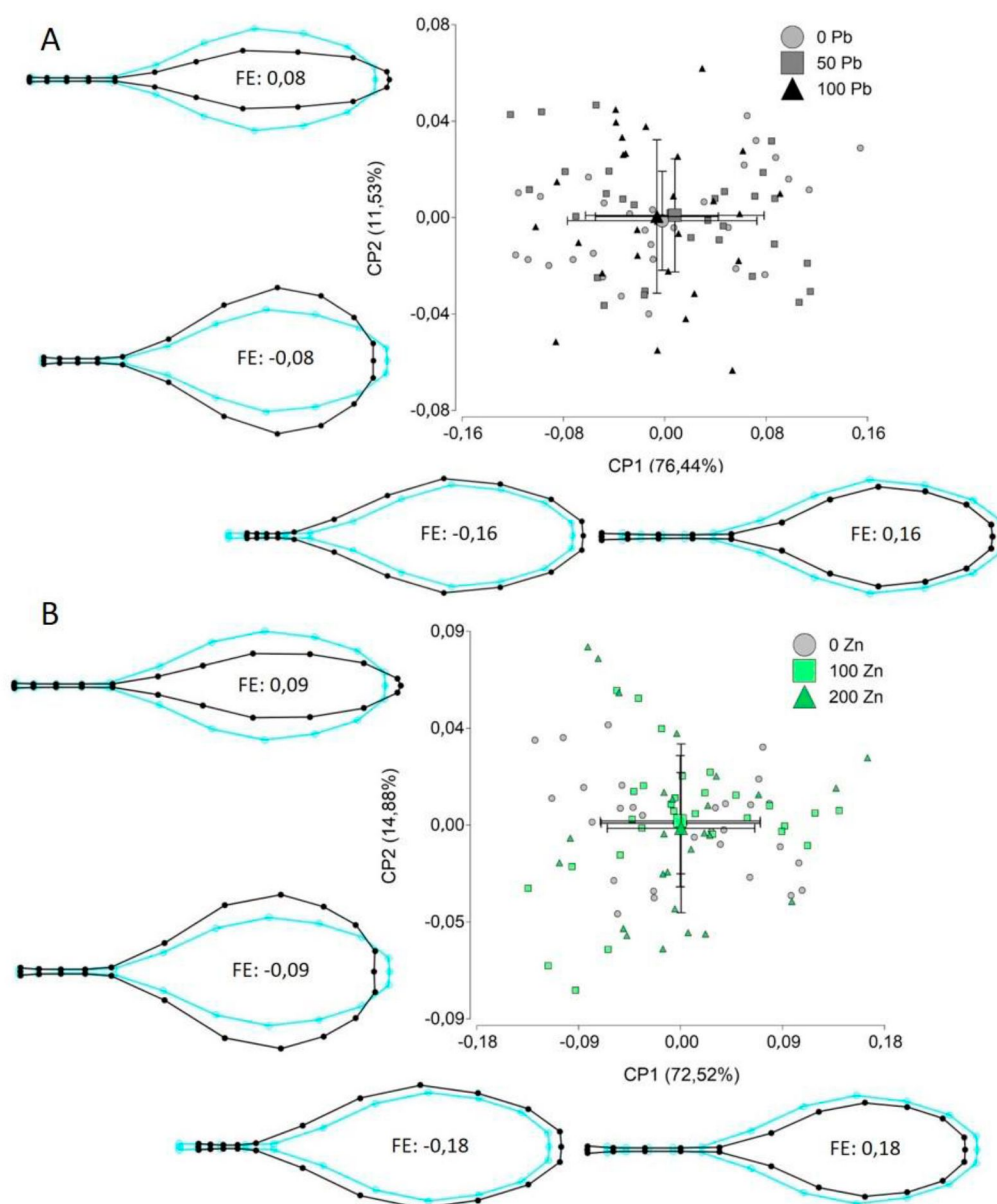


Figura 3.2.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la hoja de *L. brasiliense* para los tratamientos del experimento: (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn), mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. En los márgenes se muestra el cambio en la forma (color negro) de la hoja en superposición del consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado.

El Análisis de Variable Canónicas (AVC) realizado para los tratamientos del experimento de Pb indicó que el eje VC1 explicó un 69,98% de la varianza, en tanto VC2 explicó un 30,03%. El gráfico de dispersión (Fig. 3.2.8 A) evidenció una separación entre los tratamientos de Pb sobre el VC1, exhibiendo un gradiente de variación en forma desde los valores negativos del eje hacia los positivos (0 > 50 > 100 μM Pb). Los valores negativos del eje VC1 presentaron hojas con lámina globosa, mientras que los valores positivos mostraron hojas con lámina levemente ahusada. Por otro lado, para el experimento Zn el VC1 explicó el 61,29% y el VC2 el 38,71% de la varianza (Fig. 3.2.8 B). En este caso, el gradiente entre el control y tratamientos de Zn (0 > 100 > 200 μM Zn) se observó sobre el VC1, desde los valores positivos del eje hacia los negativos. Los valores positivos estaban representados por formas de lámina globosa, mientras que los negativos presentaban láminas más estrechas.

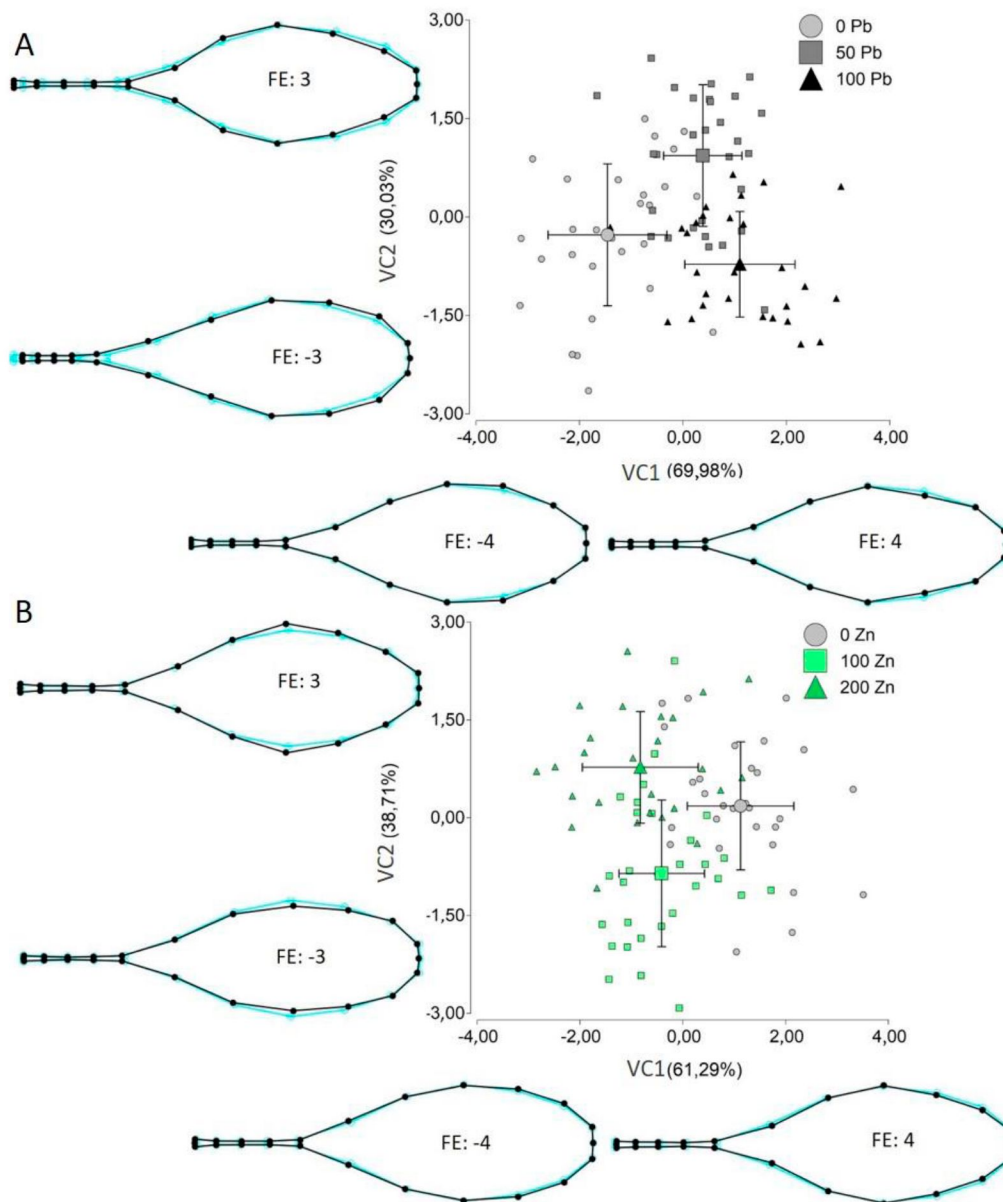


Figura 3.2.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas (AVC) de la forma de la hoja de *L. brasiliense* para los tratamientos del experimento de (A) Pb (0, 50 y 100 μM Pb) y (B) Zn (0, 100 y 200 μM Zn) en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje canónico se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) en superposición al consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP. El factor de escala (FE) es la magnitud del cambio en forma representado por el valor determinado sobre el eje representado.

El MANOVA realizado con las primeras 6 CPs (representando el 99% de la variación total) indicó que no existió un efecto significativo del Pb sobre la forma de las hojas de *L. brasiliense* (Pillai, $P = 0,2514$). Además, el análisis de conglomerado no diferenció grupos según los tratamientos de Pb (Fig. 3.2.9, izquierda). Por otro lado, para el experimento de Zn el MANOVA realizado con las primeras 6 CPs (representando el 99% de la variación total) indicó un efecto significativo del Zn sobre la forma de la hoja entre tratamientos

(Pillai, $P = 0,0111$). En concordancia el análisis de conglomerado distinguió 2 grupos significativamente distintos, correspondientes con 100 y 200 μM Zn, por un lado, y el control por el otro (Fig. 3.2.9, derecha).

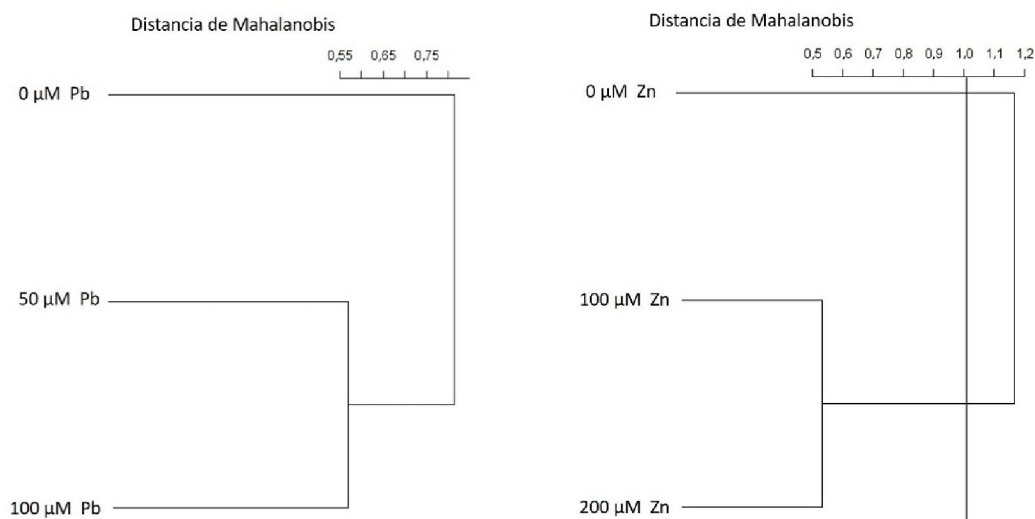


Figura 3.2.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma (n° C Pb= 6; n° C Zn= 6) entre los tratamientos del experimento de Pb (derecha) y Zn (izquierda). La línea vertical se corresponde con un $P = 0,05$.

Con respecto al largo, ancho y CS, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos del experimento de Pb para ninguna de estas variables (ANOVA largo: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA ancho: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA cs: [Pb], $P > 0,05$; Tabla 3.2.2). Por otro lado, las tres variables disminuyeron respecto del control en los tratamientos donde se adicionó Zn (ANOVA largo: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA ancho: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA cs: [Zn], $P < 0,05$; Tabla 3.2.2).

Tabla 3.2.2: Media \pm error estándar (n=10) del largo, ancho y *centroid size* (CS) de hojas de *L. brasiliense* según tratamiento del experimento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y del experimento de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamiento	(μ M)	Largo(mm)	Ancho (mm)	CS
Pb	0	91,01 \pm 2,14	25,37 \pm 0,80	164,6 \pm 3,73
	50	93,55 \pm 2,35	26,44 \pm 0,87	170,07 \pm 4,45
	100	88,25 \pm 3,25	24,79 \pm 0,89	161,19 \pm 5,85
Zn	0	91,01 \pm 2,14 A	25,37 \pm 0,80 A	164,6 \pm 3,73 A
	100	76,65 \pm 2,13 B	23,03 \pm 0,97 AB	139,95 \pm 3,73 B
	200	70,9 \pm 1,95 B	19,91 \pm 0,58 B	131,16 \pm 3,54 B

3.2.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada IBRv2

Respecto al experimento de Pb los valores de IBRv2 fueron de 9,62 y 8,62 para los tratamientos 50 y 100 μ M Pb, respectivamente (Fig. 3.2.10 A-B); mientras que los valores para los tratamientos del experimento de Zn fueron de 14,39 y de 21 para los tratamientos 100 y 200 μ M Zn, respectivamente (Fig. 3.2.10 C-D).

El tratamiento 100 μ M Pb presentó el menor valor de IBRv2 (8,62). En el gráfico de estrellas del tratamiento 50 μ M Pb, se observó incremento de la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT y un aumento en las concentraciones del MDA, al mismo tiempo disminuyó la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos (Fig. 3.2.10 A). En contraposición, en el tratamiento 100 μ M Pb, se visualizó inducción en las enzimas SOD y GPx, y disminución de la actividad CAT, junto al aumento de la concentración de MDA (Fig. 3.2.10 B).

Por otro lado, en el experimento de Zn el tratamiento 200 μ M Zn presentó el mayor valor de IBRv2 (21). Este valor se explicó por inhibición marcada de los biomarcadores relacionados al aparato fotosintético (pigmentos y parámetros de la fluorescencia) y de la enzima CAT, junto a la inducción prominente de la actividad de las enzimas SOD, APx y GPx y de las concentraciones de MDA. Por otro lado, para el tratamiento 100 μ M Zn el gráfico exhibió inducción de las enzimas SOD, APx y GPx e inhibición en la enzima CAT, junto con un aumento de las concentraciones del MDA, al mismo tiempo que se redujo la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos.

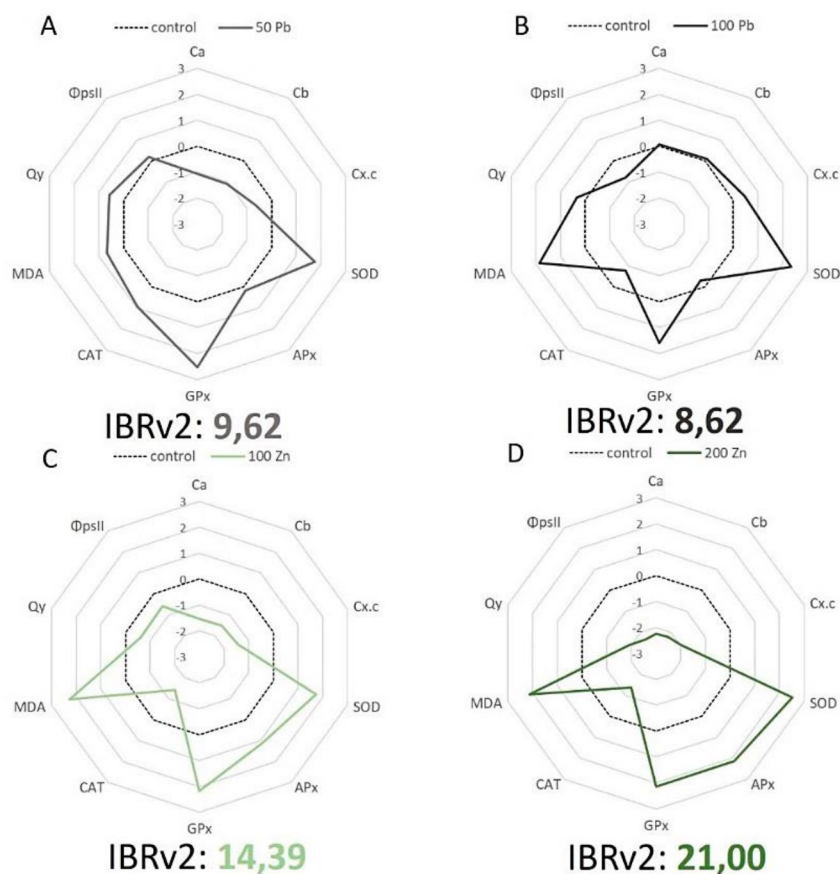


Figura 3.2.10: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos del experimento de Pb: (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, y Zn: (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *L. brasiliense*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb, verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcador respecto al control.

3.2.7. Discusión

La prevalencia de la contaminación por metales, entre ellos Pb y Zn, se ha convertido en un motivo de gran preocupación a nivel mundial. Esta problemática ambiental ha requerido del desarrollo de metodologías efectivas para la detección y control, así como la formulación de estrategias sostenibles para mitigar el impacto de dichos contaminantes. Estudios recientes demostraron la capacidad de *L. brasiliense* para fitoestabilizar Cu y Pb, y su potencialidad para monitorear áreas contaminadas por estos metales (Gibilisco *et al.* 2020, 2022; Idaszkin *et al.* 2019, 2023). En base a estos antecedentes se llevaron a cabo dos experimentos para determinar la capacidad de *L. brasiliense* para acumular Pb y Zn, cuando son aplicados individualmente, y evaluar su

tolerancia a estos metales mediante diferentes respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas, como biomarcadores de estrés.

Los resultados de ambos experimentos muestran que *L. brasiliense* acumuló Pb y Zn de manera diferencial en sus órganos. La mayor concentración de Pb se observó en las raíces y solo una pequeña proporción fue transportada hacia la biomasa aérea de la planta; mientras que el Zn se acumuló en ambos órganos, pero se concentró principalmente en la biomasa aérea. El patrón de acumulación del Pb en las raíces se reflejó en el índice FBC, el cual superó 15 y 18 veces la unidad en los tratamientos 50 y 100 μM Pb, respectivamente; al mismo tiempo que los índices FBA y FT fueron menores a una unidad. Las concentraciones de Pb alcanzadas en ambos órganos de *L. brasiliense* excedieron ampliamente los requerimientos “esenciales” y sobrepasaron los niveles fitotóxicos tanto en las raíces como en las hojas (Kramer *et al.* 2010, Kabata-Pendias 2011). En concordancia con estos resultados, Idaszkin y colaboradores (2019) encontraron que *L. brasiliense* acumula Pb mayormente en sus raíces cuando fue expuesta a un rango similar concentraciones de Pb (0, 45 y 90 μM Pb). Asimismo, *Limoniastrum monopetalum* (Manousaki *et al.* 2014), *Tamarix smyrnensis* (Kadukova y Kalogarakis 2007) y *Brassica juncea*, *Iris lactea* var. *chinensis* e *Iris tectorum*, mostraron el mismo patrón de acumulación de Pb (Han *et al.* 2008). Por lo tanto, *L. brasiliense* podría potencialmente utilizarse para fitoestabilizar Pb (Anjum *et al.* 2014).

En cuanto al Zn, el tratamiento control presentó niveles dentro del rango aceptable ($<50 \mu\text{g g}^{-1}$), mientras que las plantas de los tratamientos 100 y 200 μM Zn alcanzaron concentraciones aproximadamente entre 5 a 7 veces más altas, respectivamente, que los límites permisibles ($>60 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) (Aziz y Mujeeb 2022). Además, las concentraciones de Zn en ambos órganos del tratamiento 200 μM Zn superaron los $300 \mu\text{g g}^{-1}$, alcanzando valores dentro del rango fitotóxico para las plantas en general ($100\text{-}500 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) (Davis y Beckett 1978, Kabata-Pendias 2011, Aziz y Mujeeb 2022). Por otro lado, la disminución del FBC y el FBA cercana al 27% al duplicar la concentración de Zn (es decir, de 100 a 200 μM Zn), sugiere que *L. brasiliense* utiliza mecanismos que restringen el transporte y la acumulación de Zn cuando la planta alcanza su capacidad máxima de acumulación. En general, la disminución de estos índices refleja una respuesta biológica de la planta para regular y restringir la absorción y acumulación del metal, asegurando

así el mantenimiento en la homeostasis y previniendo posibles efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que *L. brasiliense* presenta una tolerancia elevada frente a este metal y sugieren que potencialmente podría utilizarse para fitoestabilizar y/o fitorremediar Zn.

Todas las plantas de *L. brasiliense* sobrevivieron a los tratamientos de ambos experimentos, y no se encontró evidencia de reducción significativa de la biomasa y de la tasa de crecimiento relativo. Sin embargo, es importante señalar que ocurrieron cambios a nivel fisiológico y bioquímico como respuesta a la acumulación de Zn, lo cual podría haber desempeñado un papel importante en la tolerancia observada y en el caso de algunos biomarcadores indicar cierto grado de estrés. En discrepancia con los resultados observados para la biomasa entre tratamientos de Pb, Idaszkin y colaboradores (2019) mostraron que *L. brasiliense* experimentó una reducción significativa en esta variable cuando acumulaba Pb en sus raíces. Las diferencias halladas podrían atribuirse a la procedencia de las plantas y/o a la edad de las mismas. Por otro lado, numerosos estudios realizados en diversas especies vegetales han mostrado que un aumento en las concentraciones de Zn inhibe el crecimiento general, afectando negativamente diversos parámetros de crecimiento (Bonnet *et al.* 2000, Sagardoy *et al.* 2009, Luo *et al.* 2010, Balafrej 2020). En síntesis, *L. brasiliense* mostró tolerar la presencia de Pb en sus raíces y de acumular Zn principalmente en su biomasa aérea, sin que se vea afectado su crecimiento.

Por otra parte, el contenido de agua en *L. brasiliense* no se vio afectado por el incremento de Pb, pero disminuyó significativamente en el experimento de Zn frente a los niveles más altos de este metal. Este resultado concuerda con otros biomarcadores medidos en el tratamiento 200 μM de Zn, los cuales indicaron cierto grado de estrés cuando el Zn es acumulado en sus hojas. En este sentido, se conoce que uno de los efectos generales producidos por los metales a nivel fisiológico es la disminución del contenido de agua (Kabata-Pendias 2011) y que en particular niveles altos de Zn en la biomasa aérea de una planta pueden producir perturbaciones en las relaciones hídricas y disminuir el CA (Garg y Singh 2018). Por otro lado, Singh y colaboradores (2023) señalan que una estrategia de las plantas halófitas para mejorar la tolerancia al estrés generado por los metales podría implicar mantener el contenido de agua apropiado. Posiblemente cuando *L. brasiliense*

es sometida a una concentración elevada de Zn (100 y 200 μM) se altera el potencial osmótico y de esta manera disminuye el contenido de agua en las hojas.

De igual manera, los resultados revelaron daño en el PSII en las plantas del tratamiento 200 μM del experimento de Zn, mientras que el Pb no produjo cambio en estos parámetros. En este sentido, como señalan diversos estudios uno de los primeros indicios de estrés por Zn en las hojas es el daño producido al fotosistema II (PSII) seguido de la fotoinhibición (Monnet *et al.* 2001, Vaillant *et al.* 2005, Mateos-Naranjo *et al.* 2008). Como se mencionó anteriormente, *L. brasiliense* exhibe la capacidad de translocar elevados niveles de Zn hacia su biomasa aérea. Cuando el Zn es trasladado desde las raíces hacia las hojas, puede concentrarse en diversas estructuras como los cloroplastos, vacuolas, tricomas, paredes celulares y membranas (Tinker 1981, Zhao *et al.* 2000, Kupper *et al.* 2004, Palmer y Guerinot 2009, Kabata-Pendias 2011, Nouet *et al.* 2011). Numerosos estudios han determinado que el Zn interactúa con diversos sitios del PSII, desencadenando la inhibición de la fotosíntesis, disminuyendo la eficiencia del PSII y en última instancia, deteniendo el crecimiento de la planta (Wang y Jin 2005, Luo *et al.* 2010, Huang *et al.* 2019). Por otro lado, el valor de Q_y fue más elevado en las plantas del tratamiento control, presentando valores cercanos a 0,8, lo cual indicaría que se encuentran dentro del rango óptimo considerado para plantas sin estrés (Anderson *et al.* 1997). Contrariamente, las plantas tratadas con Zn mostraron disminución en los valores de Q_y , lo cual podría atribuirse a una reducción en la proporción de centros de reacción abiertos, lo que denota un impacto negativo del Zn en el funcionamiento normal del PSII y/o daño en alguna de las estructuras que lo componen. Diversos estudios han reportado resultados similares en especies como *Lolium perenne*, *Polypogon monspeliensis*, *Miscanthus giganteus* y *Datura sp.* (Bonnet *et al.* 2000, Vaillant *et al.* 2005, Ouni *et al.* 2016, Andrejić *et al.* 2018).

Respecto a los pigmentos fotosintéticos, la concentración de clorofilas a y b fue menor en el tratamiento 50 μM en el experimento de Pb. En contraposición, otros estudios realizados en esta misma especie indicaron reducción de estos mismos pigmentos frente niveles más altos de este metal en solución (90 μM Pb) (Idaszkin *et al.* 2019). Por otro lado, en el experimento de Zn la reducción de la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides fue mayor en el tratamiento 200 μM Zn. Además, se vio que las plantas

de este tratamiento mostraron signos de clorosis, lo que concuerda con una disminución del contenido de pigmentos y disrupción en el aparato fotosintético. Los pigmentos fotosintéticos forman parte del complejo proteico captador de luz (LHCP, por sus siglas *Light-Harvesting Complex Protein*) y desempeñan un papel en la protección del sistema fotosintético, permitiendo que la planta se aclimate y evite el estrés fotooxidativo (Farage *et al.* 2006, Lambers *et al.* 2008). Por lo tanto, la disminución en la concentración de pigmentos podría estar reduciendo el flujo de electrones hacia la cadena transportadora de electrones, lo cual explicaría la reducción de los parámetros fotosintéticos discutidos en el párrafo anterior. Los hallazgos de este subcapítulo concuerdan con estudios previos que han informado disminución del contenido de pigmentos en respuesta al aumento de las concentraciones de Zn, lo que respalda la idea de que la acumulación de Zn puede alterar la síntesis de pigmentos y en última instancia, afectar el rendimiento fotosintético (Sagardoy 2009, Mateos-Naranjo *et al.* 2014, Ouni *et al.* 2016).

En relación a la actividad de las enzimas antioxidantes, los resultados del experimento de Pb mostraron que el incremento de este metal solo produjo un aumento en la actividad GPx. Un patrón de actividad similar fue encontrado en esta especie cuando se la sometió a concentraciones similares de Pb (0, 45 y 90 μM Pb) (Idaszkin *et al.* 2019). Por otro lado, frente al incremento Zn las enzimas GPx y APx mostraron aumento en su actividad. Se sabe que la APx juega un papel crucial en el ciclo ascorbato-glutamato en el cloroplasto, que es responsable de regenerar antioxidantes y proteger a la planta del estrés oxidativo causado por ROS (Mittler 2002). Este fenómeno podría desempeñar un papel importante en los mecanismos defensivos contra la toxicidad del Zn en *L. brasiliense*. En concordancia con otros estudios en otras especies han demostrado que la actividad de GPx, APx y SOD aumentó debido al estrés causado por Zn (Prasad *et al.* 1999, Bonnet *et al.* 2000, Luo *et al.* 2010).

De acuerdo con otros parámetros fisiológicos y bioquímicos medidos, la concentración de MDA sólo aumentó en respuesta a la exposición al Zn indicando cierto daño en las membranas biológicas. Esto podría deberse a que cuando las plantas absorben y acumulan los metales en sus tejidos, como se explicó anteriormente el PSII puede verse afectado y producir un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden potencialmente causar estrés oxidativo produciendo daño a las membranas

biológicas (Foyer y Noctor 2000). Además, cualquier disminución, deficiencia o alteración en la actividad enzimática antioxidante puede producir incremento de ROS y en última instancia, alterar la integridad de las membranas (Devi y Prasad 2004). Al igual que los resultados observados, muchos estudios han informado daño en las membranas en diferentes tejidos de las plantas en respuesta al estrés por Zn (Kaur y Garg 2021). Estos resultados sugieren que *L. brasiliense* tiene gran capacidad para tolerar el Pb acumulado en sus raíces sin que se produzca estrés oxidativo, mientras que las enzimas antioxidantes u otros mecanismo anti-ROS quizá no resulten suficientes, cuando esta especie acumula Zn en su biomasa aérea.

El morfoespacio descrito por el ACP para ambos experimentos, indicó cambios en la esbeltez del limbo y en la proyección del pecíolo. En este sentido se sabe que los cambios en la forma y el tamaño de las hojas producen un equilibrio entre los requisitos fisiológicos y/o anatómicos de las plantas, afectando la absorción de energía, el intercambio de gases (CO₂ y O₂), el equilibrio hídrico, la producción de clorofila y la termorregulación (Nicotra *et al.* 2011, Fritz *et al.* 2018, Zoulias *et al.* 2018). Varios estudios han demostrado que el rasgo “forma” es un carácter plástico y que la forma final es el resultado de un equilibrio entre la absorción de energía y la minimización del daño producido por diversos factores estresantes (Scoffoni *et al.* 2011, Giupponi 2020). En relación a esto, los ACVs mostraron que el aumento de las concentraciones, tanto de Pb como de Zn, se asoció con hojas de lámina levemente ahusada y con pecíolo proyectado. Sin embargo, el análisis de conglomerado no diferenció grupos asociados al incremento de Pb; mientras que en referencia al Zn mostró dos grupos, en los cuales se diferenciaba el control de los tratamientos con Zn. Esta forma de hoja “ahusada o lanceolada” fue descrita en *L. brasiliense* en respuesta al aumento de Pb y otros estresores como la sal, en condiciones experimentales (Idaszkin *et al.* 2019, 2023). El aumento de los niveles de metal, Pb o Zn, parece desencadenar en *L. brasiliense* respuestas similares a otros estresores ampliamente estudiados en otras especies. Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* mostró alargamiento del pecíolo e inhibición de la expansión de la lámina para evitar la deficiencia de luz o sombra (Tsukaya 2005, 2006). Por otro lado, en el caso del Zn, las variaciones en la forma de las hojas fueron acompañadas por una reducción en el largo, ancho y CS de las mismas. En este sentido varios estudios mostraron reducción en el tamaño de las hojas u otras estructuras de las plantas, como sépalos, pétalos y estambres,

en respuesta a diferentes contaminantes (Syed *et al.* 2008; Veličković 2010; Vujić *et al.* 2015a, b).

Finalmente, el índice integrador IBRv2, calculado a partir de los 10 biomarcadores medidos en las hojas, reveló que la inducción o inhibición, dependió tanto de la clase de biomarcador como del metal y su concentración. Además, se vio que todos los biomarcadores probados resultaron ser herramientas sensibles y apropiadas para evaluar la toxicidad de Pb y Zn en *L. brasiliense*. Comparativamente, el tratamiento 100 μM de Pb exhibió el valor de IBRv2 más bajo, mientras que el 200 μM Zn mostró el IBRv2 más alto. Esto indicaría que el tratamiento 200 μM Zn experimentó mayor grado de estrés y por lo tanto presentó mayor cambio en los parámetros medidos.

CAPÍTULO

Evaluación del incremento combinado de Pb y Zn
en *Limonium brasiliense* y *Atriplex vulgatissima*.



Introducción

Los metales como el Pb y Zn suelen encontrarse juntos en sitios impactados por diversas actividades antrópicas (Sun *et al.* 2005, Wuana *et al.* 2011, Huang *et al.* 2017, Woch *et al.* 2017, Chang Kee *et al.* 2018, Křibek *et al.* 2019, Zhao *et al.* 2020). Además, desde el punto de vista geoquímico el Pb está estrechamente asociado al Zn y aproximadamente el 63% del Pb producido procede de minerales de Pb y Zn (Sindelar 1987, Kabata-Pendias 2011). Esto impulsa la necesidad de la búsqueda de biotecnologías que aborden la presencia conjunta de estos metales.

Por otro lado, se sabe que la habilidad de una planta para acumular un determinado metal podría depender de la presencia de otros metales en el medio, es decir, que los metales pueden interactuar, presentando sinergia o antagonismo entre ellos (Baker y Brooks 1989, Pålsson 1989). Además, los efectos producidos a nivel fisiológico, morfológico y/o bioquímico en las plantas debido a la presencia simultánea de dos o más metales pueden ser diferentes al efecto de la presencia individual (Pålsson 1989). Numerosos estudios realizados en relictos de minas y otras áreas contaminadas por estos dos metales, entre ellas marismas, han estudiado como las plantas presentes interactúan con el Pb y Zn y describen patrones de acumulación especie- y metal-específico (Brunetti *et al.* 2009, Wójcik *et al.* 2014, Idaszkin *et al.* 2017, Blaylock 2020, Hasnaoui *et al.* 2020, Zhao *et al.* 2020, Roe *et al.* 2021, Alam *et al.* 2023).

El uso de plantas con capacidad para absorber, acumular y/o estabilizar metales representa una técnica ecológica y de bajo costo, utilizada ampliamente para remediar sitios contaminados (Anjum *et al.* 2014, Khalid *et al.* 2017, Pandey y Bajpai 2019). En relación a esto, resulta necesario estudiar la capacidad de especies de plantas para tolerar y acumular metales, de modo de poseer la información adecuada para establecer estrategias de remediación efectivas (Reeves *et al.* 2018).

En el presente capítulo se presentan y discuten los resultados referentes a los experimentos de incremento conjunto de Pb y Zn para las especies *A. vulgatissima* y *L. brasiliense*, y correspondientes al objetivo específico II: Cuantificar y comparar la acumulación de Pb y Zn en la biomasa aérea y radical de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* sometidas a diferentes concentraciones combinadas de Pb y Zn, y evaluar la tolerancia

de cada especie a través de parámetros de crecimiento y distintas respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfométricas asociadas al aumento combinado de dichos metales.

Subcapítulo I: *Atriplex vulgatissima*

3.1. Resultados

3.1.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación

No se encontró efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn sobre la concentración de Pb y Zn, ni en la raíz, ni en la biomasa aérea de *A. vulgatissima* (ANOVA raíz: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$). En cambio, si se encontró un efecto significativo de los factores principales Pb y Zn sobre la concentración de estos dos metales tanto en la raíz como en la biomasa aérea (ANOVA raíz: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA raíz: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P < 0,05$; Tabla 4.1.1).

Respecto al Pb, se observó que independientemente de la concentración de Zn en la solución, *A. vulgatissima* acumuló significativamente más Pb, tanto en la raíz como en la biomasa aérea, en los tratamientos con Pb en solución de riego (Tabla 4.1.1). El FBC fue cercano a 10 en los tratamientos con 50 μM Pb y cercano a 6 en los tratamientos con 100 μM Pb. El índice FBA solo superó la unidad en los tratamientos con Pb en combinación con 100 μM Zn; mientras que el FT fue menor a la unidad en todos los tratamientos (Tabla 4.1.1).

Por otro lado, la concentración de Zn fue mayor en ambos órganos de las plantas de todos los tratamientos con Zn respecto del control, independientemente de la concentración de Pb en solución de riego (Tabla 4.1.1). Los índices FBC y FBA siempre superaron ampliamente la unidad (entre 20 y 67), mientras que el FT fue mayor a la unidad en las plantas de los tratamientos que contenían únicamente Zn (100 o 200 μM Zn) y en las del tratamiento 100 μM Pb + 200 μM Zn (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb (arriba) y Zn (abajo), en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los 9 tratamientos resultantes de la combinación de los factores: Pb (0, 50, 100 μ M Pb) y Zn (0, 100 y 200 μ M). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas según el efecto principal Pb o Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamientos		Concentración Pb (μ g g ⁻¹ PS)		FBC	FBA	FT
Pb	Zn	Raíz	Aéreo			
0	0	9,81 \pm 6,64	1,25 \pm 0,37	-	-	0,27 \pm 0,08
	100	3,54 \pm 1,44	0,92 \pm 1	-	-	0,37 \pm 0,07
	200	11,1 \pm 6,21	1,55 \pm 0,18	-	-	0,30 \pm 0,08
50	0	120,7 \pm 25,93	15,2 \pm 6,71	11,6 \pm 2,5	1,44 \pm 0,64	0,27 \pm 0,09
	100	110 \pm 16	26,3 \pm 7,84	10,6 \pm 1,54	2,53 \pm 0,75	0,22 \pm 0,06
	200	111 \pm 40	8,49 \pm 1,72	10,7 \pm 3,83	0,82 \pm 0,16	0,14 \pm 0,06
100	0	130,2 \pm 18,20	41 \pm 22,4	6,3 \pm 0,88	1,97 \pm 1,08	0,28 \pm 0,11
	100	126 \pm 22	70,3 \pm 27,1	6,07 \pm 1,05	3,39 \pm 1,30	0,59 \pm 0,22
	200	148 \pm 29	16,4 \pm 5,32	7,13 \pm 1,39	0,78 \pm 0,26	0,10 \pm 0,01
Tratamientos		Concentración Zn (μ g g ⁻¹ PS)		FBC	FBA	FT
Zn	Pb	Raíz	Aéreo			
0	0	45,9 \pm 5,95	26,7 \pm 6,04	-	-	0,56 \pm 0,11
	50	56,1 \pm 10,7	29,2 \pm 6,87	-	-	0,52 \pm 0,04
	100	48 \pm 9,32	48,5 \pm 11,5	-	-	0,8 \pm 0,25
100	0	258 \pm 20,04	269,5 \pm 28,7	39,5 \pm 3,12	41,3 \pm 4,39	1,12 \pm 0,24
	50	483 \pm 104	247 \pm 31,9	67,2 \pm 15,9	37,8 \pm 4,88	0,66 \pm 0,14
	100	275 \pm 23,5	374 \pm 44	42,1 \pm 3,59	57,4 \pm 6,74	1,38 \pm 1,61
200	0	327 \pm 74,5	287,7 \pm 18	25,1 \pm 5,72	22 \pm 1,38	1,1 \pm 0,25
	50	345 \pm 48,9	284 \pm 23,9	26,4 \pm 3,74	21,7 \pm 1,83	0,92 \pm 0,17
	100	396 \pm 51,6	325 \pm 38,8	30,3 \pm 3,95	24,9 \pm 2,97	0,83 \pm 0,08

3.1.2. Parámetros de crecimiento

Todas las plantas de *A. vulgatissima* sobrevivieron a los tratamientos sin manifestar daños visibles y/o signos de clorosis (Fig. 4.1.1). Además, para la raíz y biomasa aérea, no hubo efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn (ANOVA raíz: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$), ni de los efectos principales Pb y Zn (ANOVA raíz: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P > 0,05$; Fig. 4.1.2 A-B; ANOVA raíz: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.2 D-E). Del mismo modo para el crecimiento relativo no se registró efecto significativo de la interacción entre los metales Pb y Zn (ANOVA CR: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$), ni de los efectos principales Pb (ANOVA CR: [Pb], $P > 0,05$ Fig. 4.1.2 C) y Zn (ANOVA CR: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.2F).



Figura 4.1.1: Fotografía de plantas *A. vulgatissima* seleccionadas aleatoriamente al finalizar el experimento para cada uno de los tratamientos.

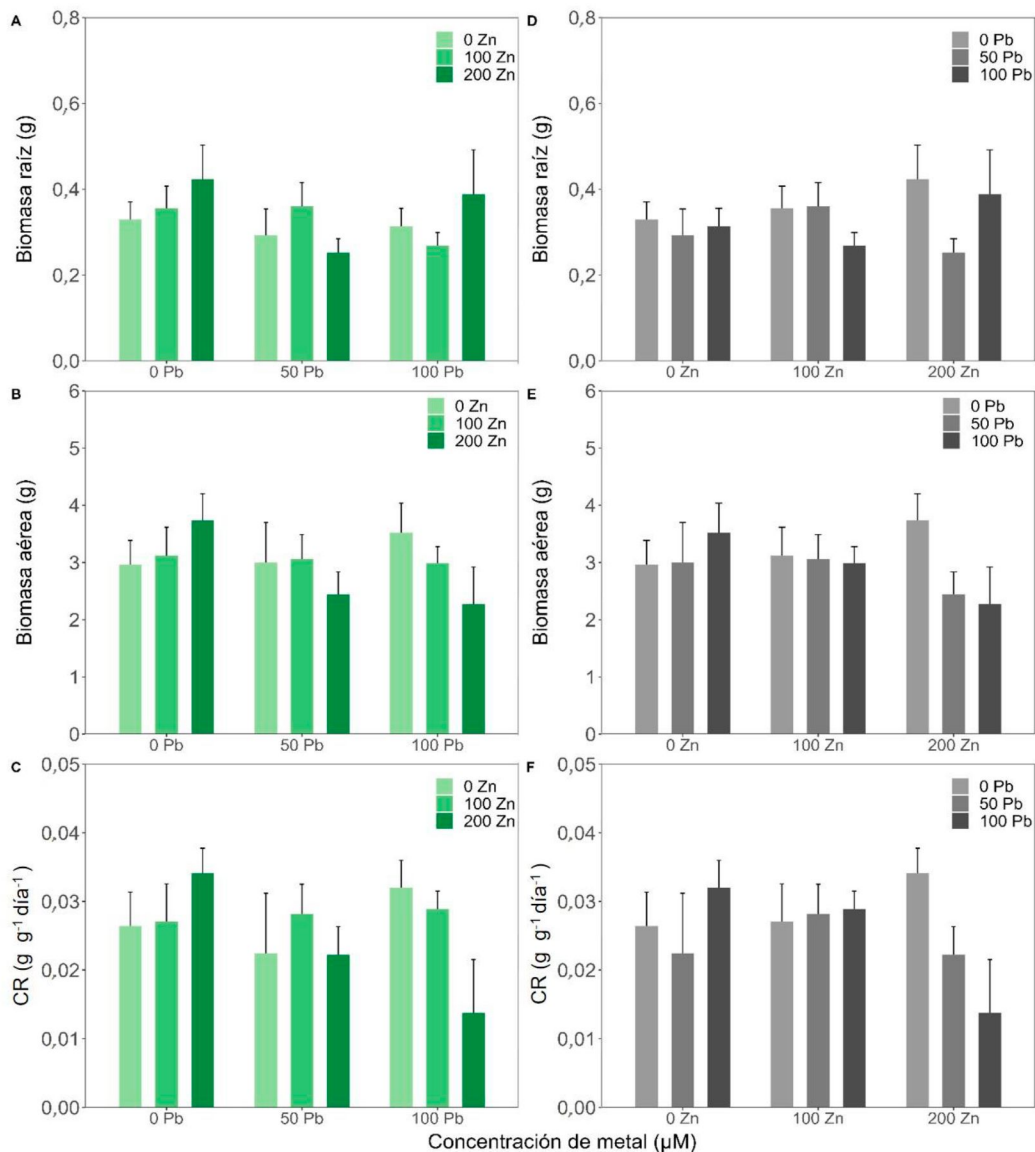


Figura 4.1.2: Parámetros de crecimiento en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n=10$). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) Biomasa raíz, (B, E) biomasa aérea y (C, F) crecimiento relativo.

3.1.3. Parámetros fisiológicos

No se encontró efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn sobre el CA (ANOVA CA: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$). No obstante, se observó un efecto del factor principal Zn (ANOVA CA: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 4.1.3 D), indicando menor CA en el tratamiento 200 μM Zn. Por otro lado, ninguno de parámetros relativos a la eficiencia del fotosistema II mostraron efecto significativo de la interacción entre el Pb y Zn (ANOVA Φ_{psII} : [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA Q_y : [Pb]*[Zn], $P > 0,05$). Para el Q_y tampoco hubo efecto de los factores principales (ANOVA Q_y : [Pb], $P > 0,05$; ANOVA Q_y : [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.3 B-E); mientras que para el parámetro Φ_{psII} se registró un efecto significativo de ambos factores

principales (ANOVA Φ_{psII} : [Pb], $P < 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Zn], $P < 0,05$; Fig. 4.1.3 C-F). El Φ_{psII} fue menor para los tratamientos 50 μM Pb, independientemente del nivel Zn; mientras que según el efecto principal Zn fue menor en los tratamientos 200 μM Zn.

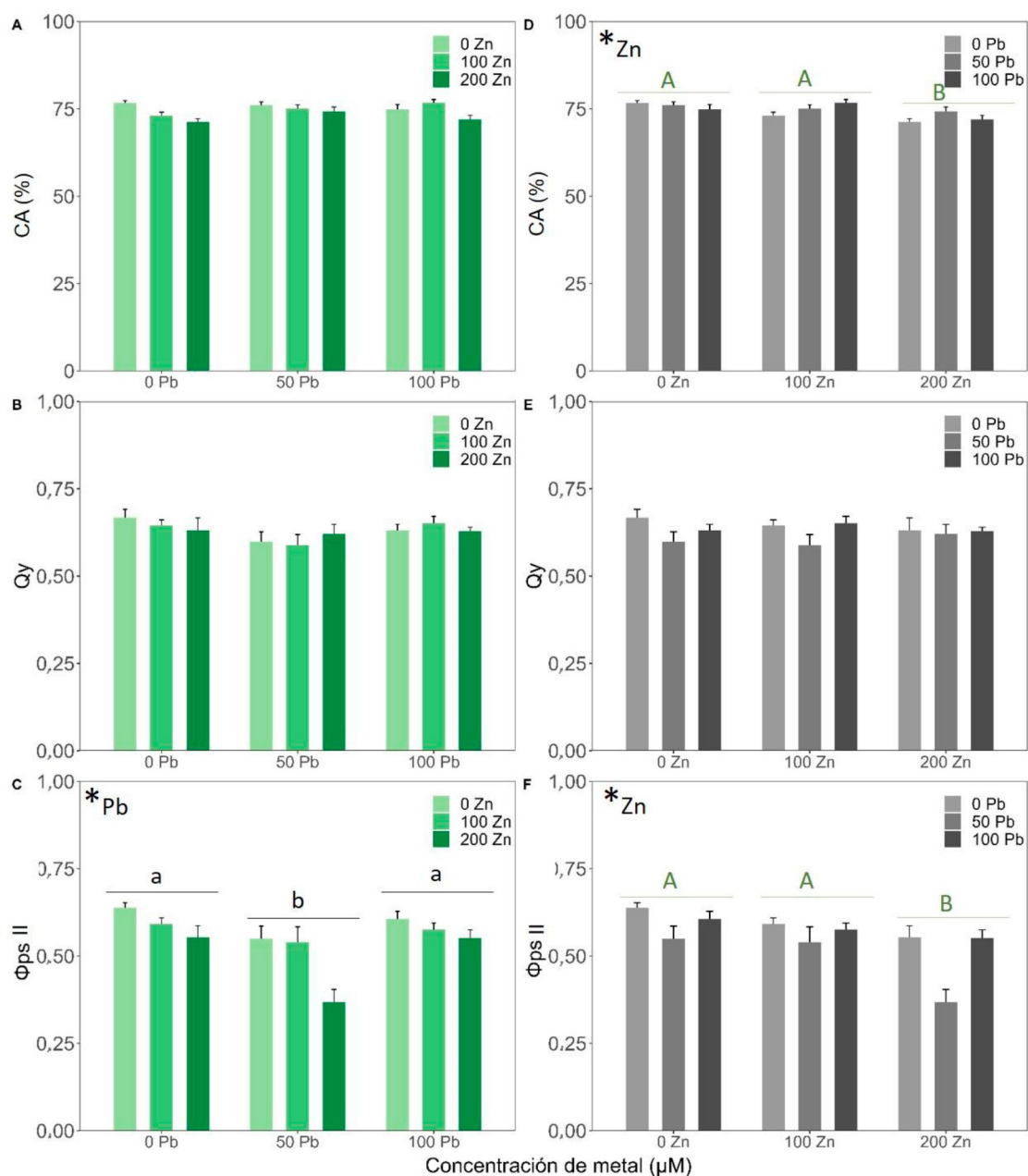


Figura 4.1.3: Parámetros fisiológicos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n = 10$). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) contenido de agua (CA), (C, D) eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y (C, E) eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}). *Zn y/o *Pb en la esquina izquierda indica que los factores principal Pb y/o Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para las comparaciones principales (*Pb) y (*Zn).

3.1.4. Parámetros bioquímicos

No se encontró efecto significativo de la interacción entre el Pb y el Zn sobre la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides (ANOVA clorofila a: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.4). Asimismo, no se encontró efecto de los factores principales Pb y Zn sobre la concentración de los pigmentos fotosintéticos (ANOVA clorofila a: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA clorofila a: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.4).

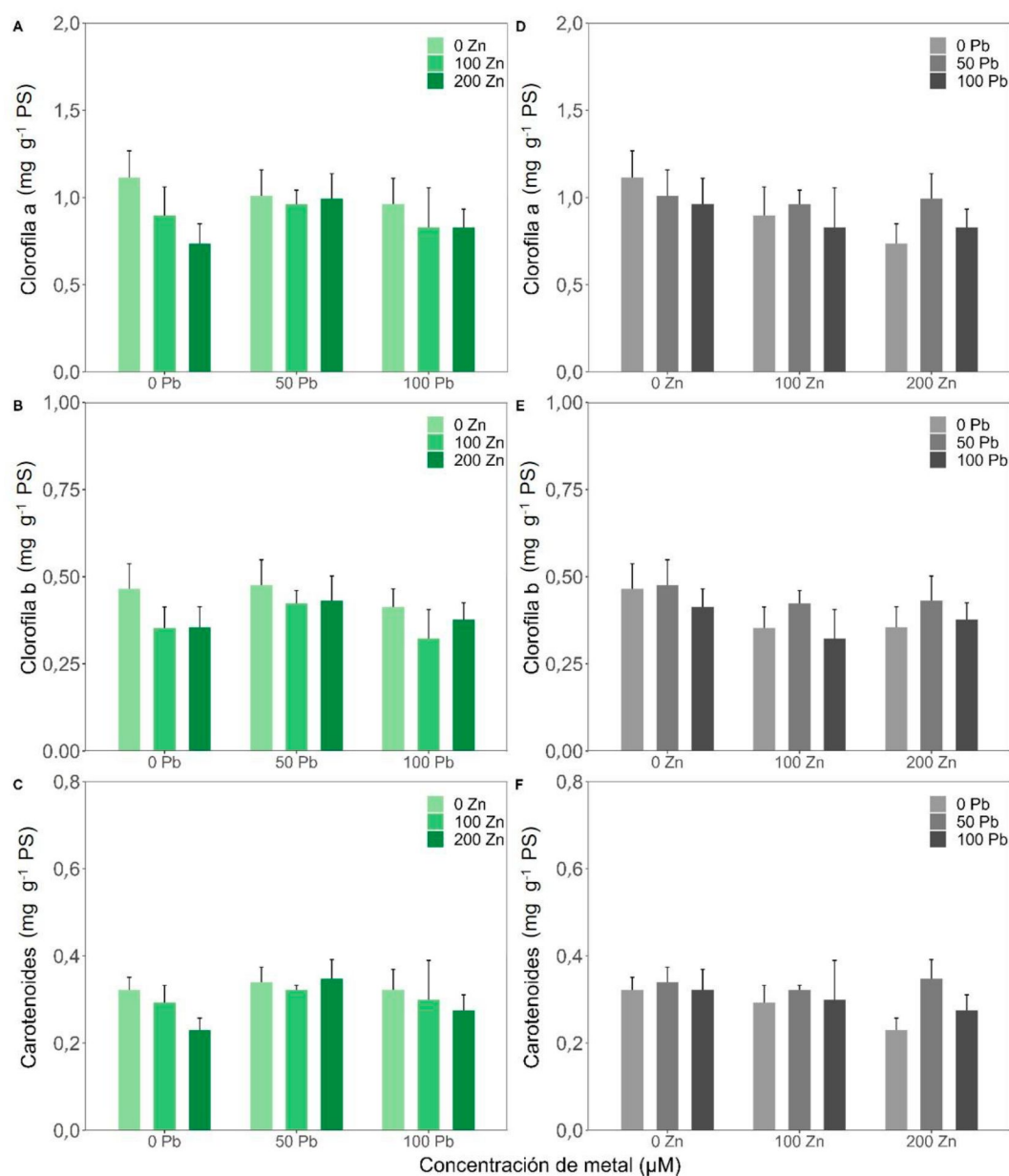


Figura 4.1.4: Concentración de pigmentos en *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; n = 10). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides.

La actividad enzimática registró efecto significativo de interacción entre los factores Pb y Zn para las enzimas SOD, APx y CAT (ANOVA SOD: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$; ANOVA APx: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$; ANOVA CAT: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$).

Respecto a la SOD, las comparaciones de efectos simples Zn|Pb, indicaron que para cada nivel de Pb el agregado de Zn produjo un aumento en la actividad de la enzima (Fig. 4.1.5 A); mientras que las comparaciones Pb|Zn, mostraron que para cada nivel de Zn el agregado de Pb indujo mayor actividad SOD bajo la concentración 200 μM Zn cuando se la combinó con 100 μM Pb (Fig. 4.1.5 E).

Para la enzima APx las comparaciones Zn|Pb indicaron una respuesta diferencial para cada nivel de Pb (Fig.4.1.5 B). Se observó que tanto en ausencia de Pb (0 μM Pb) como en el nivel más alto de Pb (100 μM Pb), la actividad APx aumentó significativamente en los tratamientos que se combinaban con 100 μM Zn, mientras que se dio el patrón inverso en los tratamientos con 50 μM Pb. El mismo patrón fue observado en las comparaciones Pb|Zn (Fig.4.1.5 F). Es decir, la enzima APx mostró un pico de actividad en los tratamientos 0 y 200 μM Zn con 50 μM Pb, mientras que en el tratamiento 100 μM Zn la actividad de esta enzima fue significativamente menor cuando el tratamiento contenía 50 μM Pb.

Respecto a la CAT, las comparaciones de efectos simples Zn|Pb y Pb|Zn mostraron una respuesta diferencial (Fig.4.1.5 D-H). Se observó que a 0 μM Pb la actividad CAT no varió con el aumento de Zn, a 50 μM Pb fue mayor frente al nivel 200 μM Zn, y a 100 μM Pb la enzima mostró un pico máximo de actividad cuando la solución de riego contenía 100 μM Zn. Por otro lado, el aumento de Pb para cada nivel de Zn no produjo cambio en la actividad de esta enzima.

Por último, la actividad GPx no presentó interacción de los factores Pb y Zn (ANOVA GPx: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$), pero se registró efecto del factor principal Zn, mostrando menor actividad en los tratamientos 200 μM Zn (Fig. 4.1.5 C-G).

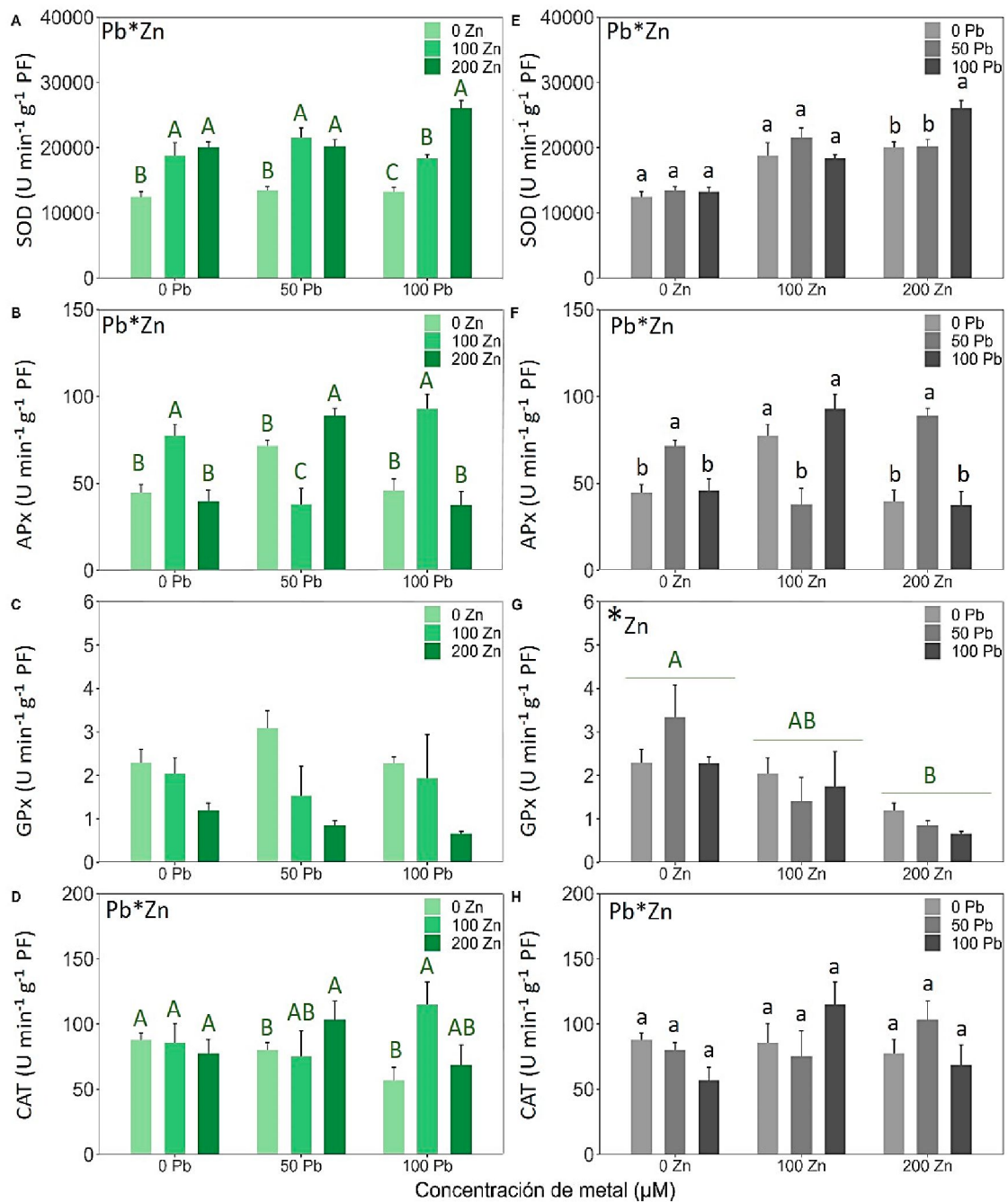


Figura 4.1.5: Actividad enzimática en hojas de *A. vulgatissima* (media \pm el error estándar; $n = 4$ o 5). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD; (B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; (D, H) catalasa, CAT. Pb*Zn y *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B, C) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn).

Respecto al peroxidación lipídica, no se encontró efecto significativo tanto de la interacción como de los efectos principales sobre la concentración de MDA (ANOVA MDA:

[Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA MDA: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA MDA: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.1.6 A-B).

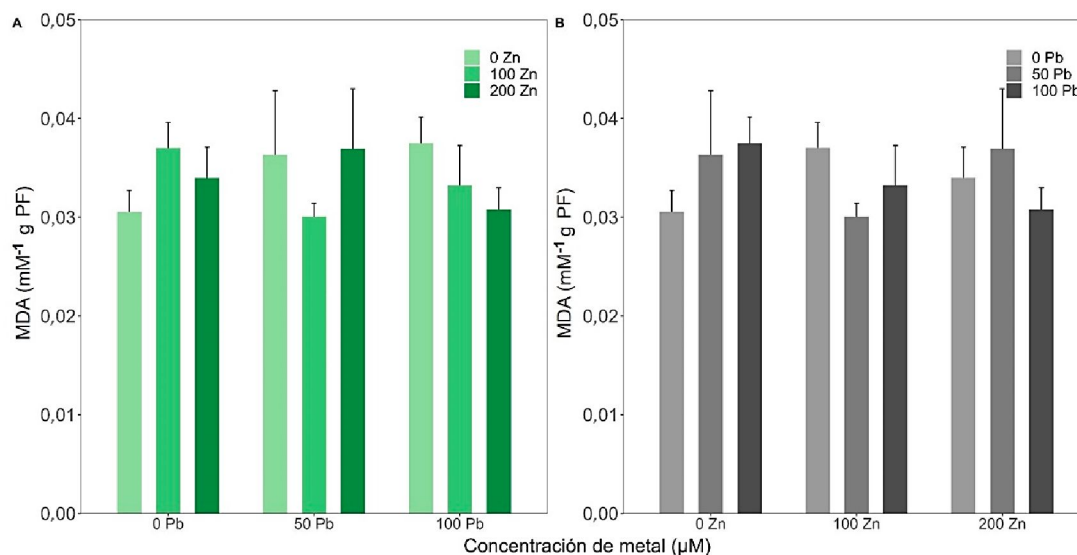


Figura 4.1.6: Concentración de malondialdehído en hojas de *A. vulgatissima* (media ± error estándar; n=5). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 µM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 µM Zn).

3.1.5. Parámetros morfométricos

La regresión alométrica del componente simétrico sobre el tamaño resultó significativa ($P < 0,05$), indicando que un 5,86% del total de la variación en forma se debió a la variación en tamaño. Por lo tanto, los subsecuentes análisis se realizaron con los residuos de la regresión como nuevas variables de forma libres de alometría.

El diagrama de dispersión del ACP realizado para los tratamientos de Pb + Zn indicó que las primeras CPs explicaron un 82,33% de la varianza (CP1: 65,58%, CP2: 16,75; Fig. 4.1.7). El espectro de variación en forma indicó hojas con modificaciones en la esbeltez de la lámina, en la forma del ápice y en la proyección de la zona basal de la lámina junto a la extensión del pecíolo. Las hojas que ocuparon el morfoespacio perteneciente a los valores positivos de la CP1 presentaron láminas de ápice redondeado y pecíolos proyectados, mientras que los valores negativos presentaron ápices puntiagudos y pecíolos retraídos. Por otro lado, la CP2 determinó variaciones asociadas a hojas con láminas globosas y pecíolos retraídos para valores positivos del eje, mientras que las formas asociadas a los valores negativos presentaron láminas con pecíolos proyectados.

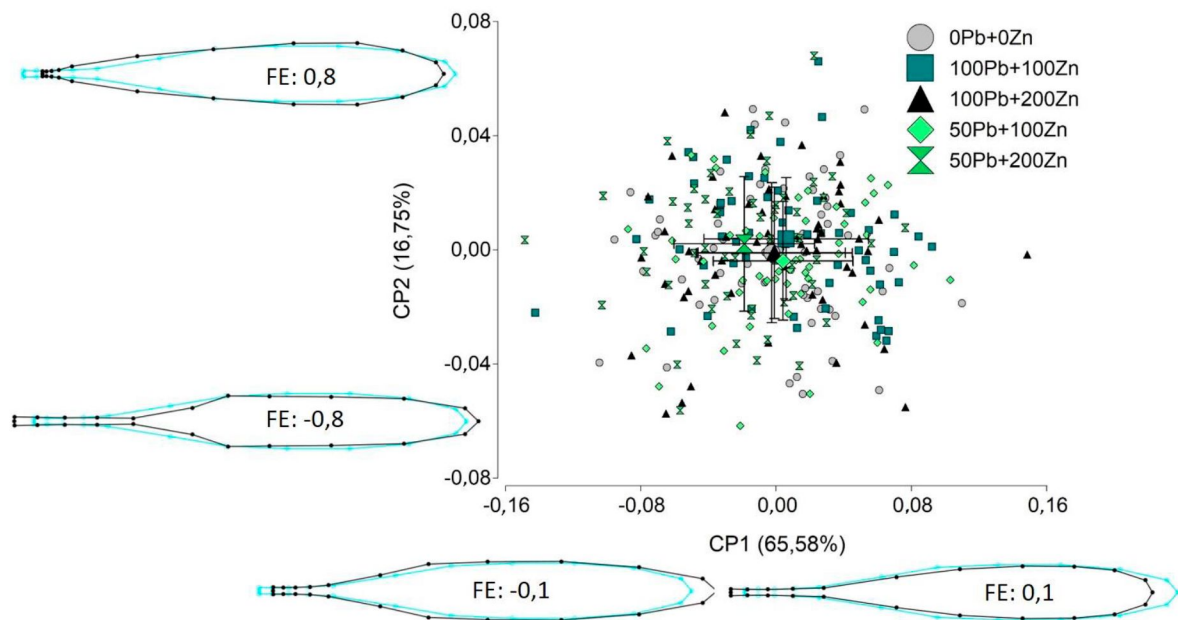


Figura 4.1.7: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de la hoja de *A. vulgatissima* del experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb+100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. A los márgenes de cada componente se expresa el porcentaje de varianza explicada y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre la CP), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP.

El AVC indicó que el eje VC1 explicó un 40,85% de la varianza que maximizó la separación entre los tratamientos, en tanto VC2 explicó un 31,92%. El gráfico de dispersión evidenció una separación entre los tratamientos sobre ambos ejes (Fig. 4.1.8). Se observó un gradiente de la forma de la hoja entre los tratamientos a lo largo del eje VC1. Recorriendo dicho eje desde los valores negativos hacia los positivos, se observan los tratamientos 0 Pb + 0 μM Zn y 50 Pb + 200 μM Zn, luego en valores intermedios se encuentran los tratamientos 50 μM Pb + 100 μM Zn y 100 μM Pb + 100 μM Zn y en el extremo positivo se encontró el tratamiento 100 μM Pb + 100 μM Zn. Los valores negativos estaban representados por hojas de lámina globosa con pecíolo retraído; mientras que, los positivos poseían formas lanceoladas con pecíolos proyectados. A su vez, sobre los valores positivos del eje VC2 los tratamientos con la mayor concentración de Zn (50 μM Pb + 200 μM Zn y 100 Pb + 200 μM Zn) estaban representados por hojas con láminas ahusadas; mientras que en los valores negativos se observa el patrón opuesto en forma y se encontraban los tratamientos con la menor concentración de Zn (50 Pb + 100 μM Zn y 100 Pb + 100 μM Zn) junto al tratamiento control.

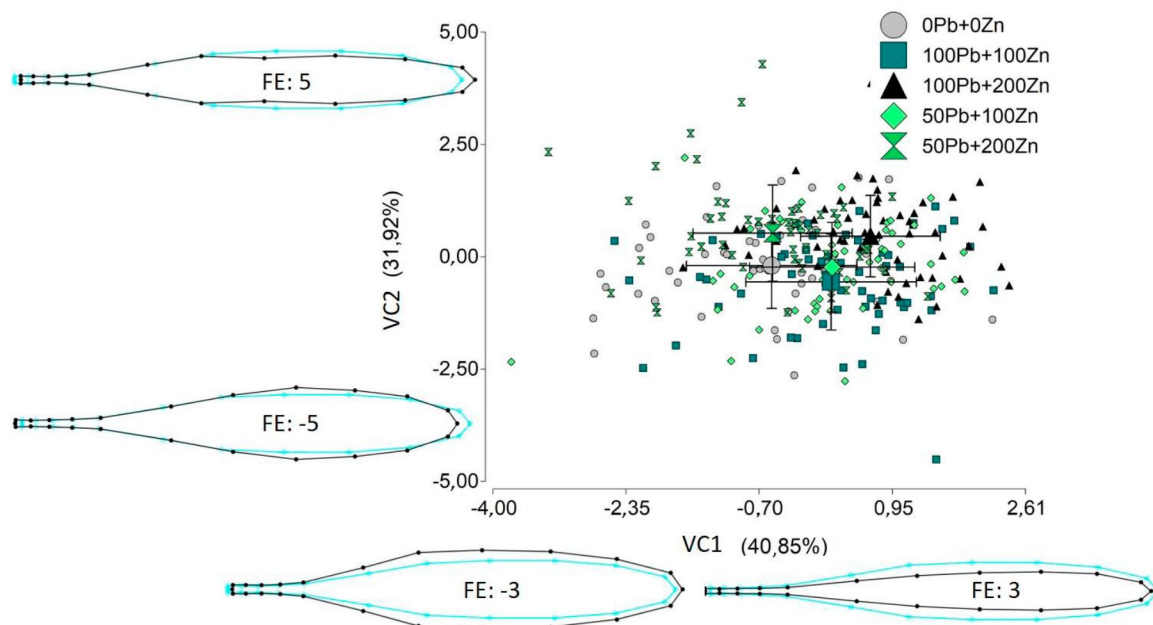


Figura 4.1.8: Diagrama de dispersión del Análisis de Variable Canónicas de la hoja en *A. vulgatissima* del experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb+100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre cada eje), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada eje.

El MANOVA realizado con las primeras 7 CPs (representando el 99% de la variación total) mostró diferencias significativas entre las formas medias entre los tratamientos (Pillai, $P = 0,0001$). Además, el análisis de conglomerados distinguió 2 grupos correspondientes al control (0 μM Pb + 0 μM Zn) junto al tratamiento 50 μM Pb + 200 μM Zn por un lado y a los tratamientos 50 μM Pb + 100 μM , 100 μM Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 100 μM Zn por el otro (Fig. 4.1.9).

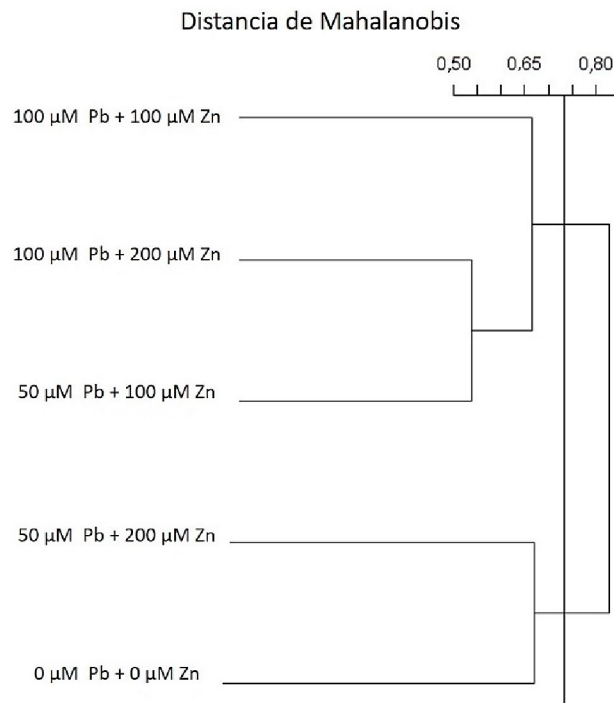


Figura 4.1.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma (n° CPs= 7) entre los tratamientos combinados Pb + Zn y el control. El valor de la distancia de Mahalanobis que determina la significancia estadística ($P < 0,05$) entre los grupos se indica mediante una línea vertical.

Cuando se estudió el tamaño de la hoja, para el largo no hubo efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn (ANOVA largo: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$), pero se encontró un efecto significativo de ambos factores principales (ANOVA largo: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA largo: [Zn], $P < 0,05$). En ambos casos la adición de Pb y Zn produjo una reducción significativa del largo (Fig. 4.1.10). Por otro lado, el ancho de la hoja indicó un efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn (ANOVA ancho: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$). Las comparaciones de efectos simples Zn|Pb mostraron que solo frente a la concentración máxima de Pb (100 μM Pb) el aumento de Zn produce disminución del ancho (Fig. 4.1.10), mientras que el incremento de Pb para cada nivel de Zn no produce cambio en esta variable. Para el estimador de tamaño CS no se encontró efecto significativo de la interacción (ANOVA cs: [Pb] *[Zn], $P > 0,05$), pero se registró significancia de los factores principales Pb y Zn (ANOVA cs: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA cs: [Zn], $P < 0,05$). En ambos casos, el tamaño se redujo significativamente al adicionar Pb o Zn, independientemente del nivel del otro metal con el que se combinó en la solución de riego (Fig. 4.1.10).

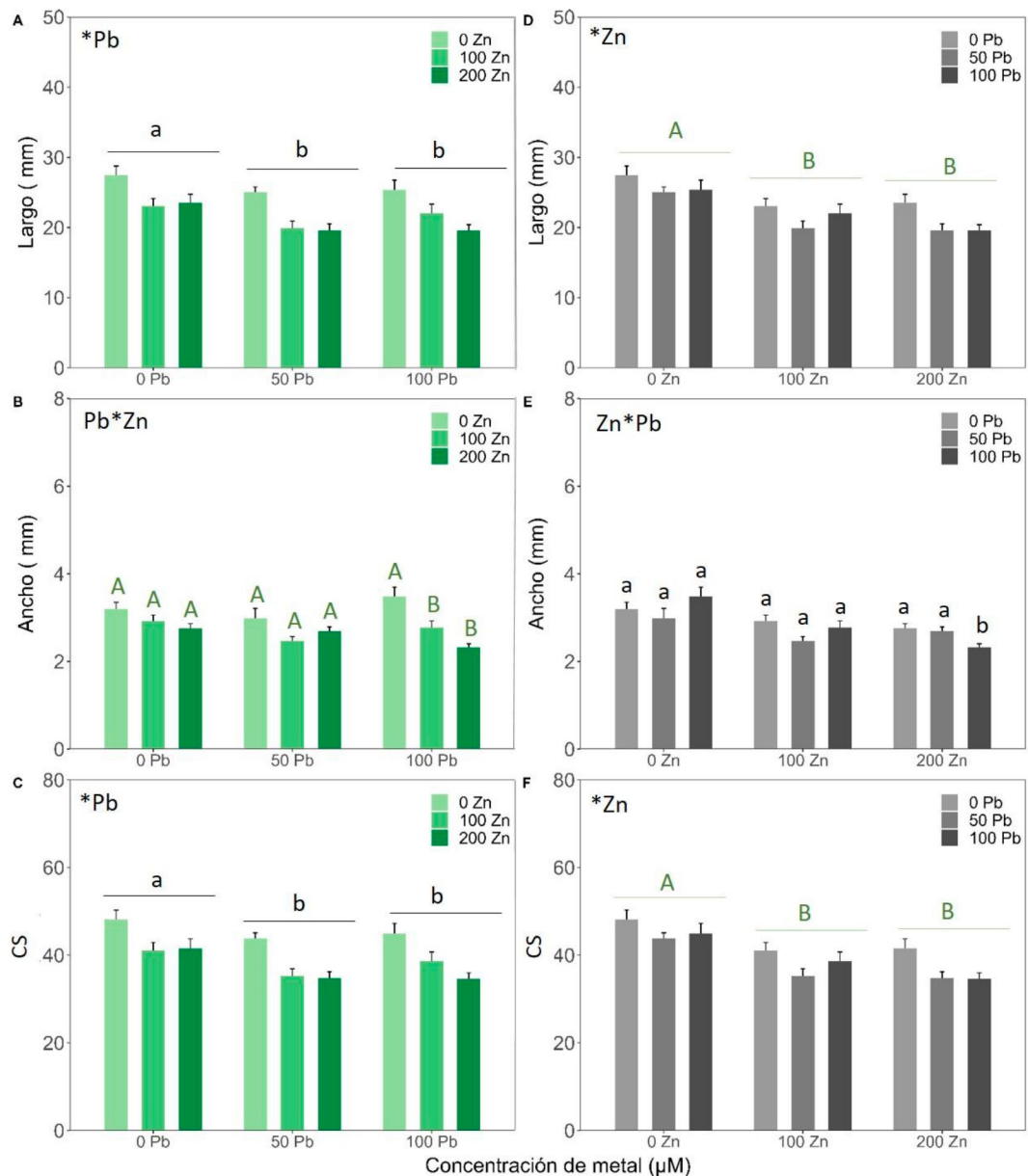


Figura 4.1.10: Largo, ancho y centro size (CS) de hojas de *A. vulgatissima* (media \pm error estándar; $n = 10$). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). Pb*Zn o *Zn y/o *Pb en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Pb y/o Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn) y principales (*Pb); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn).

3.1.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada: IBRv2

Los valores de IBRv2 para cada uno de los 9 tratamientos son representados en la figura 3.1.11. El tratamiento 100 μM Pb presentó el valor más bajo de IBRv2 (11, 03); mientras que el tratamiento 50 μM Pb + 200 μM Zn alcanzó el mayor valor de IBRv2 (19, 50). En general se observó que todos los tratamientos que contenían 200 μM Zn, es decir los

tratamientos 200 μM Zn, 50 μM Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, presentaron los valores IBRV2 más altos.

En los gráficos de estrella se observó que la inhibición o inducción de los biomarcadores medidos dependió del tratamiento. El tratamiento 50 μM Pb presentó reducción de la concentración de pigmentos fotosintéticos y de los parámetros Q_y y Φ_{psII} , mientras que aumentó la actividad enzimática, a excepción de la CAT y de las concentraciones de MDA (Fig. 4.1.11 A). El tratamiento 100 μM Pb mostró una reducción pronunciada de la concentración de pigmentos y de la actividad de la enzima CAT; los parámetros Q_y y Φ_{psII} y la actividad del resto de las enzimas permanecieron similares al control, mientras que la concentración de MDA fue superior al control (Fig. 4.1.11 E). El tratamiento 100 μM Zn mostró disminución de la concentración de pigmentos, mientras que los parámetros Q_y y Φ_{psII} y la actividad de las enzimas CAT y GPx permanecieron similares al control y la actividad SOD y APx y la concentración de MDA fueron superiores al control (Fig. 4.1.11 B). El tratamiento 200 μM Zn mostró marcada reducción de la concentración de pigmentos, de valores de Q_y y Φ_{psII} y de la actividad GPx respecto al control. Mientras que la actividad de las enzimas APx y CAT fueron similares al control, la actividad SOD y la concentración de MDA fueron superiores al control (Fig. 4.1.11 F). El tratamiento 50 μM Pb + 100 μM Zn presentó reducción de todos los biomarcadores medidos, excepto la actividad SOD (Fig. 4.1.11 C). El tratamiento 100 μM Pb + 100 μM Zn indicó una reducción en la concentración de pigmentos, los parámetros de la eficiencia del fotosistema II (Q_y y Φ_{psII}) se mantuvieron similares al control, la actividad de las enzimas SOD, APx y CAT mostraron inducción y la concentración de MDA aumentó (Fig. 4.1.11 G). El tratamiento 50 μM Pb + 200 μM Zn indicó una disminución pronunciada tanto de la concentración de pigmentos, los parámetros Q_y y Φ_{psII} así como la actividad de la enzima GPx, mientras que la actividad de las enzimas SOD, APx y CAT mostraron inducción al igual que la concentración de MDA (Fig. 4.1.11 D). El tratamiento 100 μM Pb + 200 μM Zn evidenció reducción de la concentración de pigmentos y de la actividad de las enzimas APx, GPx y CAT, mientras que los niveles de MDA y los parámetros Q_y y Φ_{psII} fueron similares al tratamiento control, la actividad SOD mostró marcada inducción (Fig. 4.1.11 H).

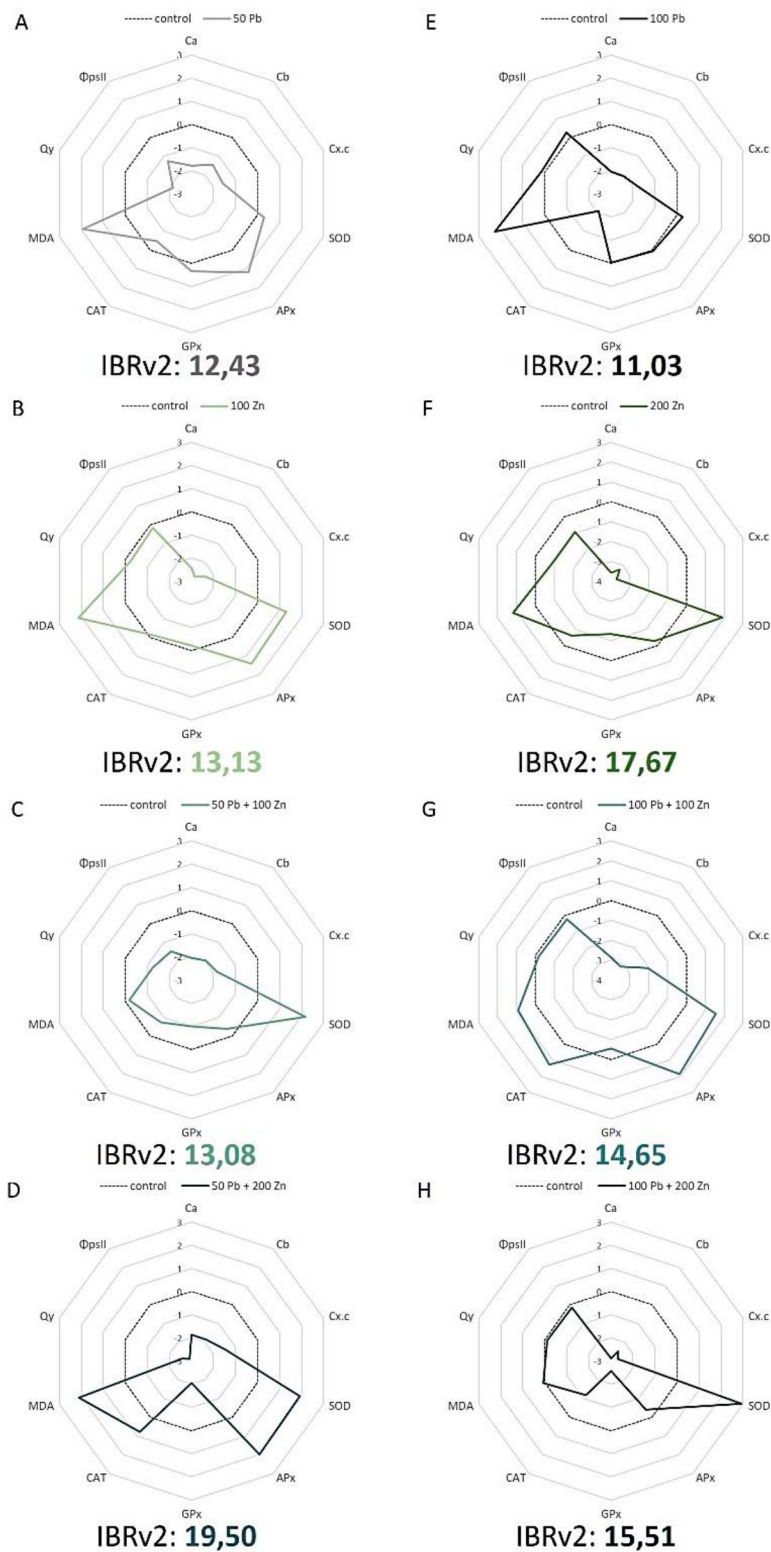


Figura 4.1.11: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (E) 100 Pb, (B) 100 Zn, (F) 200 Zn, (C) 50 μM Pb + 100 μM Zn, (G) 100 μM Pb + 100 μM Zn, (D) 50 μM Pb + 200 μM Zn, (H) 100 μM Pb + 200 μM Zn basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *A. vulgatissima*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcador respecto al control.

3.1.7. Discusión

Los metales con similitud química, como el Zn y el Pb, pueden exhibir una fuerte competencia y en algunas especies de plantas se han descrito relaciones de antagonismo entre ellos, mostrando que el Zn reduce la absorción de Pb (Siedlecka 1995, Hasnaoui *et al.* 2020). Sin embargo, la concentración de Pb y Zn se incrementó en la raíz y biomasa aérea de *A. vulgatissima* cuando se adicionaron estos dos metales a la solución de riego, sin encontrarse relaciones de antagonismo y/o sinérgia. Además, en ambos órganos, se acumuló más Zn que Pb, independientemente de la concentración de estos metales en el riego, sugiriendo que esta planta es capaz de acumular más Zn que Pb. Un patrón de acumulación similar fue descrito en *A. hortensis* y *A. rosea* cuando estas plantas crecían en un medio que contenía a estos dos metales en distintas dosis (Kachout *et al.* 2012). Esto puede deberse a que el Zn es un micronutriente implicado en diversas funciones celulares y presenta en general alta movilidad, mientras que el Pb no tiene función biológica conocida y posee poca movilidad, por lo que es mayormente retenido en las raíces (Greger 2004).

Los niveles de Pb y Zn alcanzados en la biomasa de *A. vulgatissima* superó los niveles fitotóxicos en todos los tratamientos aplicados (0,6 - 28 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS para Pb y 100 - 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS para Zn), coincidiendo con lo observado en los experimentos descritos en el capítulo III (Subcapítulo I) en los que los metales se manipularon independientemente (Krämer *et al.* 2010, Aziz y Mujeeb 2022). Específicamente, el Pb superó los 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS en todos los tratamientos donde se adicionó Pb y fue principalmente acumulado en las raíces de *A. vulgatissima*, reflejando la baja movilidad de este metal. En este sentido, la restricción de los metales en la biomasa radical es considerada un mecanismo de tolerancia (Verkleij *et al.* 1990). El patrón de acumulación del Pb fue reflejado en los índices $\text{FBC} > 1$ y $\text{FT} < 1$ para todos los tratamientos que contenían Pb. Sin embargo, se observó una disminución en el FBC cuando la concentración de Pb se duplicó, lo que indicaría cierta saturación en la acumulación de este metal en las raíces frente a niveles elevados del mismo. Por otro lado, el Zn superó los 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS tanto en la raíz como en la biomasa aérea en todos los tratamientos donde se adicionó Zn. Este patrón fue reflejado en los índices FBC y FBA, cuyos valores superaron varias decenas la unidad en todos los tratamientos. Sin embargo, la concentración de este metal en la biomasa de *A. vulgatissima* dependió del tratamiento aplicado. Por un lado, el Zn fue traslocado a la

biomasa aérea en los tratamientos que no contenían Pb y en el tratamiento que contenía igual proporción de Pb y Zn (100 μM Pb + 100 μM Zn), mientras que en el resto de los tratamientos donde se encontraban presentes ambos metales, el FT no superó la unidad. Además, se observó cierta saturación en la acumulación de este metal en ambos órganos, ya que, al duplicarse la concentración de Zn en la solución de riego, los índices FBC y FBA se redujeron en promedio a la mitad. Estos resultados sugieren la presencia de mecanismos de competencia bajo ciertas concentraciones de Pb y Zn, produciendo menos translocación de Zn hacia la biomasa aérea.

Numerosos estudios han evidenciado la capacidad de diversas especies de *Atriplex* para fitorremediar Pb y Zn, mostrando diversas estrategias adaptativas (Kumari et al. 2019 y las referencias allí incluidas). Sin embargo, existe poca evidencia de trabajos experimentales que evalúen la capacidad fitorremediadora y la tolerancia al efecto conjunto de estos dos metales adicionados a la solución de riego. Por ejemplo, dos variedades *A. hortensis* (*var. purpurea* y *var. rubra*) y *A. rosea* mostraron capacidad para fitoestabilizar Pb y Zn, en condiciones hidropónicas siendo regadas con una solución que contenía distintas dosis de Pb (150, 400, 1000 μM) o Zn (300, 600, 1000 μM), alcanzando niveles muy altos de estos metales en su biomasa (Kachout *et al.* 2009). Asimismo, en otro estudio experimental, Kachout y colaboradores (2012) encontraron que estas mismas especies fueron capaces de fitorremediar suelos contaminados por diversos metales, incluyendo Pb y Zn. Si bien estas especies acumularon principalmente estos metales en sus raíces, indicando una baja movilidad para el Pb y una mayor translocación para el Zn, todas exhibieron estrategias de exclusión. Comparativamente los valores de los índices BAC y FT para el Pb y Zn en *A. vulgatissima* fueron superiores a los hallados en *A. hortensis* y *A. rosea*. Por otra parte, Lotmani y colaboradores (2011) demostraron experimentalmente la capacidad de *A. halimus* provenientes de tres zonas distintas (una zona de agricultura, una zona costera y una marisma) de fitoestabilizar Pb y Zn. En esta especie el promedio de acumulación de Pb y Zn en la biomasa aérea de las plantas provenientes de la zona con elevada contaminación (zona agroindustrial), fue de 1,1 y 257 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. De esta manera, los hallazgos de este subcapítulo sugieren que *A. vulgatissima* podría tener una alta eficacia en fitoestabilización de Pb y Zn en sitios contaminados por estos metales.

La biomasa de *A. vulgatissima* se mantuvo constante entre los tratamientos aplicados de Pb y Zn. De igual manera, plantas de *A. halimus* proveniente de semillas de poblaciones de una zona costera con niveles altos de Pb y Zn en suelo, no fueron afectadas en su crecimiento frente a niveles muy elevados de Pb y Zn (0, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$) a los que fueron sometidas experimentalmente (Lotomani *et al.* 2011). Sin embargo, Kachout y colaboradores (2009) encontraron que la biomasa de *A. rosea* se redujo al someterla en condiciones hidropónicas a distintas concentraciones de Pb, Zn y otros metales. Se sabe que los procesos de fitorremediación están intrínsecamente ligados al mantenimiento y producción de biomasa de la especie vegetal, junto a la capacidad que poseen para acumular estos elementos en sus órganos. En este sentido, los resultados indican que *A. vulgatissima* posee elevada tolerancia cuando acumula Pb y Zn es su biomasa.

Se observó una reducción del contenido de agua en las plantas sometidas a la dosis más elevada de Zn, independientemente del nivel del Pb, al igual que se observó en el capítulo II (subcapítulo I) cuando se sometió a *A. vulgatissima* a las mismas dosis de Zn de manera individual. Un exceso de metales puede afectar diferentes procesos fisiológicos en las plantas, alterar las relaciones hídricas e incluso conducir marchitez permanente (Påhlsson 1989). Por otro lado, el fotosistema II se vio afectado de manera diferencial por el Pb y Zn, según el tratamiento aplicado, sin observarse interacciones entre estos metales. La eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}) disminuyó frente a niveles intermedios de Pb (50 μM) y en el nivel más alto de Zn (200 μM). Un daño al fotosistema II frente a la exposición de Pb y Zn fue descrito por Bernardini y colaboradores (2016) en la macrófita perenne *Phragmites australis*, y por Huang y colaboradores (2019), en dos especies de árboles (*Koelreuteria paniculata* y *Zelkova schneideriana*), en las cuales existió una marcada reducción de todos los parámetros fotosintéticos medidos, inducido por el aumento de estos metales. Como se mencionó en capítulos anteriores, estos metales pueden reducir la transferencia de electrones al producir inactivación o reducción de los centros de reacción abiertos del fotosistema II, lo que a su vez bloquea la síntesis de ATP y NADPH, conduciendo a una reducción en la fijación y asimilación de CO_2 (Huang *et al.* 2019).

La concentración de pigmentos fotosintéticos en *A. vulgatissima* no varió entre los tratamientos con Pb y Zn. Es posible que existan mecanismos de protección en la planta que mantengan la integridad de los cloroplastos cuando estos dos metales se encuentran

juntos en el riego, es decir que el Pb podría contribuir a contrarrestar el efecto negativo del Zn sobre la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos, lo cual fue observado en el experimento de incremento individual de Zn en el capítulo III (subcapítulo II).

La actividad de las enzimas antioxidantes puede verse afectada por la exposición a los diferentes metales, desempeñando un papel clave en los mecanismos de defensa contra el estrés (Kachout *et al.* 2010). Los resultados obtenidos en este subcapítulo para las enzimas SOD, APx y CAT sugieren que el patrón de incremento o disminución de la actividad de las enzimas SOD, APx y CAT depende de la concentración de Pb y Zn presente en el medio; indicando sinergia u antagonismo asociada a presencia simultánea de estos metales; mientras que la actividad de la GPx disminuyó frente al aumento de las concentraciones de Zn. La enzima SOD, que cataliza la conversión del radical superóxido O_2^- a peróxido de hidrogeno (H_2O), mostró un aumento de su actividad frente al incremento de Zn en cada nivel de Pb; mientras que para las enzimas APx y CAT el patrón de actividad dependió del tratamiento Pb + Zn aplicado. Bankaji y colaboradores (2019) mostraron que en *A. halimus* las enzimas GPx, CAT y APx inhibían su actividad frente al aumento de Zn. Un estudio experimental con *A. hortensis* y *A. rosea* creciendo en un gradiente de contaminación multimetálico (Cu, Ni, Pb y Zn) mostró tolerancia al estrés generado por estos metales, mediada por la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y APx, que disminuyeron su actividad, mientras que la actividad CAT se incrementó, conforme aumentaba el grado de estrés (Kachout *et al.* 2010). En este contexto, podría decirse que la actividad enzimática se encuentra estrechamente vinculada a la especie de planta, a los metales presentes y a sus concentraciones. Cabe destacar que no se registraron incrementos en los niveles de MDA frente al aumento de Pb y Zn, lo que sugiere que la actividad antioxidante podría desempeñar un papel crucial en la respuesta adaptativa de *A. vulgatissima* ante el estrés generado por estos metales.

Respecto a las respuestas morfométricas asociadas a las variaciones en el tamaño y forma de las hojas, los resultados de este subcapítulo fueron consistentes con los resultados reportados por Kachout y colaboradores (2009). En dicho trabajo se determinó que existe una asociación entre la disminución del área foliar de *A. hortensis* y *A. rosea* y el incremento individual de Pb y Zn, no habiéndose evaluado las variaciones en forma de

las hojas de dichas especies. En el caso particular de *A. vulgatissima* en esta tesis, los resultados indicaron la existencia de una interacción significativa entre el Pb y Zn, cuando son aplicados de manera conjunta a la solución de riego, indicando que frente a la mayor concentración de Pb el incremento de Zn produce disminución del ancho, y mostraron que el incremento conjunto de Pb y Zn, produjo variaciones asociadas a la esbeltez de la lámina y en la proyección del pecíolo.

Si bien se esperaba que el tratamiento que muestre mayor valor de IBRV2 sea el tratamiento compuesto por las concentraciones más elevadas de Pb y Zn (100 Pb + 200 Zn), los resultados del IBRV2 indicaron que el tratamiento 50 Pb + 200 Zn presentó el mayor valor de IBRV2, sugiriendo que es el tratamiento que experimentó el mayor estrés causado por estos metales. Esta observación resulta coherente al considerar que los tratamientos que contenían únicamente 50 Pb o 200 Zn mostraron valores más elevados del índice, comparando con los restantes controles de Pb y Zn. Es decir, que el efecto conjunto de tales concentraciones de Pb y Zn resulta de la suma de los efectos individuales de cada uno de los metales, observándose un efecto aditivo.

Subcapítulo II: *Limonium brasiliense*

3.2. Resultados

4.2.1. Concentración de metales, Factor de Concentración, Factor de Bioacumulación y Factor de Translocación

No se encontró efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn para la concentración de ambos metales en la biomasa de *L. brasiliense* (ANOVA aéreo: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA raíz: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$). Sin embargo, se registró un efecto significativo de los efectos principales Pb y Zn sobre la concentración de estos metales en ambos órganos (ANOVA aéreo: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA raíz: [Pb], $P < 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA raíz: [Zn], $P < 0,05$).

Respecto al Pb, se observó que independientemente de la concentración de Zn, la concentración de Pb en la biomasa de *L. brasiliense* aumentó en la biomasa radical y aérea, junto con el incremento de Pb en solución de riego (Tabla 4.2.1). El FBC presentó un rango de valores entre 11-15 y entre 9-18 para tratamientos que contenían 50 y 100 μM Pb, respectivamente, en combinación con los 3 niveles de Zn (Tabla 4.2.1). Los índices FBA y FT fueron menores a 1 en todos los tratamientos (Tabla 4.2.1).

Por otro lado, la concentración de Zn en ambos órganos de *L. brasiliense* se incrementó significativamente junto con la concentración de Zn añadida, independientemente del nivel de Pb (Tabla 4.2.1). Las plantas de todos los tratamientos que contenían 200 μM Zn concentraron más Zn, tanto en la raíz como en la biomasa aérea; mientras que las plantas de los tratamientos sin Zn presentaron las concentraciones más bajas. El índice FBC presentó un rango de valores entre 30-32 y entre 22-28 para los tratamientos que contenían 100 y 200 μM Zn, respectivamente (Tabla 4.2.1). El FBA presentó un rango de valores entre 31-43 y entre 30-33 para los tratamientos que contenían 100 y 200 μM Zn, respectivamente (Tabla 4.2.1). El FT superó la unidad en el tratamiento control y en todos los tratamientos donde se adicionó Zn a la solución de riego (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1: Media \pm error estándar (n= 4 o 5) de la concentración de Pb y Zn en raíz y biomasa aérea, factor de bioconcentración (FBC), factor de bioacumulación (FBA) y factor de translocación (FT) para los 9 tratamientos resultantes de la combinación de Pb (0, 50, 100 μ M Pb) y Zn (0,100 y 200 μ M). Las letras minúsculas (a, b) y mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre niveles de Pb o Zn, respectivamente (Tukey, $P < 0,05$).

Tratamientos		Concentración Pb (μ g g ⁻¹)		FBC	FBA	FT
Pb	Zn	Raíz	Aéreo			
0	0	1,20 \pm 1,22	0,45 \pm 0,05	-	-	0,43 \pm 0,08
	100	2,24 \pm 0,99	0,48 \pm 0,05	-	-	0,42 \pm 0,17
	200	2,62 \pm 0,85	0,54 \pm 0,06	-	-	0,27 \pm 0,05
50	0	161,19 \pm 22,36	3,66 \pm 0,25	15,52 \pm 2,15	0,35 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
	100	145,04 \pm 24,75	3,32 \pm 1,01	13,97 \pm 2,38	0,32 \pm 0,10	0,02 \pm 0,01
	200	120,2 \pm 19,05	5,90 \pm 1,23	11,57 \pm 1,83	0,57 \pm 0,12	0,05 \pm 0,01
100	0	374,44 \pm 138,2	11,62 \pm 1,95	18,03 \pm 6,65	0,56 \pm 0,09	0,06 \pm 0,02
	100	308,81 \pm 46,42	18,08 \pm 5,67	14,87 \pm 2,32	0,87 \pm 0,27	0,06 \pm 0,01
	200	188,12 \pm 38,33	7,49 \pm 1,96	9,06 \pm 1,85	0,78 \pm 0,26	0,04 \pm 0,01
Tratamientos		Concentración Zn (μ g g ⁻¹)		FBC	FBA	FT
Zn	Pb	Raíz	Aéreo			
0	0	30,28 \pm 2,56	32,90 \pm 1,66	-	-	1,11 \pm 0,10
	50	30,78 \pm 1,49	26,45 \pm 3,31	-	-	0,85 \pm 0,08
	100	38,70 \pm 3,75	23,68 \pm 3,15	-	-	0,61 \pm 0,01
100	0	212,18 \pm 11,88	269,73 \pm 26,85	32,51 \pm 1,82	41,3 \pm 4,11	1,28 \pm 0,13
	50	198,48 \pm 16,19	205,5 \pm 20,12	30,42 \pm 2,48	31,49 \pm 3,08	1,07 \pm 0,15
	100	202,05 \pm 20,32	285 \pm 41,57	30,96 \pm 3,11	43,67 \pm 6,37	1,42 \pm 0,17
200	0	365,4 \pm 40,19	398,24 \pm 31,86	28,00 \pm 3,08	30,51 \pm 2,44	1,13 \pm 0,13
	50	299,22 \pm 33,3	399,24 \pm 49,73	22,93 \pm 2,55	30,59 \pm 3,81	1,34 \pm 0,09
	100	329,18 \pm 22,94	441,94 \pm 21,85	25,22 \pm 1,76	33,86 \pm 1,67	1,39 \pm 0,16

4.2.2. Parámetros de crecimiento

Todas las plantas de *L. brasiliense* sobrevivieron a los 9 tratamientos resultantes de la combinación de Zn (0, 100 y 200 μ M Zn) y Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) (Fig. 4.2.1). Sin embargo, se observaron ligeros signos de clorosis en las plantas de los tratamientos en los cuales la solución de riego contenía 100 o 200 μ M Zn (Fig. 4.2.1 y Fig. 4.2.2). Ni la interacción ni los efectos principales Pb y Zn fueron significativos para la biomasa de raíz ni la biomasa aérea (ANOVA raíz: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA raíz: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA raíz: [Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA aéreo: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.2.3 A-D y Fig. 4.2.3 B-E), indicando similar producción de biomasa en todos los tratamientos. Del mismo modo, para el crecimiento relativo la interacción entre ambos factores, al igual que los efectos principales Pb y Zn, no fue significativa (ANOVA CR: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA CR: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA CR: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.2.3 C-F).

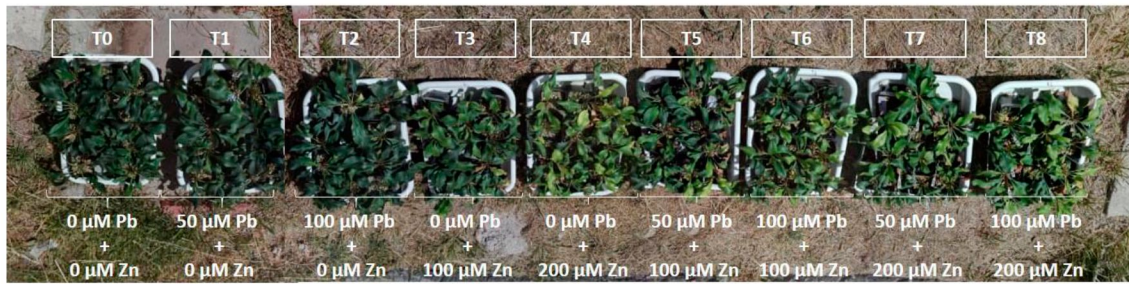


Figura 4.2.1: Fotografía de las 10 plantas que componían de los 9 tratamientos de *L. brasiliense* al finalizar el experimento.



Figura 4.2.2: Fotografías de plantas *L. brasiliense* seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los 9 tratamientos al finalizar el experimento.

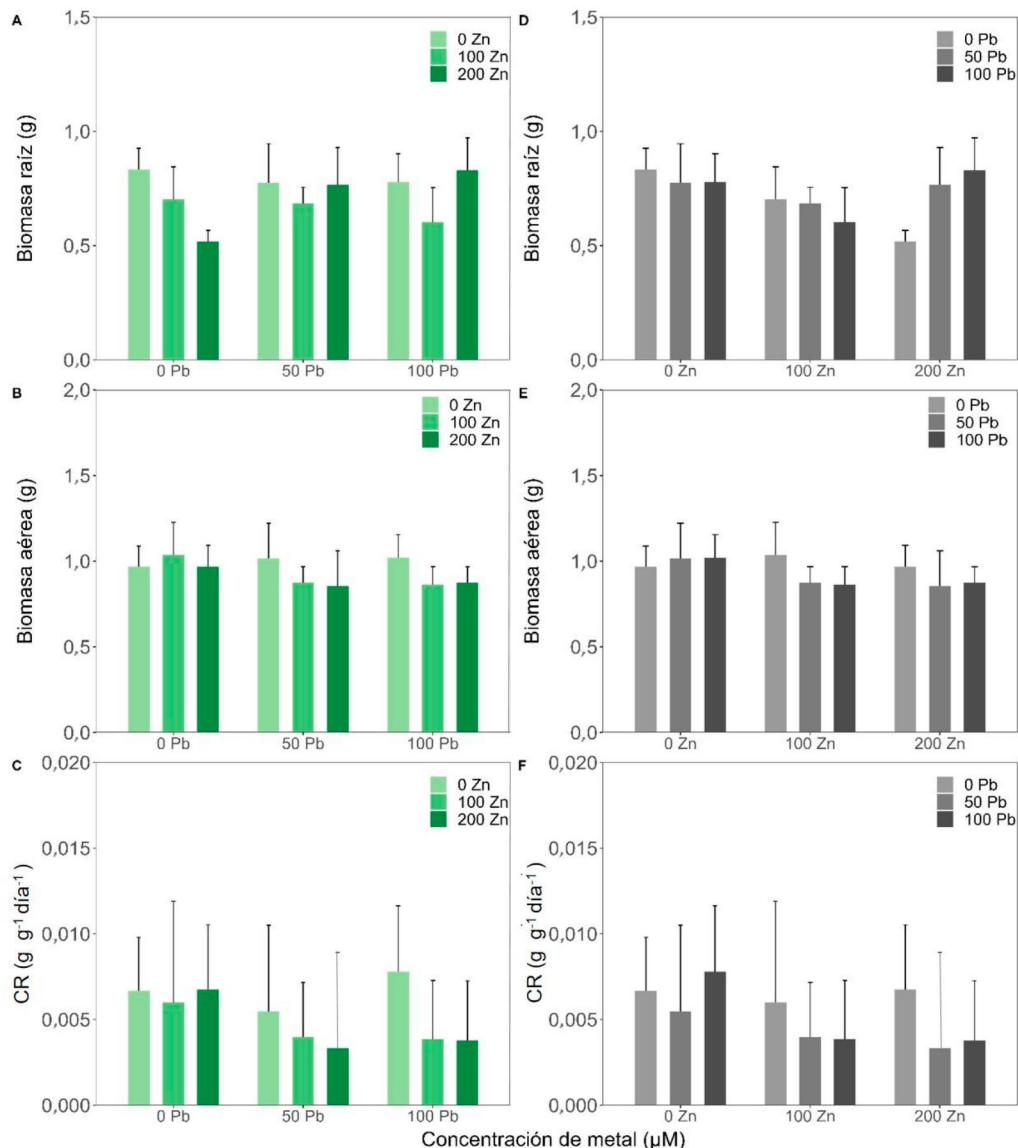


Figura 4.2.3: Parámetros de crecimiento en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n=10$). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) Biomasa raíz, (B, E) biomasa aérea y (C, F) crecimiento relativo.

4.2.3. Parámetros fisiológicos

Para el CA la interacción entre los factores Pb y Zn resultó significativa (ANOVA CA: $[\text{Pb}] * [\text{Zn}]$, $P < 0,05$). La comparación de efectos simples entre niveles de Zn para cada nivel de Pb ($\text{Zn} | \text{Pb}$), mostró que a 0 μM Pb el CA fue menor en los tratamientos 100 y 200 μM Zn; a 50 μM Pb el CA fue menor cuando la solución de riego contenía 200 μM Zn; mientras que en los tratamientos 100 μM Pb el CA no varió (Fig. 4.2.4 A). Por otro lado, las comparaciones $\text{Pb} | \text{Zn}$ indicaron que a 0 μM Zn el CA no varió frente al aumento de Pb; mientras que a 100 μM Zn y 200 μM Zn el CA fue menor cuando no había Pb en la solución de riego (Fig. 4.2.4 D). Por otro lado, para los parámetros de la eficiencia del

fotosistema II, no se encontró efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn (ANOVA Qy: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Pb]*[Zn], $P > 0,05$), ni del factor principal Pb (ANOVA Qy: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA Φ_{psII} : [Pb], $P > 0,05$). Sin embargo, el incremento de Zn afectó significativamente tanto el Qy (ANOVA Qy: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 4.2.4 E) como el Φ_{psII} (ANOVA Φ_{psII} : [Zn], $P < 0,05$, Fig. 4.2.4 F), indicando que ambos parámetros disminuyeron significativamente frente al aumento de Zn, independientemente del nivel de Pb en solución.

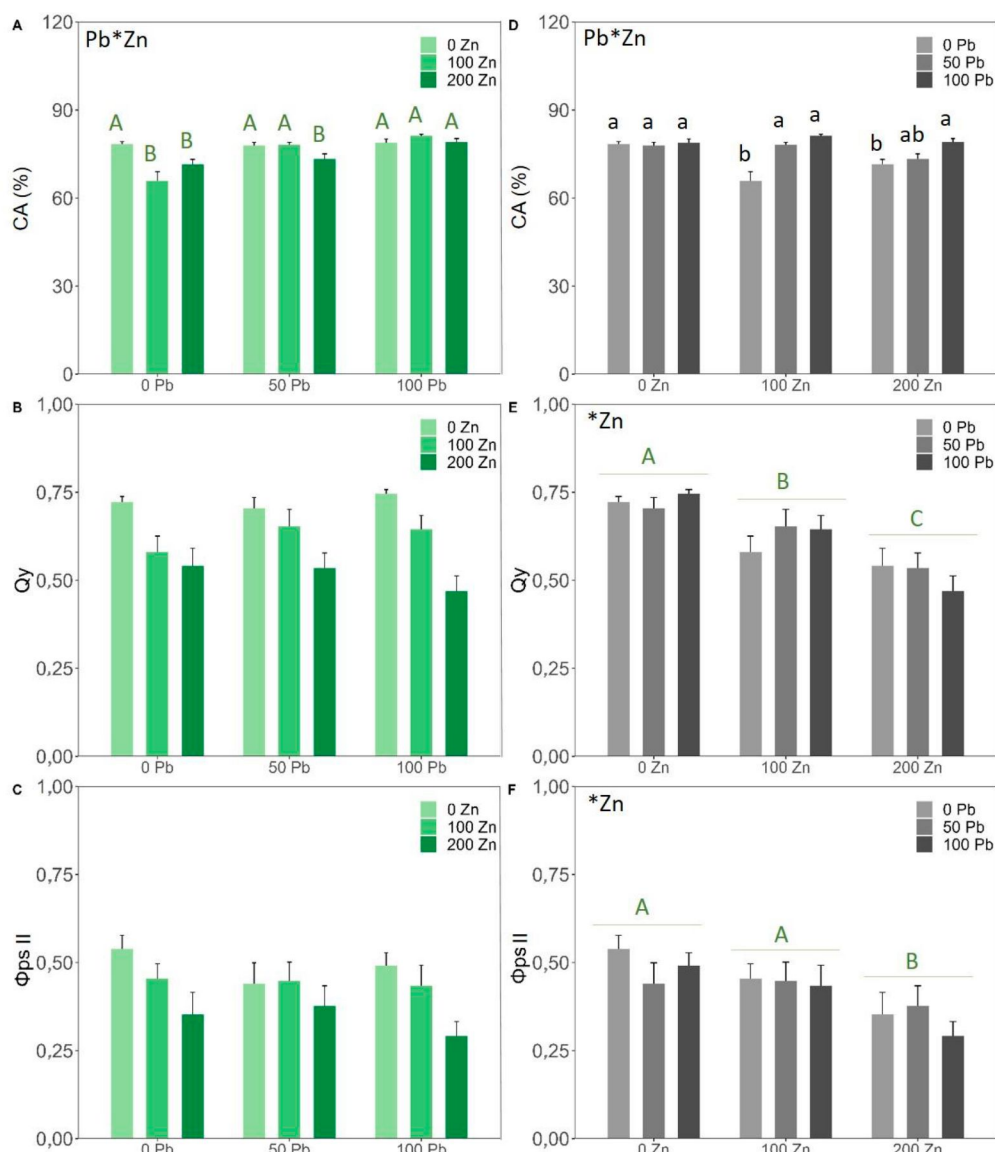


Figura 4.2.4: Parámetros fisiológicos (media \pm el error estándar; $n = 10$) en *L. brasiliense*. Tratamientos graficados según incremento de Pb (0, 50 y 100 μM Pb) en panel izquierdo y según incremento de Zn (0, 100, 200 μM Zn) en panel derecho. (A, D) contenido de agua (CA), (B, E) eficiencia del fotosistema II (Φ_{psII}) y eficiencia máxima del fotosistema II (Q_y). Pb*Zn y *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o del efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples Zn|Pb y principales (*Zn).

4.2.4. Parámetros bioquímicos

La interacción entre los factores Pb y Zn sobre la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides no fue significativa (ANOVA clorofila a: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Pb]*[Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.2.5), al igual que el factor principal Pb (ANOVA clorofila a: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA clorofila b: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA carotenoides: [Pb], $P > 0,05$). Sin embargo, el factor principal Zn produjo

reducción de la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides frente al nivel 100 y 200 μM Zn en solución de riego, independientemente del nivel de Pb (ANOVA clorofila a: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA clorofila b: [Zn], $P < 0,05$; ANOVA carotenoides: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 4.2.5 D-E-F).

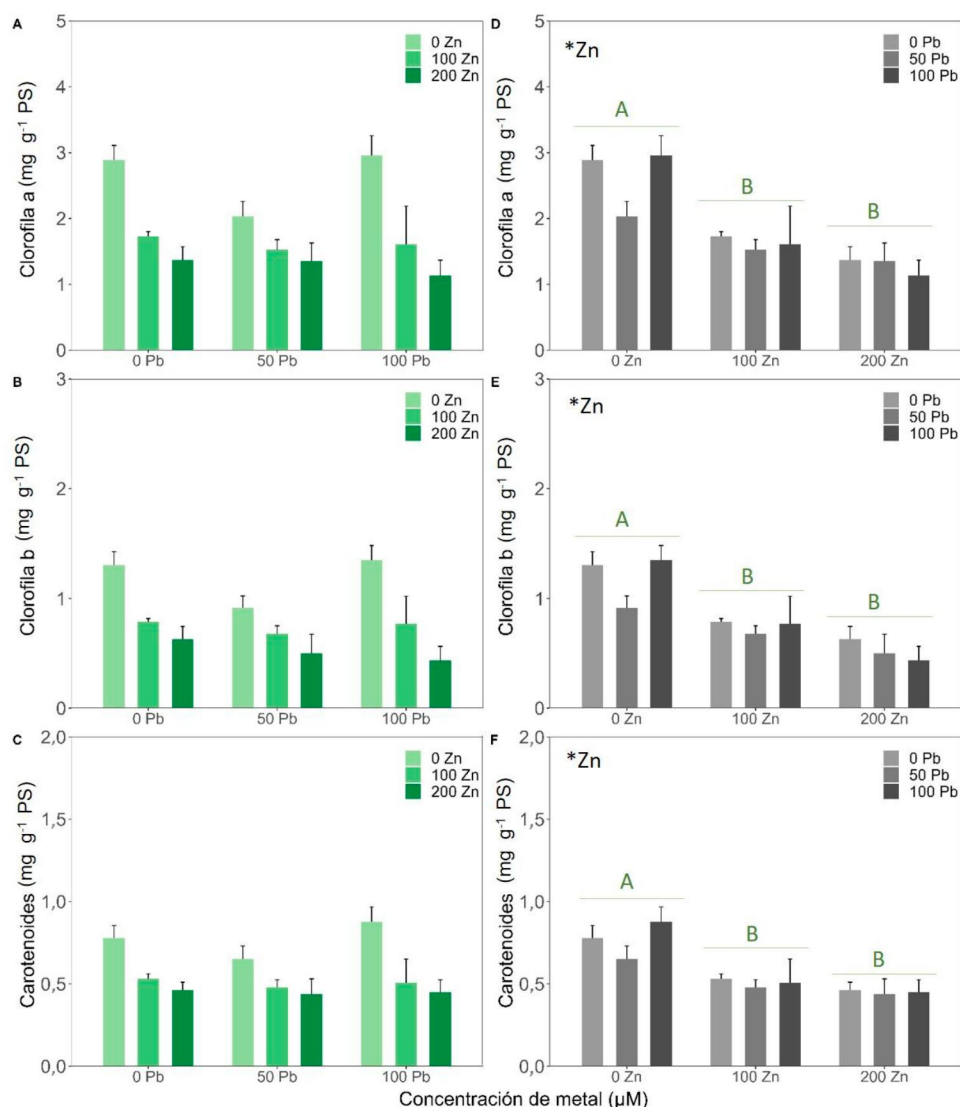


Figura 4.2.5: Concentración de pigmentos en *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; $n = 10$). Panel izquierdo: tratamientos ordenados según efecto principal Pb (0, 50 y 100 μM Pb). Panel derecho: tratamientos ordenados según efecto principal Zn (0, 100, 200 μM Zn). (A, D) clorofila a, (B, E) clorofila b y (C, F) carotenoides. *Zn en la esquina izquierda indica que el efecto factor principal Zn es estadísticamente significativo (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos principales (*Zn).

Respecto a la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT se registró un efecto significativo de interacción entre los factores Pb y Zn (ANOVA SOD: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$; ANOVA GPx:

[Pb]*[Zn], $P < 0,05$; ANOVA CAT: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$). Por otro lado, para la enzima APx solo se registró un efecto del factor principal Zn (ANOVA APx: [Zn], $P < 0,05$).

Las comparaciones de efectos simples para cada nivel de Pb en función del incremento de Zn (Zn|Pb) para la enzima SOD indicaron que la actividad de esta enzima se incrementó significativamente con el aumento del nivel de Zn, tanto a 0 μM Pb como a 50 μM Pb, mientras que disminuyó su actividad a 100 μM Pb frente a la adición 100 μM Zn (Fig. 4.2.6 A). Por otro lado, las comparaciones según el incremento de Pb para cada nivel de Zn (Pb|Zn), mostraron que a 0 μM Zn el aumento de Pb no modificó el nivel de la SOD. En cambio, a 100 y 200 μM Zn la SOD alcanzó su nivel máximo de actividad cuando el tratamiento contenía 50 μM Pb (Fig. 4.2.6 E).

Para la enzima de la enzima GPx, las comparaciones Zn|Pb indicaron que a 0 μM Pb no varió la actividad de esta enzima, a 50 μM Pb la actividad GPx fue mayor frente a la concentración de 200 μM Zn, mientras que a 100 μM Pb la GPx mostró un pico de actividad frente a la concentración 100 μM de Zn. Por otro lado, las comparaciones Pb|Zn, indicaron que la actividad a 0 μM Zn la GPx no varió, mientras que fue máxima en los tratamientos 100 μM Zn y 200 μM Zn, frente a la concentración 100 y 50 μM Pb, respectivamente (Fig. 4.2.6 C-G).

Respecto a la CAT, las comparaciones Zn|Pb mostraron que a 0 y 100 μM Pb los niveles en la actividad de esta enzima no variaron cuando se adicionó Zn, mientras que a 50 μM Pb su actividad fue significativamente menor en el tratamiento que contenía 100 μM Zn. Por otro lado, las comparaciones Pb|Zn indicaron que a 0 y 200 μM Zn la actividad no varió, en tanto a 100 μM Zn la actividad fue menor frente al nivel 50 μM Pb (Fig. 4.2.6 D-H).

Para la enzima APx se observó un aumento significativo en su actividad producto de la adición de Zn a la solución de riego; es decir que independientemente del nivel de Pb, en los tratamientos 100 y 200 μM Zn se observó mayor actividad APx (Fig.4.2.6 F).

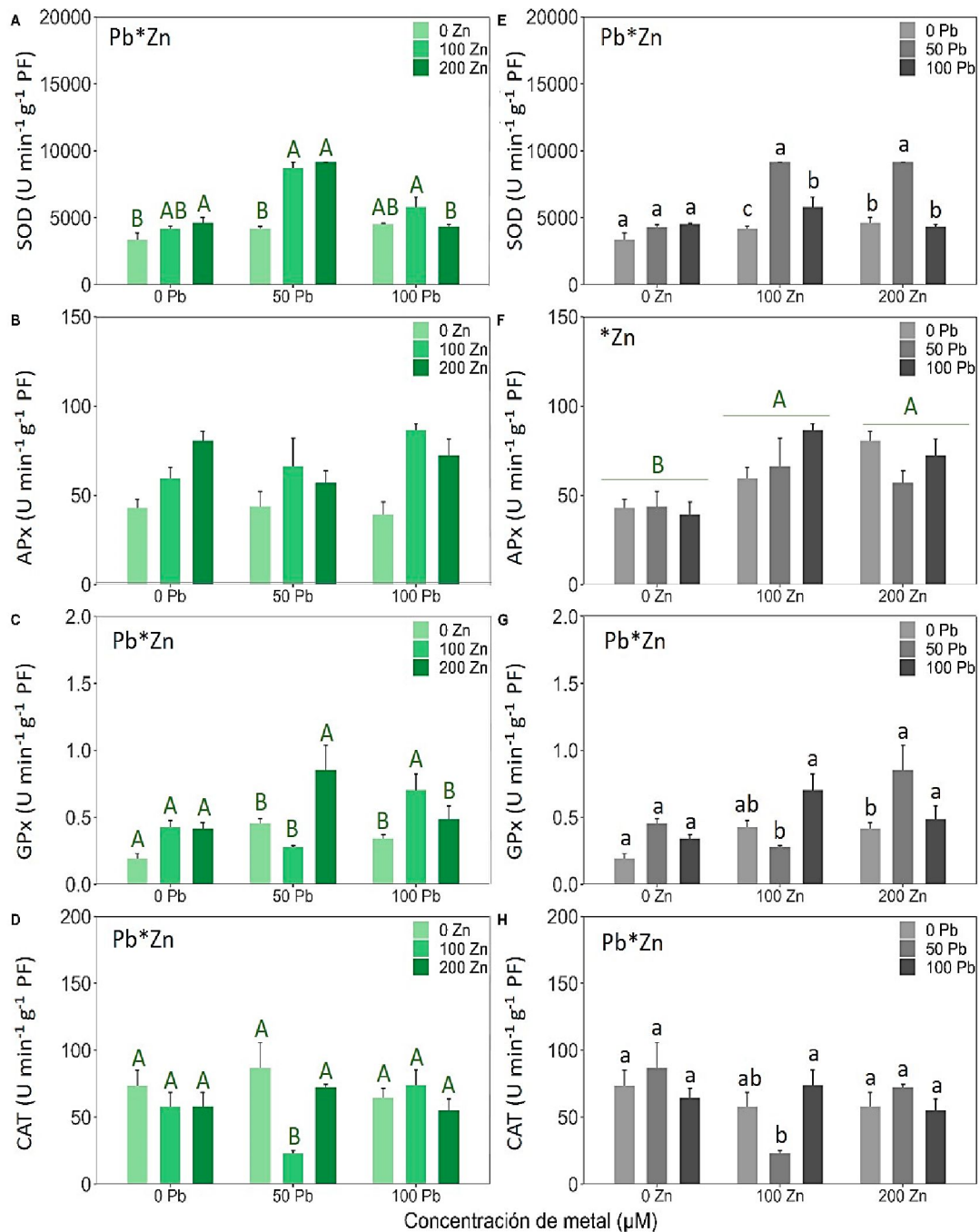


Figura 4.2.6: Actividad enzimática en hojas de *L. brasiliense* (media \pm el error estándar; n= 5). Panel izquierdo: (A, B, C, D): tratamientos graficados según incremento de tratamientos de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb). Panel derecho (E, F, G, H): tratamientos graficados según incremento de Zn (0, 100, 200 μ M Zn). (A, E) Superóxido dismutasa, SOD;(B, F) ascorbato peroxidasa, APx; (C, G) guaiacol peroxidasa, GPx; (D, H) catalasa, CAT. Pb*Zn o *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o el efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn).

No se encontró efecto significativo tanto de la interacción de los factores Pb y Zn como de los efectos principales sobre la concentración de malondialdehído (ANOVA MDA:

[Pb]*[Zn], $P > 0,05$; ANOVA MDA: [Pb], $P > 0,05$; ANOVA MDA: [Zn], $P > 0,05$; Fig. 4.2.7 A-B).

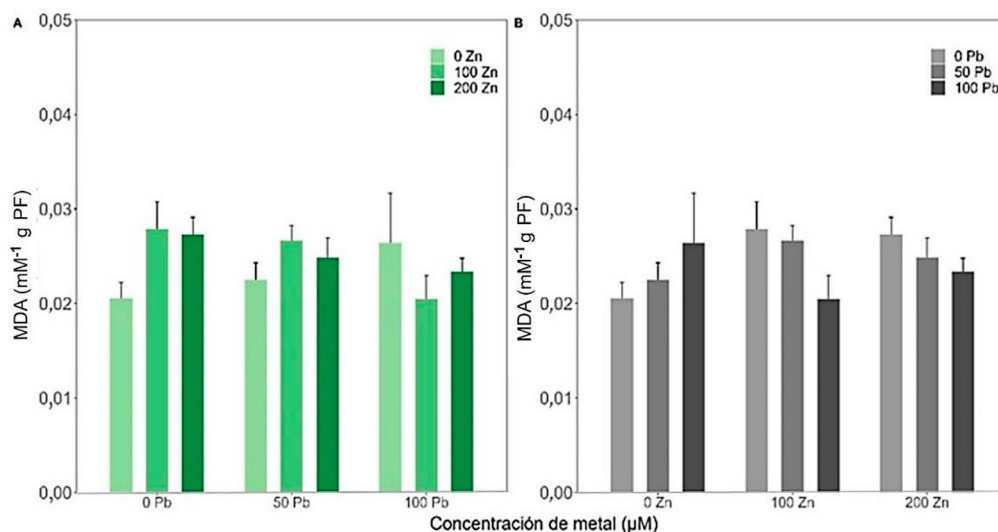


Figura 4.2.7: Concentración de malondialdehído en hojas de *L. brasiliense* (media \pm error estándar; n=5). Tratamientos graficados según (A) incremento de Pb (0, 50 y 100 μ M Pb) y (B) incremento de Zn (0, 100, 200 μ M Zn).

4.2.5. Parámetros morfométricos

La regresión alométrica del componente simétrico sobre el tamaño resultó significativa ($P < 0,05$), indicando que un 3,69% del total de la variación en forma se debió a la variación en tamaño. Debido a que este porcentaje fue menor al 5% (Zeldicth *et al.* 2004), los subsecuentes análisis se realizaron sobre las variables originales descartando el efecto alométrico sobre los datos originales.

El diagrama de dispersión del ACP realizado indicó que las primeras CPs explicaron un 84,93% de la varianza (CP1: 69,34%, CP2: 15,59; Fig. 4.2.8). El espectro de variación en forma expresó formas de hoja con modificaciones en la esbeltez del limbo y en la proyección del pecíolo. Las hojas que representaban los valores positivos de la CP1 presentaron láminas estrechas con pecíolos proyectados, mientras que los valores negativos presentaron pecíolos restringidos y láminas amplias. Por otro lado, la CP2 indicó formas de lámina lanceoladas o ahusadas para valores positivos del eje y formas de lámina globosa en los valores negativos.

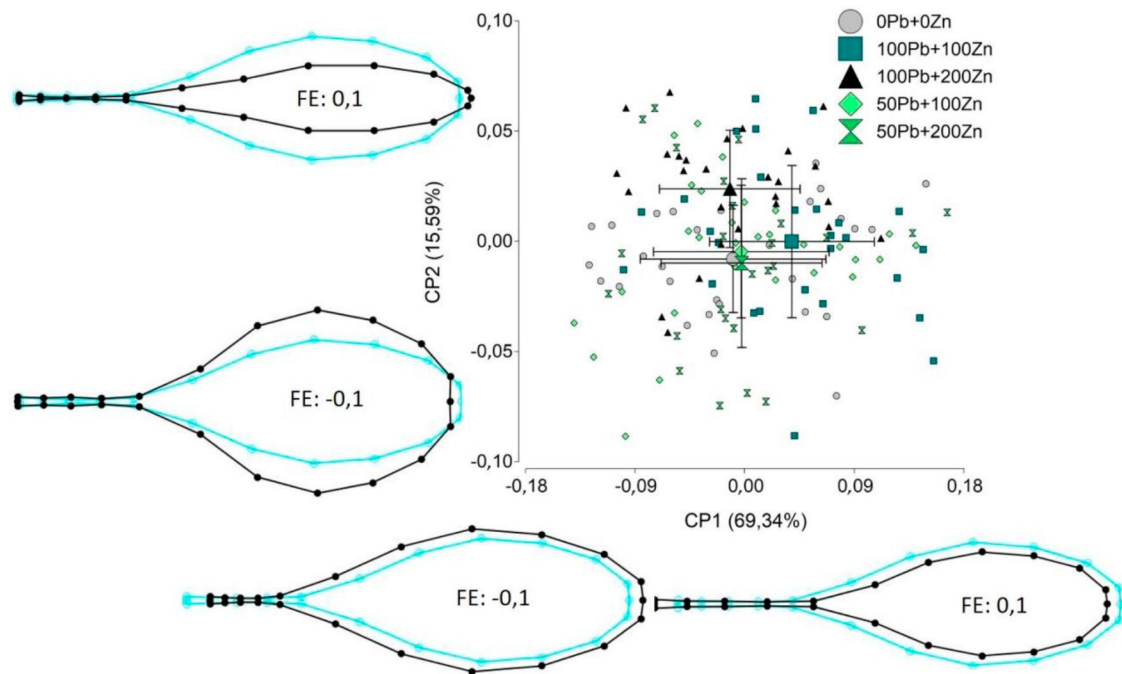


Figura 4.2.8: Gráfico de dispersión de las dos primeras componentes (CP1 vs CP2) del Análisis de Componentes Principales de las hojas de *L. brasiliense* del experimento combinado de Pb + Zn correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb+100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, mostrando el morfoespacio generado por ellos. Se representa la forma media de cada tratamiento (símbolo) \pm desvío (bigotes) hacia cada una de las componentes. A los márgenes de cada componente se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre la CP), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada CP.

El AVC realizado para los tratamientos indicó que el eje VC1 explicó un 38,29% de la varianza, en tanto el VC2 explicó un 34,16%. En el gráfico de dispersión se observó una separación entre los tratamientos sobre ambos ejes, evidenciándose un gradiente de separación de los tratamientos desde los valores positivos del eje VC1, hacia los valores positivos del eje VC2. Sobre el eje VC1 dominó el efecto del Zn mientras que sobre el eje VC2 dominó el efecto del Pb (Fig.4.2.9).

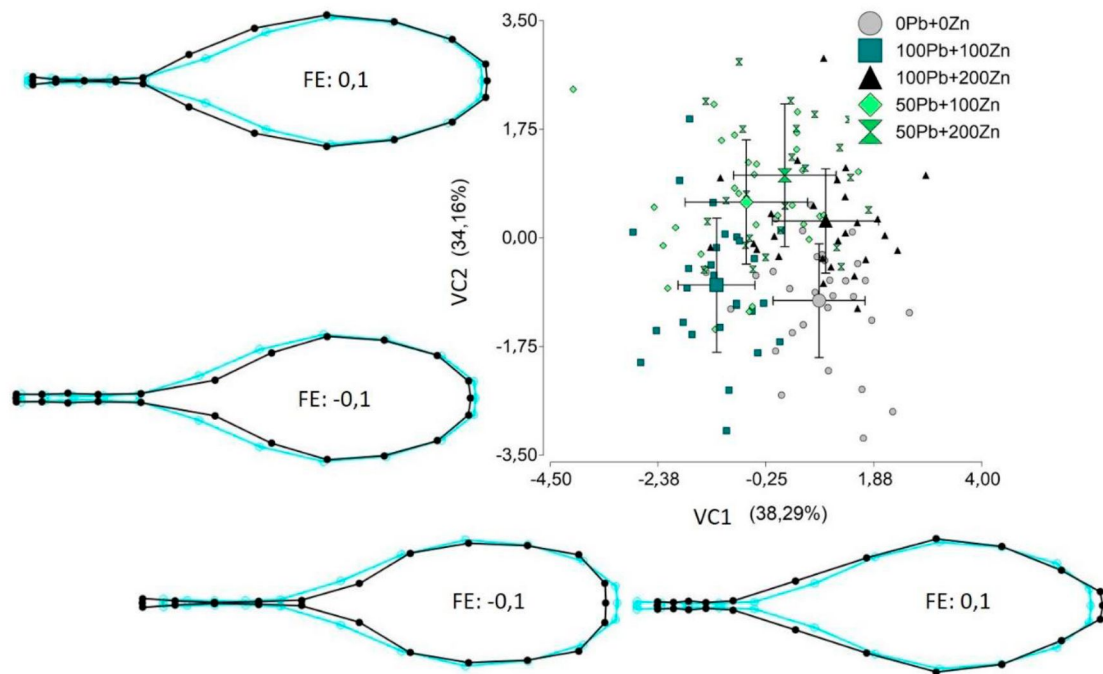


Figura 4.2.9: Diagrama de dispersión del Análisis de Variables Canónicas de la hoja en *L. brasiliense* para el experimento combinado de Pb + Zn, correspondientes a los tratamientos: 0 μM Pb + 0 μM Zn, 50 μM Pb + 100 μM Zn, 100 μM Pb + 100 μM Zn, 50 μM Pb + 200 μM Zn y 100 μM Pb + 200 μM Zn, en el cual se muestran los primeros dos ejes canónicos (VC1 vs VC2). A los márgenes de cada eje se expresa el porcentaje de varianza explicado y se muestra el contorno de la hoja representando el cambio en forma (color negro) asignado por el factor de escala (FE: valor determinado sobre el eje de la VC), respecto a la forma consenso (color turquesa) hacia los lados positivos y negativos de cada eje.

El MANOVA realizado con las primeras 7 CPs (representando el 99% de la variación total) indicó diferencias significativas entre las formas medias de los tratamientos (Pillai, $P < 0,0001$). El análisis de conglomerados distinguió 4 grupos correspondientes con los tratamientos (Fig. 4.2.10). Los tratamientos más cercanos entre sí fueron aquellos tratamientos que contenían 50 μM Pb (50 μM Pb + 100 μM ; 50 μM Pb + 200 μM Zn) con el tratamiento más contaminado (100 μM Pb + 200 μM Zn), junto al control (0 μM Pb + 0 μM Zn); mientras que el tratamiento más distante fue 100 μM Pb + 100 μM Zn.

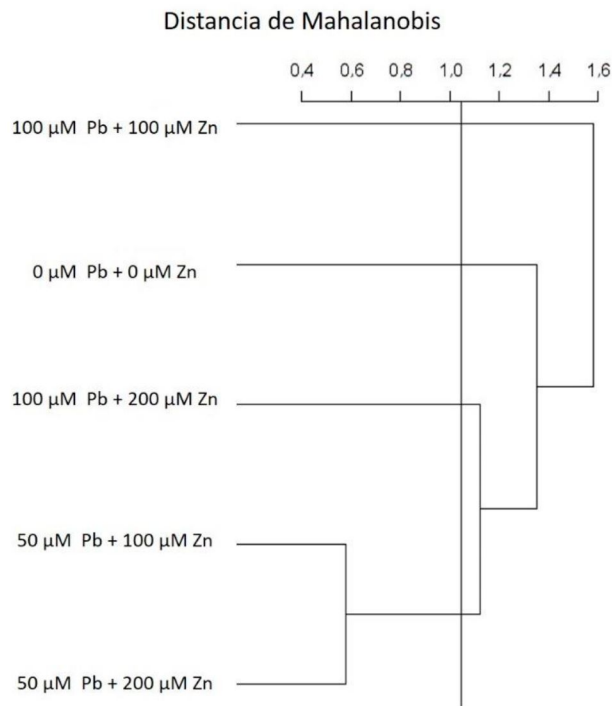


Figura 4.2.10: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA (MDGC) sobre las distancias de Mahalanobis, realizado con las Componentes Principales que explican el 99% de la variación en forma ($n^{\circ} C = 7$) entre los tratamientos combinados Pb + Zn y el control. El valor de la distancia de Mahalanobis que determina la significancia estadística ($P < 0,05$) entre los grupos se indica mediante una línea vertical.

Se encontró un efecto significativo de la interacción entre los factores Pb y Zn sobre el largo y CS de la hoja (ANOVA largo: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$; ANOVA CS: [Pb]*[Zn], $P < 0,05$); mientras que para el ancho de la hoja se registró una reducción significativa producto de la adición de Zn (ANOVA: [Zn], $P < 0,05$; Fig. 4.2.11 E). Las comparaciones Zn | Pb del largo y el tamaño de la hoja indicaron que el aumento del Zn produjo una reducción de ambas variables (Fig. 4.2.11 A-C). Por otro lado, las comparaciones Pb | Zn indicaron que: a 0 μM Zn la concentración más alta de Pb produjo hojas más cortas y de menor tamaño, a 100 μM Zn el aumento de Pb no produjo cambio, mientras que para la concentración 200 μM Zn las hojas fueron más pequeñas en ausencia de Pb y frente a la concentración 100 a 0 μM Pb (Fig. 4.2.11 D-F).

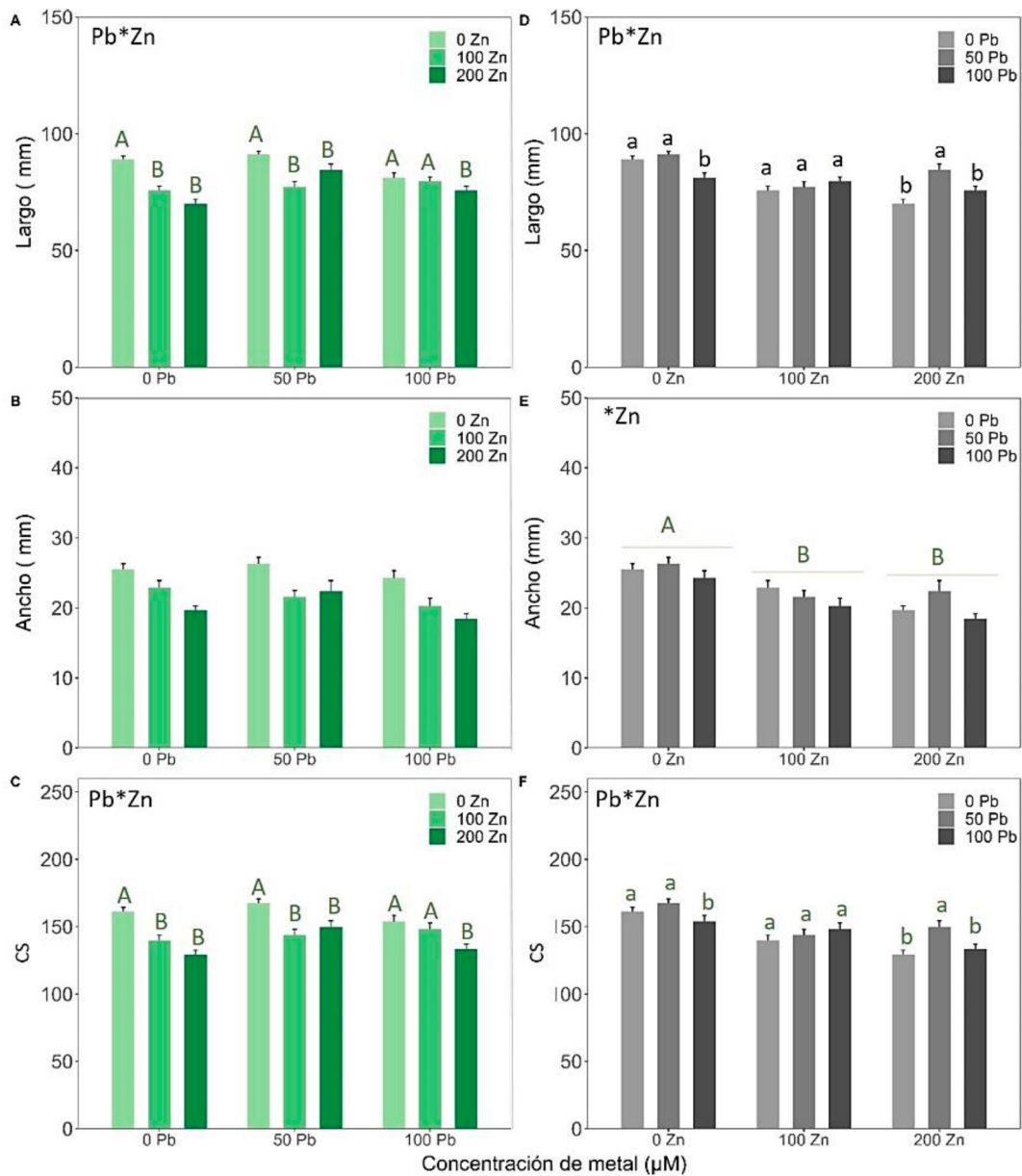


Figura 4.2.11: Media \pm error estándar ($n = 10$) del largo, ancho y *centroid size* (CS) de hojas de *L. brasiliense* según tratamiento con Pb (0, 50 y 100 μM Pb) o Zn (0, 100 y 200 μM Zn). Las letras mayúsculas (A, B) representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de Zn (Tukey, $P < 0,05$). Pb*Zn o *Zn en la esquina izquierda indican que el efecto de la interacción (Pb*Zn) o el efecto factor principal Zn son estadísticamente significativos (ANOVA, $P < 0,05$). Las letras minúsculas (a, b) representan diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Pb en las comparaciones de efectos simples (Pb|Zn); mientras que las letras mayúsculas (A, B) representan estadísticas (Tukey, $P < 0,05$) para el Zn, en las comparaciones de efectos simples (Zn|Pb) y principales (*Zn).

4.2.6. Índice Biológico de Respuesta Integrada: IBRv2

Los valores de IBRv2 para cada uno de los 9 tratamientos se presentan en la Figura 4.2.12. El tratamiento 100 μM Pb presentó el valor más bajo de IBRv2 (6,40); mientras que el tratamiento 50 μM Pb + 200 μM Zn alcanzó el mayor valor de IBRv2 (20,76). En general se observó que los tratamientos que contenían 100 y 200 μM Zn, presentaron mayor

valor de IBRV2 y que a su vez este índice fue aún mayor cuando se lo combinaba en solución con Pb, independientemente de la concentración utilizada.

En los gráficos de estrella se observa que la inhibición o inducción de los biomarcadores medidos dependió del tratamiento, es decir, del/los metal/es presentes en la solución de riego. El tratamiento 50 μM Pb presentó reducción de la concentración de pigmentos y un leve aumento de los parámetros Q_y y Φ_{psII} y la concentración de MDA; inducción de las enzimas SOD, APx y CAT, mientras que la GPx presentó un marcado aumento en su actividad (Fig. 4.2.12 A). El tratamiento 100 μM Pb mantuvo la concentración de pigmentos, de los parámetros Q_y y Φ_{psII} y la actividad de las enzimas APx y CAT similares al control; mientras que las enzimas SOD y GPx junto a la concentración de MDA aumentaron (Fig. 4.2.12 E). El tratamiento 100 μM Zn mostró disminución de la concentración de pigmentos y en los niveles de la enzima CAT, mientras que los parámetros Q_y y Φ_{psII} permanecieron similares al control. La actividad de la enzima SOD, APx y GPx y la concentración de MDA fueron superiores al control (Fig. 4.2.12 B). El tratamiento 200 μM Zn mostró una marcada reducción de la concentración de pigmentos, de los valores de Q_y y Φ_{psII} y de los niveles de la enzima CAT, mientras que la actividad SOD, APx y GPx fueron menores al control y la concentración de MDA mostró una marcada inducción (Fig. 4.2.12 F). El tratamiento 50 μM Pb +100 μM Zn evidenció un patrón similar al del tratamiento 100 μM Zn, es decir presentó reducción de todos los biomarcadores medidos excepto en la actividad de las enzimas SOD, APx y GPx y los niveles de MDA, los cuales desarrollaron una marcada inducción (Fig. 4.2.12 C). El tratamiento 100 μM Pb +100 μM Zn indicó reducción en la concentración de pigmentos y de los parámetros de la eficiencia del fotosistema II (Q_y y Φ_{psII}), mientras que se observó un marcado aumento de la actividad de las enzimas SOD, APx y GPx, pero sin modificar los niveles de MDA y CAT (Fig. 4.2.12 G). El tratamiento 50 μM Pb +200 μM Zn indicó una disminución pronunciada de la concentración de pigmentos y de los parámetros Q_y y Φ_{psII} , en cuanto a la actividad CAT se mantuvo similar al control. La actividad de las enzimas SOD, APx y GPx mostraron una fuerte inducción al igual que la concentración de MDA (Fig. 4.2.12 D). El tratamiento 100 μM Pb +200 μM Zn evidenció una marcada reducción de la concentración de pigmentos y de los parámetros Q_y y Φ_{psII} , al igual que la actividad de la enzima CAT; mientras que los niveles de las enzimas SOD, APx y GPx y la concentración de MDA aumentaron (Fig. 4.2.12H).

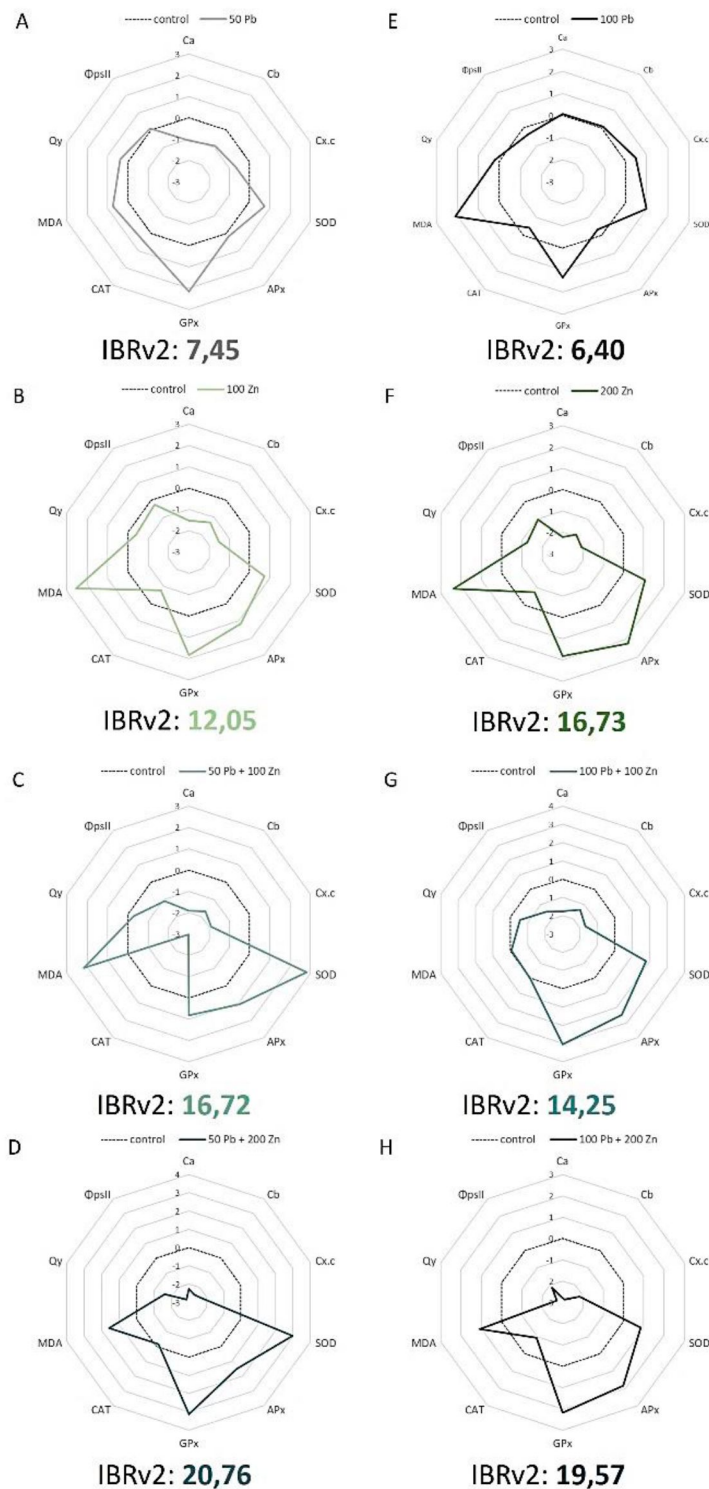


Figura 4.2.12: Gráficos de estrella del Índice Biológico de Respuesta Integrada versión 2 (IBRv2) para los tratamientos (A) 50 Pb, (B) 100 Pb, (C) 100 Zn y (D) 200 Zn, basado en los siguientes biomarcadores medidos en hojas de *L. brasiliense*: clorofila a (Ca), clorofila b (Cb), carotenoides (Cx+c), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), guaiacol peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), eficiencia máxima del fotosistema II (Qy) y eficiencia del fotosistema II (ΦpsII). La línea punteada corresponde al tratamiento control, mientras que las líneas de color (grises: tratamientos Pb, verdes: tratamientos Zn) reflejan el incremento o inhibición de cada biomarcador respecto al control.

4.2.7. Discusión

Los metales pueden interactuar entre sí, modificando la absorción, transporte y acumulación de otros elementos cuando se encuentran juntos en el medio (Kachout *et al.* 2009). En *L. brasiliense*, el transporte y la acumulación de Pb y Zn en su biomasa no dependió de la presencia simultánea de ambos metales en el medio; sino que su concentración se incrementó concomitantemente con la adición de Pb y Zn al riego, tanto en las raíces como en la biomasa aérea. Además, en todos los tratamientos, independientemente del patrón de acumulación para cada metal, el Zn siempre superó la concentración de Pb en ambos órganos. Esto puede deberse a la que este metal es un micronutriente esencial. Además, se conoce que el Pb y Zn presentan diferente movilidad en las plantas, siendo el Zn más móvil que Pb (Greger 2004).

El Pb fue acumulado principalmente en las raíces, superando los $300 \mu\text{g g}^{-1}$ PS en algunos tratamientos. Este patrón de acumulación se reflejó en los valores de los índices $\text{FBA} < 1$ y $\text{FT} < 1$; mientras que el FBC superó diez veces la unidad en todos los tratamientos, excepto en el más contaminado ($100 \mu\text{M Pb} + 200 \mu\text{M Zn}$, $\text{FBC} = 9$). En cambio, el Zn fue concentrado principalmente en la biomasa aérea, tal como lo evidencian los valores de $\text{FT} > 1$ y en $\text{FBA} \geq 30$ en todos los tratamientos donde se adicionó Zn a la solución de riego. Sin embargo, se observó que el FBC para el Zn se redujo al duplicar la concentración de Zn en el riego y con el agregado Pb. Por otro lado, las plantas de todos los tratamientos que contenían Pb alcanzaron los niveles fitotóxicos en la biomasa radical (entre $30\text{-}300 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Pb) y aérea ($0,6 - 28 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Pb). Mientras que, en el caso del Zn los niveles en ambos órganos se encontraban dentro del rango fitotóxico ($100 - 300 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Zn) en el control y los tratamientos que contenían $100 \mu\text{M Zn}$, superándolo en los tratamientos que contenían la mayor concentración ($200 \mu\text{M}$) (Krämer *et al.* 2010, Kachout *et al.* 2012, Aziz y Mujeeb 2022).

Estudios realizados en otras especies del género *Limonium* mostraron un rango similar de acumulación para estos metales. Por ejemplo, Martín-Sánchez y colaboradores (2012) demostraron que la especie *L. cartaginens* que habita los suelos áridos de una zona minera de Murcia acumuló en promedio más Pb y Zn en sus raíces ($138 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Pb y $392 \pm 27 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Zn) que en su biomasa aérea ($107 \pm 7 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Pb y $297 \pm 22 \mu\text{g g}^{-1}$ PS Zn). Sin embargo, el FBC y FT para esta especie no superó la unidad para ninguno de los dos

metales, por lo que se la consideró como especie tolerante y fitoestabilizadora para estos metales. Se han observado patrones similares en otras halófitas, por ejemplo, poblaciones de *Juncus acutus* que crecían en dos sitios con suelos con alto contenido de Pb y Zn biodisponibles (entre 243-288 $\mu\text{g g}^{-1}$ Pb; 220-330 $\mu\text{g g}^{-1}$ Zn), mostraron acumular Zn en la raíz y transportarlo en gran medida hacia la biomasa aérea, mientras que el Pb se restringió a las raíces (Alam *et al.* 2023). Sin embargo, los valores alcanzados de FBC (FBC_{Zn}: 1,01 y FBC_{Pb}: 0,6) y FBA (FBA_{Zn}: 0,58 y FBC_{Pb}: 0,02) en *J. acutus* (Alam *et al.* 2023) fueron muy bajos en comparación a los hallados en este subcapítulo para *L. brasiliense*. Otros estudios, han postulado a distintas especies halófitas (*Aster tripolium*, *J. acutus*, *Plantago marítima*, *Phragmites australis*, *Spartina spp.*) como especies fitoestabilizadoras de Zn y Pb, debido a que toleran dichos metales y restringen la acumulación de estos metales a sus raíces demostrando a su vez elevada tolerancia a estos metales (Burke *et al.* 2000, Fitzgerald *et al.* 2003, Mateos-Naranjo *et al.* 2014). Los resultados hallados en este subcapítulo denotan una gran capacidad de *L. brasiliense* para tolerar y acumular Pb y Zn en su biomasa subterránea y aérea respectivamente, indicando su capacidad de fitoestabilizar el Pb y fitoextraer el Zn.

Los procesos de fitorremediación dependen en gran parte de la producción o desarrollo en biomasa de la especie de planta junto a la capacidad de concentrar metales en la misma. En relación a esto, *L. brasiliense* no varió su biomasa, ni modificó su crecimiento relativo al acumular Pb y Zn en sus órganos. De igual modo, la especie arbustiva *Limoniastrum monopetalum* presentó tolerancia a la presencia conjunta de Cd y Pb sin mostrar signos de toxicidad en relación a la producción en biomasa, al contenido de clorofila y de agua (Manousaki *et al.* 2014). Contrariamente, el crecimiento de la halófito *Suaeda salsa* fue inhibido frente a la presencia individual y combinada de Pb y Zn en dosis muy bajas (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn) (Wu *et al.* 2013). Estos resultados subrayan la naturaleza específica de la respuesta metal-especie, la cual a su vez, está condicionada por las concentraciones particulares de los metales.

La capacidad para mantener la biomasa constante y un balance osmótico adecuado hace de las halófitas excelentes candidatas para la fitorremediación de sitios contaminados por metales (Aziz y Mujeeb 2022, Singh *et al.* 2023). Las plantas estresadas por la presencia de metales en niveles tóxicos muestran un desbalance en las relaciones hídricas, no solo

porque disminuye el desarrollo radical, sino por cambios producidos en la permeabilidad de las raíces, bloqueando acuaporinas lo que reduce la entrada de agua (Barceló y Poschenrieder 1990, Hirve *et al.* 2020). En este sentido se observó que el CA en las plantas de *L. brasiliense* dependió de las concentraciones de Pb y Zn presentes en cada tratamiento. Los resultados indicaron que cuando las concentraciones de Pb en la solución de riego eran menores el CA disminuyó al agregar Zn en la solución de riego. La disminución del CA relacionada al incremento de Zn, podría deberse a su alta acumulación en la raíz y en la biomasa aérea, como se discutió en el capítulo III (subcapítulo II). El Zn puede inhibir los canales de iones y agua de las células guardianas de los estomas, restringiendo el cierre estomático, o bien producir un cambio en la permeabilidad de las membranas de las raíces conduciendo en ambos casos a estrés hídrico (Yang *et al.* 2022, Bhatla 2018).

Si bien todas las plantas de *L. brasiliense* sobrevivieron a los tratamientos aplicados, se observó una leve clorosis en las plantas relacionada al incremento de los metales en solución. En relación a esto, los resultados mostraron que la eficiencia del fotosistema II, estimada por los parámetros PSII y Qy, y el contenido de pigmentos en *L. brasiliense* se vieron afectados por el incremento de Zn. Se sabe que el exceso de Zn puede provocar la disminución de los pigmentos fotosintéticos y la alteración de la tasa fotosintética. Tal como se menciona en el capítulo III (subcapítulo II), uno de los primeros indicios de estrés por Zn en las hojas es el daño al fotosistema II (PSII), la inhibición de la fotosíntesis y reducción de la eficiencia del PSII (Monnet *et al.* 2001, Vaillant *et al.* 2005, Luo *et al.* 2010, Huang *et al.* 2019). Mateos-Naranjo y colaboradores (2018) mostraron que el contenido de clorofilas a en *J. acutus* (especie hipertolerante al Zn) disminuyó frente a la adición de Zn (30 y 100 mM Zn), mientras que la clorofila b y carotenoides se mantuvo constante frente a ese rango de exposición al Zn. Sin embargo, en otro experimento bajo el mismo rango de concentraciones de Zn, *J. acutus* mantuvo constante la asimilación de carbono y la eficiencia del fotosistema II, aunque el contenido de pigmentos fotosintéticos disminuyó conforme aumentaba el Zn en la solución de riego (Mateos-Naranjo *et al.* 2014).

Tanto el Pb como el Zn pueden desencadenar la formación de especies ROS, las cuales pueden dañar estructuras celulares, incluyendo proteínas, lípidos y ADN (Arif *et al.* 2016,

Hirve *et al.* 2020). En consecuencia, la activación del sistema antioxidante es esencial para contrarrestar los efectos dañinos de estas moléculas y preservar la integridad celular. Los resultados obtenidos en este subcapítulo sugieren que el patrón de actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT depende de la concentración simultánea de Pb y Zn presente en el medio, mientras que la enzima APx presentó un incremento pronunciado en su actividad con la adición de Zn en la solución de riego (como se observó en el subcapítulo I del capítulo III), independientemente del nivel de Pb. En particular, la actividad SOD se incrementó frente a niveles intermedios de Pb, tanto a 100 como a 200 μM Zn. Para la enzima GPx el patrón fue más variable, ya que se observaron picos de actividad frente al nivel 50 μM Pb frente a la concentración 200 μM Zn o en la concentración 100 μM Pb con 100 μM Zn. Wu y colaboradores (2013) evaluaron experimentalmente la actividad antioxidante en *S. salsa* cuando se la sometía a dosis individuales y combinadas de Pb y Zn (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn). Estos autores encontraron que los tratamientos Zn, y Zn + Pb inducían la actividad enzimática SOD y GPx, respecto del control (sin metal) y del tratamiento individual de Pb. Sin embargo, observaron que los niveles de estas enzimas fueron mayores en plantas tratadas únicamente con Zn, y menores en el tratamiento Zn + Pb. Por otro lado, mientras que la actividad CAT en *S. salsa* exhibió un patrón de aumento de acuerdo a Pb < Zn < Pb+Zn, en el caso de *L. brasiliense* (en este subcapítulo) se observó una reducción en su actividad frente a la presencia simultánea 50 μM Pb + 100 μM Zn. Del mismo modo, un estudio realizado con la halófito *Aeluropus littoralis* mostró que concentraciones 50 y 100 μM Zn inhiben la actividad de la enzima CAT (Rastgoo *et al.* 2014). El sistema antioxidante en *L. brasiliense* demostró ser capaz de mitigar el impacto generado por la presencia simultánea de Pb y Zn ya que no se registró incremento significativo en los niveles de MDA.

Las variaciones de la forma de la hoja de las plantas de *L. brasiliense* sometidas al incremento conjunto de Pb y Zn implicaron principalmente variaciones en la esbeltez de la base y el ápice de la lámina y en la proyección del pecíolo. El AVC indicó separación entre los grupos sobre ambas variables canónicas. A su vez, el análisis de conglomerado mostró 3 grupos significativamente distintos al control, indicando la existencia plasticidad fenotípica en la forma de las hojas de *L. brasiliense* dependiente de las concentraciones de ambos metales en el medio. Un estudio a campo realizado en esta misma especie a lo largo de un gradiente multimetálico (Zn > Pb > Cu), indicó hojas con láminas ahusadas y

de pecíolo proyectados en el sitio más contaminado y hojas de globosas y pecíolo retraído en el menos contaminado (Idaszkin *et al.* 2023). De igual manera, la hoja de la halófito *Cressa truxillensis* mostró cambios similares en su forma a lo largo del mismo gradiente de contaminación (Pollicelli *et al.* 2018). Respecto al tamaño, tanto el largo como el CS de la hoja se vieron afectados por la presencia conjunta de Pb y Zn, indicando que el aumento de las concentraciones de estos metales produce reducción en estas variables. Por otro lado, el ancho de la hoja solo se redujo frente a la adición de Zn. En su conjunto estos resultados muestran la existencia de patrones similares a los estudios mencionados a campo, respaldando la adaptabilidad de *L. brasiliense* a condiciones ambientales variables y subrayando la complejidad de las interacciones metal-planta en entornos contaminados.

Se observó una tendencia general al aumento del índice IBRV2 desde los tratamientos individuales hacia los combinados, siguiendo el gradiente tratamientos Pb < Zn < Pb+ Zn. Sin embargo, aunque se esperaba que el tratamiento que muestre mayor valor de IBRV2 sea el tratamiento compuesto por las concentraciones más elevadas de Pb y Zn (100 μ M Pb + 200 μ M Zn) los resultados indicaron que el tratamiento 50 Pb + 200 Zn presentó el mayor valor de IBRV2. Esto sugiere que fue el tratamiento que experimentó mayor variación en los biomarcadores medidos y, por lo tanto, mayor estrés. Además, indica un efecto aditivo entre los metales Pb y Zn cuando se hallaban juntos en solución de riego, ya que los tratamientos que contenían únicamente 50 μ M Pb o 200 μ M Zn mostraron también los valores más elevados del índice comparando con los restantes controles de Pb y Zn.

CAPÍTULO

Conclusiones generales y
consideraciones finales.



Las especies de plantas halófitas *A. vulgatissima* y *L. brasiliense* son capaces de sobrevivir a las concentraciones de Pb (50 y 100 μM Pb) y Zn (100 y 200 μM Zn) a las que fueron expuestas, de manera individual y combinada. Además, ambas especies acumularon Pb y Zn conforme aumentó la concentración de estos metales en solución de riego, sin registrarse antagonismo o sinergia entre ambos metales cuando se encontraban juntos en la solución de riego.

El patrón de acumulación de los metales en la raíz y la biomasa aérea sugiere que *A. vulgatissima* podría ser adecuada para fitoestabilizar Pb y Zn cuando ambos metales están presentes en el medio, y para fitoextraer Zn cuando este metal se encuentra solo. Por otro lado, *L. brasiliense* sería adecuada para fitoestabilizar Pb y fitoextraer Zn en presencia individual y conjunta de ambos metales.

La regulación de la actividad fotosintética y la activación de la maquinaria de enzimas antioxidantes confieren a *A. vulgatissima* y *L. brasiliense* una gran capacidad de tolerar y adaptarse a los niveles estudiados de Pb y/o Zn.

Para ambas especies la forma de la hoja es un carácter plástico respecto a la acumulación de Pb y Zn. Además, se determinó que las variaciones en forma asociadas al incremento de Pb y/o Zn están asociadas a pecíolos proyectados y láminas ahusadas.

Señales como el aumento de los niveles de MDA, en los experimentos de incremento individual de Pb o Zn, sugieren indicios de estrés en respuesta a las concentraciones más altas de Pb y Zn en *A. vulgatissima* y únicamente frente al nivel más alto de Zn en *L. brasiliense*. Por otro lado, la presencia conjunta de Pb y Zn, activa mecanismos de saturación y defensa como la batería de enzimas antioxidantes, las cuales previenen el daño de membranas, sugiriendo que ambas especies podrían ser buenas biomonitoras frente a escenarios de contaminación por estos metales.

Según el IBRV2, de los experimentos de incremento individual de Pb y Zn los tratamientos 50 μM Pb y 200 μM Zn fueron los más estresantes para ambas especies, ya que alcanzaron los valores más altos del índice. A su vez, en los experimentos de incremento conjunto en ambas especies, el tratamiento con mayor valor de IBRV2 fue el que contenía 50 μM Pb + 200 μM Zn. Se destaca el índice IBRV2 como herramienta útil para diferenciar,

visualizar y evaluar de manera integral los efectos individuales y combinados del Pb y Zn en el estado de salud de las plantas.

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila, la concentración de pigmentos, el contenido de MDA y el uso del análisis morfogeométrico, demostraron ser biomarcadores eficientes para evaluar los efectos del estrés causados por estos metales, mostrando sensibilidad entre los diferentes tratamientos.

Es importante destacar que los hallazgos en esta tesis constituyen una línea de base sobre el potencial de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima* para tolerar y acumular estos metales. Por esta razón, es esencial llevar a cabo investigaciones adicionales donde se utilice suelo y concentraciones más elevadas y/o rangos más amplios de estos metales para corroborar estos hallazgos y proporcionar mayor evidencia empírica del potencial fitorremediador de *L. brasiliense* y *A. vulgatissima*. Además, se recomienda realizar estudios pilotos a campo utilizando estas especies en la restauración de suelos contaminados por Pb y Zn. Este tipo de estudio se debería realizar a largo plazo y en diferentes latitudes, para evaluar la estabilidad y efectividad fitorremediadora de estas especies.



Glosario I

Alometría: covariación de la forma con el tamaño.

Bioindicador: organismo (bacterias, plantas, hongos y animales) que interactúa con agentes xenobióticos o contaminantes y refleja las concentraciones de estos en el ambiente, proporcionando información sobre la salud o el estado de los ecosistemas mediante la alteración de su comportamiento o la modificación de su presencia o ausencia.

Biorremediación: proceso mediante el cual se utilizan organismos vivos, como bacterias, hongos, algas o plantas, para eliminar, degradar o transformar contaminantes presentes en suelos, aguas o sedimentos, en sustancias menos tóxicas o no tóxicas.

Centroid size: Se obtiene mediante el cálculo de la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias al cuadrado entre cada uno de los *landmarks* y el centroide de dicha configuración. En ausencia de alometría es un estimador insesgado del tamaño de un objeto.

Factor de bioacumulación (FBA): relación entre la concentración de un contaminante en la biomasa aérea de una planta y su concentración en el medio circundante (suelo o agua). Un FBA mayor a 1 indica que la planta es capaz de acumular el contaminante en su biomasa aérea en niveles superiores a los presentes en el medio ambiente, siendo útil para la fitoextracción.

Factor de bioconcentración (FBC): relación entre la concentración de un contaminante en las raíces de una planta y su concentración en el medio circundante (suelo o agua). Un FBC mayor a 1 indica que la planta es capaz de acumular el contaminante en sus raíces en niveles superiores a los presentes en el medio ambiente, siendo útil en procesos de fitoestabilización.

Factor de translocación: relación entre la concentración de un contaminante en la biomasa aérea de una planta y su concentración en las raíces. Este factor indica la eficiencia con la que una planta puede translocar contaminantes absorbidos desde las raíces hasta la biomasa aérea, y se utiliza para evaluar el potencial de una planta para la fitoextracción.

Fitorremediación: técnica de bioremediación ambiental que utiliza plantas para eliminar, degradar, estabilizar o volatilizar contaminantes presentes en suelo, agua o sedimentos.

Forma (*shape*): propiedades geométricas inherentes de un objeto que no dependen del tamaño, posición y rotación, es decir, toda información geométrica que permanece una vez que se han descartado los efectos de escala, translación y rotación de los datos primarios.

Landmark: punto específico de la forma en estudio, que está definido biológicamente o determinado a través de la colocación del objeto según determinadas reglas. Los *Landmarks* están definidos semánticamente y los que presentan el mismo nombre o número son homólogo entre especímenes.

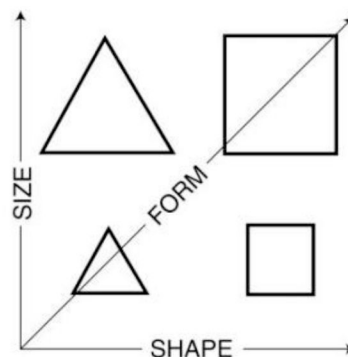
Wireframe: gráfico de polígonos donde los puntos o *landmarks* de una configuración determinada se encuentran unidos por vectores, mostrando el contorno de la forma en estudio.

Anexo I



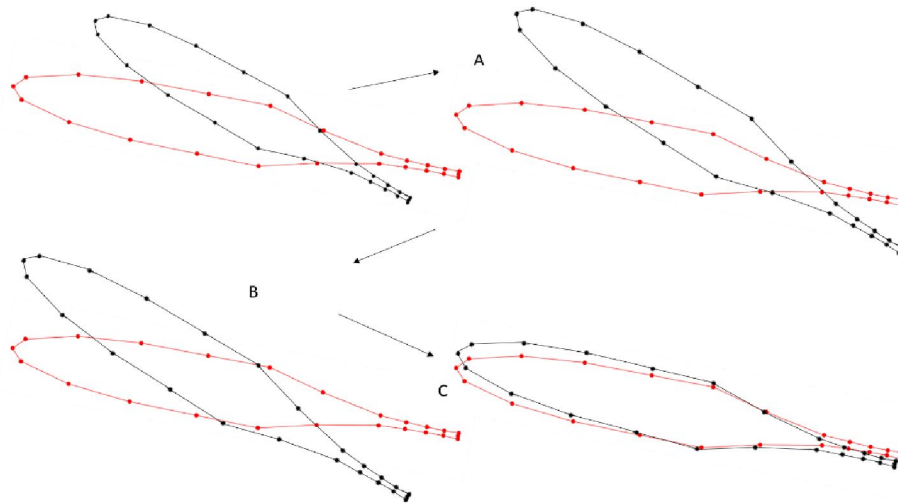
Generalidades del análisis morfogeométrico

La morfometría geométrica (MG) es una herramienta que permite el estudio en detalle de cambios en tamaño (en inglés *size*, ver glosario) y forma (en inglés *shape*, ver glosario) de una estructura (Anexo Figura 1) de manera independiente. El análisis morfogeométrico consta básicamente de 3 etapas. La primera de ella consiste en la obtención de los datos espaciales de imágenes en 2D o volúmenes en 3D. En esta etapa se captura la forma del objeto mediante un conjunto de *landmarks* (ver glosario) y *semilandmarks*, previamente definidos, donde cada uno de ellos queda determinado por coordenadas cartesianas x, y o x, y, z , según sea una estructura 2D o 3D, respectivamente. Los *semilandmarks* son tratados de igual manera que los *landmarks* luego de ser deslizados a lo largo de la línea o superficie, de manera de minimizar la energía de curvatura de la función TPS (por sus siglas en inglés de *Thin Plate Spline*). El número de *landmarks* y *semilandmarks* utilizados varía según la estructura bajo estudio, sin embargo, para optimizar el análisis, el tiempo y el esfuerzo deben cumplir con ciertos requisitos. El conjunto de *landmarks* debe ser representativo para definir la forma en estudio y el número de puntos no debe exceder el tamaño muestral (Adams *et al.* 2004), sino que este último debe ser de al menos el doble que el primero. Además, una buena elección de los *landmarks* ayuda a la localización de los mismos y a minimizar el error de digitalización. Cuando se trabaja en 2D, la imagen a analizar debe ser coplanar para evitar pérdida de información o una interpretación inadecuada de los datos (Zelditch *et al.* 2004).



Anexo Figura 1: Representación del cambio en forma y tamaño entre dos objetos geométricos, un cuadrado y un rectángulo. Se puede observar como el cambio en forma (*form*) es una combinación del cambio en "tamaño" (*size*) y "forma" (*shape*) (Richtsmeier *et al.* 2002).

La segunda etapa consta de la obtención de la forma (entendida en la jerga morfogeométrica como *shape*), para luego poder calcular la forma consenso o promedio de la muestra y evaluar las diferencias con respecto a ella (Rohlf y Slice 1990, Bookstein, 1996, Kendall 1977). Estas estandarizaciones se realizan por medio del análisis generalizado de Procrustes el cual minimiza las diferencias euclidianas bajo el criterio de mínimos cuadrados (Anexo Figura 2) (Dryden y Mardia 1998).



Anexo Figura 2: Representación del Análisis Generalizado de Procrustes en una de *A. vulgatissima* (ala). Digitalización mediante la posición de *landmarks* (cuadrados) en dos hojas de distintos tamaños. (A) Escalado a un mismo tamaño (*centroid size*= 1). (B) Traslación a un mismo origen (x_0, y_0). (C) Rotación minimizando las distancias de Procrustes entre coordenadas de *Landmarks*.

Cabe destacar que antes de realizar dicho análisis, de manera iterativa los *semilandmarks* son deslizados de derecha a izquierda a lo largo del contorno utilizando el algoritmo que minimiza la energía de curvatura (cambio en forma) y el promedio del *Procrustes* para todos los individuos. Finalmente, las coordenadas alineadas de *Procrustes* se utilizan como nuevas variables de forma en los subsecuentes análisis dentro del programa computacional MorphoJ (Klingenberg 2015).

Por último y dependiendo de la pregunta científica que se quiera resolver, se realizan los análisis estadísticos pertinentes, tales como análisis de componentes principales (APC), análisis de variables canónicas (AVC) y análisis para la puesta a prueba de la hipótesis como ANOVA, MANOVA, regresiones y pruebas no paramétricas (Zelditch *et al.* 2004, Slice 2007). A través de estos análisis pueden evaluarse las diferencias entre formas promedio, probar el grado de correlación y covariación de la forma con el tamaño, la

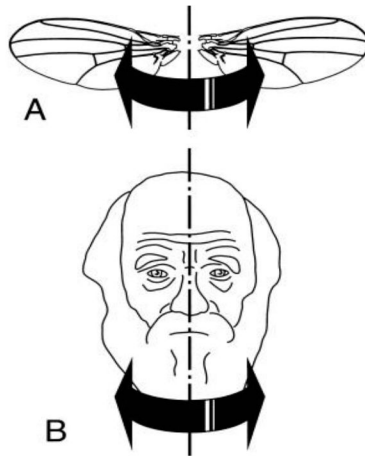
covariación de la forma con variables externas, el estudio de la asimetría, etc. En la actualidad existen diferentes programas para el estudio morfogeométrico en 2D, entre los más utilizados por la comunidad científica se encuentra la serie TPS (Rohlf 2008) y el MorphoJ (Klingenberg 2011).

Ajuste de Procrustes en estructura con *Object Symmetry*:

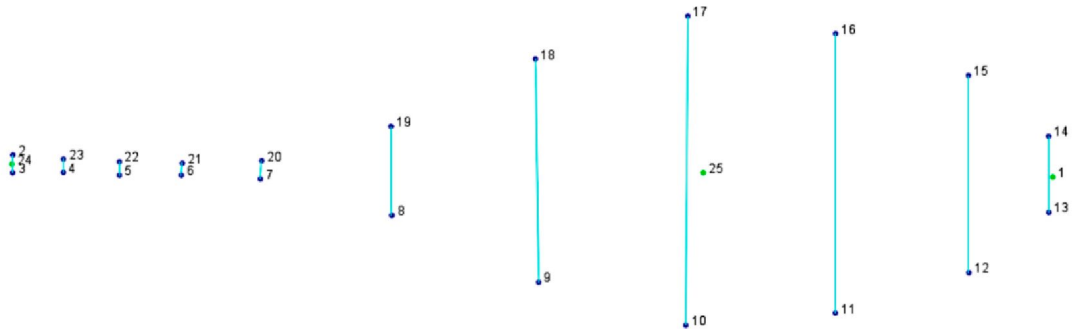
Una estructura bajo estudio puede presentar simetría en sí misma, es decir *Object Symmetry* (

Anexo Figura 3), como el caso de las hojas bajo estudio en esta tesis (

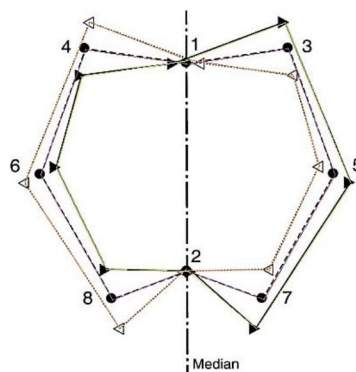
Anexo Figura 4). El ajuste de Procrustes en una configuración de este tipo implica en primera instancia reflejar las configuraciones de *landmarks* y *semilandmarks* del lado izquierdo hacia el derecho y viceversa. Luego se escala la configuración a *centroid size* y por último se superponen y rotan cada configuración (derecha e izquierda) hasta obtener el mejor ajuste por el método de mínimos cuadrados de modo que se obtiene una forma perfectamente simétrica (Anexo Figura 5: Análisis de variación de la forma en una estructura hipotética con *Object Symmetry*. Los landmarks 1 y 2 representan la línea media, los landmarks impares 5,6 y 7 (lado derecho) y los pares 4, 6 y 8 (lado izquierdo). En color verde se muestra la configuración original. En color naranja la configuración reflejada a cada uno de los lados (derecho hacia el izquierdo y viceversa). En color violeta se muestra la forma consenso, perfectamente simétrica.) (Klingenberg *et al.* 2002). Las diferencias en el componente asimétrico se evalúan entre pares de *landmarks*, es decir, por medio de las diferencias en pares de la configuración original y de espejo. Para evaluar la variación en el componente simétrico entre individuos se utilizan los *landmarks* de la línea media (o no pareados) y un solo miembro de cada par de la configuración consenso, los cuales pueden variar en cualquier dirección (Klingenberg *et al.* 2002).



Anexo Figura 3: (A) alas con *Matching symmetry*, (B) rostro humano con *Object symmetry* (tomado de Mardia *et al.* 2000).



Anexo Figura 4: Imagen de pares de *landmarks* en la hoja digitalizada de *Limonium brasiliense* con simetría de objeto (Morphol).



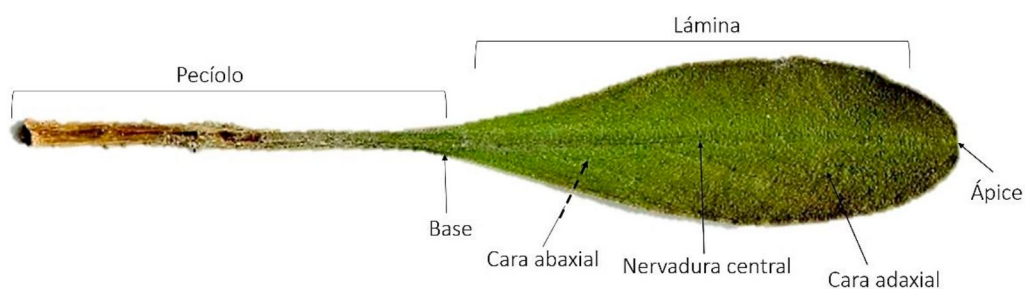
Anexo Figura 5: Análisis de variación de la forma en una estructura hipotética con *Object Symmetry*. Los landmarks 1 y 2 representan la línea media, los landmarks impares 5,6 y 7 (lado derecho) y los pares 4, 6 y 8 (lado izquierdo). En color verde se muestra la configuración original. En color naranja la configuración reflejada a cada uno de los lados (derecho hacia el izquierdo y viceversa). En color violeta se muestra la forma consenso, perfectamente simétrica.

La variación en el componente simétrico es calculada como las diferencias entre la configuración consenso de los individuos. Mientras que la variación en el componente

asimétrico se calcula como las diferencias entre la configuración consenso y la original. (Klingenberg *et al.* 2002).

Cuando se evalúa *Object Symmetry* cada objeto presenta $k \geq 1$ pares de puntos pareados $l \geq 0$ no apareados sobre el eje medio. De modo que $2k + l \geq 3$, $2k$ debido a que incluye simultáneamente a todos los *landmarks*, tanto del lado izquierdo como del derecho (Kent y Mardia 2001, Klingenberg *et al.* 2002). Luego del ajuste de Procrustes se pierden 2 grados de libertad, 1 grado de libertad debido a la corrección del tamaño y otro debido a la corrección de la traslación. De este modo, los grados de libertad para este análisis resultan en $2k+l-2$, tanto para el análisis del componente simétrico como del componente asimétrico (Kent y Mardia 2001). Debido a que los subespacios son complementarios y ortogonales para la configuración completa la dimensión de la variación resulta en $2(2k + l) - 4$ (Mardia *et al.* 2000). Por lo tanto, este tipo de ajuste aumenta el nivel de probabilidad o los grados de libertad comparándolo con un análisis de Procrustes de un objeto sin simetría.

Partes generales en una hoja:



Anexo Figura 5: Descripción de partes de la hoja.

Calculo del IBRv2:

El índice IBRv2 puede calcularse manualmente o mediante la aplicación de un software. Este índice combina un valor matemático con un resultado gráfico el cual conserva la respuesta específica de cada biomarcador investigado (Sanchez *et al.* 2013). Para calcular numéricamente el IBRv2 a partir de los biomarcadores seleccionados, primero se realiza la transformación logarítmica (\log) del valor de cada biomarcador en cada uno de los

tratamientos como: $Y_i = \log (X_i/X_0)$, donde X_i es el valor de cada biomarcador para cada uno de los tratamientos y X_0 es el valor de cada biomarcador correspondiente al tratamiento control. Luego se estandarizan los valores de cada biomarcador mediante la fórmula: $Z_i = (Y_i - M) / S$, donde M y S se refieren a la media general y la desviación estándar de cada biomarcador en todos los tratamientos, incluido el control, respectivamente. Luego se calcula la desviación estándar (A_i) para cada biomarcador en cada tratamiento como: $A_i = Z_i - Z_0$, donde Z_0 hace referencia al valor normalizado del grupo control. Por último, el cálculo del índice se expresa como: $IBRv2 = \sum |A_i|$, donde $|A_i|$ representa el valor absoluto de cada A_i (Sanchez *et al.* 2013).



Bibliografía I

- Adam P (1993) Saltmarsh Ecology. Cambridge University Press, UK. pp 461.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice D (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71(1):5-16.
- Aggarwal A, Sharma I, Tripathi BN, Munjal AK, Baunthiyal M, Sharma V (2012) Metal toxicity and photosynthesis. In: Guruprasad KN, Prasanna M, Shigeru I (Eds) *Photosynthesis: Overviews on recent progress and future perspectives*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, India. pp 229-236.
- Aguilar Ruiz J, Bouza PJ, Dorronsoro C, Fernández E, Fernández J, García I, Simón M (2003) Contaminación de los suelos afectados por el vertido de Aznalcóllar y su evolución en el tiempo (1998-2001). *Edafología* 10 (1):65-73.
- Alam MR, Islam R, Tran TKA, Le Van D, Rahman MM, Griffin AS, MacFarlane GR (2021) Global patterns of accumulation and partitioning of metals in halophytic saltmarsh taxa: A phylogenetic comparative approach. *J. Hazard. Mater.* 414:125515.
- Alam MR, Rahman MM, Yu RMK, MacFarlane GR (2023) Offspring of metal contaminated saltmarsh (*Juncus acutus*) exhibit tolerance to the essential metal Zn but not the nonessential metal Pb. *Environ. Pollut.* 323:121333.
- Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91(7):869-881.
- Anderson JM, Park YI, Chow, WS (1997) Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.* 100(2):214-223.
- Andrejić G, Gajić G, Prica M, Dželetović Ž, Rakić T (2018) Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll a fluorescence in Zn-stressed *Miscanthus × giganteus* plants. *Photosynthetica* 56(4):1249-1258.
- Anjum NA, Ahmad I, Valega M, Mohmood I, Gill SS, Tuteja N, Pereira E (2014) Salt marsh halophyte services to metal–metalloid remediation: assessment of the processes and underlying mechanisms. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44(18):2038-2106.
- Appalasamy M, Varghese B, Ismail R (2017) Responses of *Trichilia dregeana* leaves to sulphur dioxide pollution: A comparison of morphological, physiological and biochemical biomarkers. *Atmos. Pollut. Res.* 8(4):729-740.
- Arif N, Yadav V, Singh S, Kushwaha BK, Singh S, Tripathi DK, Chauhan DK (2016) Assessment of antioxidant potential of plants in response to heavy metals. In: Singh A, Prasad S, Singh R (Eds) *Plant Responses to xenobiotics*. Springer, Singapore. pp 97-125.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82(10):1227-1238.
- Asati A, Pichhode M, Nikhil K (2016) Effect of heavy metals on plants: an overview. *Int. J. Innov. Manag.* 5(3):56-66.
- Ashraf S, Ali Q, Zahir ZA, Ashraf S, Asghar HN (2019) Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174:714-727.

- Ashraf U, Hussain S, Anjum SA, Abbas F, Tanveer M, Noor MA, Tang X (2017) Alterations in growth, oxidative damage, and metal uptake of five aromatic rice cultivars under lead toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 115:461-471.
- ATSDR (2022) Priority list of hazardous substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service, United States Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia.
- Awa SH, Hadibarlat T (2020) Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. *Water Air Soil Pollut.* 231(2):47.
- Azcón-Bieto J, Talón M (2000) Fundamentos de la Fisiología Vegetal. En: Sánchez-Díaz M and Aguirreolea J (Eds) El agua en la planta. Mc Graw McGraw-Hill, Madrid, España: Ediciones Universidad de Barcelona. pp 17-30.
- Aziz I, Mujeeb A (2022) Halophytes for phytoremediation of hazardous metal (loid) s: A terse review on metal tolerance, bio-indication and hyperaccumulation. *J. Hazard. Mat.* 424:127309.
- Azubuikwe CC, Chikere CB, Okpokwasili GC (2016) Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:1-18.
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—A Review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Baker AJ, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC (2020) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Banuelos GS (Eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water* (1st Ed.). CRC Press, London. pp 85-107.
- Balafrej H, Bogusz D, Triqui ZEA, Guedira A, Bendaou N, Smouni A, Fahr M (2020) Zinc hyperaccumulation in plants: A review. *Plants* 9(5):562.
- Bankaji I, Pérez-Clemente RM, Caçador I, Sleimi N (2019) Accumulation potential of *Atriplex halimus* to zinc and lead combined with NaCl: Effects on physiological parameters and antioxidant enzymes activities. *S. Afr. J. Bot.* 123:51-61.
- Barbier EB, Hacker SD, Kennedy C, Koch EW, Stier AC y Silliman BR (2011) The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monogr.* 81(2):169-193.
- Barceló J, Poschenrieder C (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13:1–37.
- Beliaeff B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6):1316-1322.
- Benavides-Mendoza A, Francisco-Francisco N (2023) Recientes aplicaciones de la fluorescencia de la clorofila en los cultivos vegetales. *Epistemus (Sonora)* 16(33):106-114.
- Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M (1974) Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer, HU (Ed.) *Methods in Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. pp 425-556.

- Bernardini A, Salvatori E, Guerrini V, Fusaro L, Canepari S, Manes F (2016) Effects of high Zn and Pb concentrations on *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel: Photosynthetic performance and metal accumulation capacity under controlled conditions. *International J. Phytorem.* 18(1):16-24.
- Bertiller MB, Beeskow AM, Blanco PD, Idaszkin YL, Pazos GE, Hardtke L (2017) Vegetation of Península Valdés: priority sites for conservation. In: Bouza P, Bilmes A. (Eds) Late Cenozoic of Península Valdés, Patagonia, Argentina: An interdisciplinary approach. Springer Earth System Sciences. Springer, Cham, Suiza. pp 131-159.
- Bharti R, Sharma R (2022) Effect of heavy metals: An overview. *Materials Today: Proceedings* 51:880-885.
- Bhatla SC, A Lal M, Kathpalia R, Bhatla SC (2018) Plant mineral nutrition. In: Bhatla SC, Lal MA (Eds) *Plant physiology, development and metabolism* (2nd Ed.). Springer, Singapore. pp 37-81.
- Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, Mello JC (2017) Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *J. Ethnopharmacol.* 198:313-323.
- Blaylock MJ (2020) Field demonstrations of phytoremediation of lead-contaminated soils. In: Terry N, Banuelas GS (Eds.) *Phytoremediation of contaminated soil and water* (1st Ed.). CRC Press, London. pp 1-12.
- Bonanno G, Vymazal J, Cirelli GL (2018) Translocation, accumulation and bioindication of trace elements in wetland plants. *Sci. Total Environ.* 631:252-261.
- Bonnet M, Camares O, Veisseire P (2000) Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J. Exp. Bot.* 51(346):945-953.
- Bortolus A, Schwindt E, Bouza PJ, Idaszkin YL (2009) A characterization of Patagonian salt marshes. *Wetlands* 29(2):772-780.
- Beeskow AM, Collantes M, Posse G, Faggi A (2015) Vegetación costera de Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego. In: Boraso de Zaixso AL, Zaixso HE (Eds) *La zona costera patagónica argentina. Comunidades biológicas y geológicas*. Editorial Universitaria de la Patagonia. Comodoro Rivadavia. pp 3-42
- Bookstein FL (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.
- Bookstein FL (1996) Size and shape spaces for landmark data in two dimension. *Stat. Sci.* 1:181-222.
- Bookstein FL (1997) Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Med. Image Anal.* 1(3):225-243.
- Botté S, Freije R, Marcovecchio J (2010) Distribution of several heavy metals in tidal flats sediments within bahía blanca estuary (Argentina). *Water Air Soil Pollut.* 210:371-388.
- Brignone NF, Denham SS, Pozner R (2016) Synopsis of the genus *Atriplex* (Amaranthaceae, Chenopodioideae) for South America. *Aust. Sys. Bot.* 29(5):324-357.

- Brignone NF, Pozner RE, Denham SS (2019) Origin and evolution of *Atriplex* (Amaranthaceae s.l.) in the Americas: unexpected insights from South American species. *Taxon* 68(5):1021-1036.
- Brunetti G, Soler-Rovira P, Farrag K, Senesi N (2009) Tolerance and accumulation of heavy metals by wild plant species grown in contaminated soils in Apulia region, Southern Italy. *Plant Soil* 318:285-298.
- Burke DJ, Weis JS, Weis P (2000) Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51(2):153-159.
- Cahoon DR, McKee KL, Morris JT (2021) How plants influence resilience of salt marsh and mangrove wetlands to sea-level rise. *Estuar. Coast.* 44(4):883-898.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Mattso MP (2007) Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222(1):122-128.
- Čalasan AŽ, Hammen S, Sukhorukov AP, McDonald JT, Brignone NF, Böhnert T, Kadereit G (2022) From continental Asia into the world: Global historical biogeography of the saltbush genus *Atriplex* (Chenopodieae, Chenopodioideae, Amaranthaceae). *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 54:125660.
- Caparrós PG, Ozturk M, Gul A, Batool TS, Pirasteh-Anosheh H, Unal BT, Altay V, Toderich KN (2022) Halophytes have potential as heavy metal phytoremediators: A comprehensive review. *Environ. Exp. Bot.* 193:104666.
- Castillo-González J, Ojeda-Barrios D, Hernández-Rodríguez A, González-Franco AC, Robles-Hernández L, López-Ochoa GR (2018) Zinc metalloenzymes in plants. *Interciencia* 43(4): 242-248.
- Cazenave J, Amé MV, Menone ML (2021) Biomarcadores de Contaminación. In: Carriquiriborde (cordinador) *Principios de ecotoxicología* (1ª Ed). Editorial de la Universidad de la Plata, Buenos Aires, Argentina. pp 291-308.
- Chang Kee J, Gonzales MJ, Ponce O, Ramírez L, León V, Torres A, Loayza-Muro R (2018) Accumulation of heavy metals in native Andean plants: potential tools for soil phytoremediation in Ancash (Peru). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:33957-33966.
- Chmura GL, Anisfeld SC, Cahoon DR, Lynch JC (2003) Global carbon sequestration in tidal, saline wetland soils. *Global Biogeochem. Cycles* 17(4):1111.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53(1):159-182.
- Convención de Ramsar (2012). Humedales de Península Valdés. Servicio de Información sobre Sitios Ramsar. <https://rsis.ramsar.org/es/rsis/2070?language=es>.
- Convención de Ramsar sobre los Humedales (2018) Perspectiva mundial sobre los humedales: estado de los humedales del mundo y sus servicios a las personas. Gland (Suiza), Secretaría de la Convención de Ramsar. www.ramsar.org

- Couto T, Duarte B, Caçador I, Baeta A, Marques JC (2013) Salt marsh plants carbon storage in a temperate Atlantic estuary illustrated by a stable isotopic analysis based approach. *Ecol. Indic.* 32:305-311.
- Costa MB, Tavares FV, Martinez CB, Colares IG, Martins CDMG (2018) Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 155:117-124.
- Davis RD, Beckett PHT, Wollan E (1978) Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. *Plant Soil* 49(2):395-408.
- Devi SR, Prasad MNV (2004) Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV (Ed.) *Heavy metal stress in plants* (1^a Ed.) Springer, Berlin, Heidelberg. pp 127–145.
- Dey SK, Dey J, Patra S, Pothal D (2007) Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 19:53-60.
- Di Baccio D, Tognetti R, Sebastiani L, Vitagliano C (2003) Responses of *Populus deltoids* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* 159(2):443-452.
- Dietz KJ, Baier M, Krämer U (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (Eds.) *Heavy metal stress in plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 73-97.
- Dryden I, Mardia K (1998) *Statistical shape analysis*. John Wiley y Sons. Chichester, UK.
- Duarte B, Goessling JW, Marques JC, Caçador I (2015) Ecophysiological constraints of *Aster tripolium* under extreme thermal events impacts: Merging biophysical, biochemical and genetic insights. *Plant Physiol. Biochem.* 97:217-228.
- Egendorf SP, Groffman P, Moore G, Cheng Z (2020) The limits of lead (Pb) phytoextraction and possibilities of phytostabilization in contaminated soil: a critical review. *Int. J. Phytorem.* 22(9): 916-930.
- El-Agri AM, Emam MA, Gaber HS, Hassan EA, Hamdy SM (2022) Integrated use of biomarkers to assess the impact of heavy metal pollution on *Solea aegyptiaca* fish in Lake Qarun. *Environ. Sci. Eur.* 34(1):74.
- Esteves JL, Gil MN y Vazquez N (2004) Situación ambiental de la Bahía San Antonio. IBPM (Instituto de Biología Marina y Pesquera). Serie Publicaciones 3:55-60.
- Farage PK, Blowers D, Long SP, Baker NR (2006) Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO₂ assimilation in leaves of two chilling-tolerant C₄ species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus* × *giganteus*. *Plant Cell Environ.* 29(4):720-728.
- Ferrat L, Pergent-Martini C, Roméo M (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquat. Toxicol.* 65:187-204.

- Fitzgerald EJ, Caffrey JM, Nesaratnam ST, McLoughlin P (2003) Copper and lead concentrations in salt marsh plants on the Suir Estuary, Ireland. *Environ. Poll.* 123(1):67-74.
- Flowers TJ, Galal HK, Bromham L (2010) Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct. Plant Biol.* 37(7):604-612.
- Fodor F (2002) Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Prasad MNV, Strzałka K (Eds.) *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants.* Springer Dordrecht, Netherlands. pp 149-177.
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146(3):359-388.
- Fritz MA, Rosa S, Sicard A (2018) Mechanisms underlying the environmentally induced plasticity of leaf morphology. *Front. Genet.* 9:478.
- Gancedo NC, Medeiros DCD, Milaneze-Gutierrez MA, de Mello JC (2018) Morpho-anatomical characters of *Limonium brasiliense* leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.* 28(5):513-519.
- García-Caparrós P, Ozturk M, Gul A, Batool TS, Pirasteh-Anosheh H, Unal BT, Toderich KN (2022) Halophytes have potential as heavy metal phytoremediators: A comprehensive review. *Environ. Exp. Bot.* 193:104666.
- Garg N, Singh S (2018) Arbuscular mycorrhiza *Rhizophagus irregularis* and silicon modulate growth, proline biosynthesis and yield in *Cajanus cajan* L. Millsp. (pigeonpea) genotypes under cadmium and zinc stress. *J. Plant Growth Regul.* 37:46–63.
- Gedan KB, Kirwan ML, Wolanski E, Barbie EB, Silliman BR (2011) The present and future role of coastal wetland vegetation in protecting shorelines: Answering recent challenges to the paradigm. *Climatic Change* 106:7-29.
- Ghafouri L, Daryabeigi-Zand A, Mohammadi M (2022) Phytoextraction potential of halophyte plants under industrial multi-metal contaminated sites. *Acta Ecol. Sin.* 42(2):49-56.
- Ghori NH, Ghori T, Hayat MQ, Imadi SR, Gul A, Altay V, Ozturk M (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16:1807-1828.
- Ghori Z, Iftikhar H, Bhatti MF, Sharma I, Kazi AG, Ahmad P (2016) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. In: Ahmad P (Ed.) *Plant metal interaction.* Elsevier, Singar, India. pp 385-409.
- Gibilisco PE, Lancelotti JL, Negrin VL, Idaszkin YL (2020) Composting of seaweed waste: Evaluation on the growth of *Sarcocornia perennis*. *J. Environ. Manage.* 274:111193.
- Gibilisco PE, Negrin VL, Idaszkin YL (2022) Assessing the use of two halophytes species and seaweed composting in Cu-pollution remediation strategies. *Mar. Pollut. Bull.* 176:113413.
- Gil MN, Harvey M y Esteves JL (1999) Heavy metals in intertidal surface sediments from the Patagonian Coast, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:52-58.

- Gil MN, Torres AI, Commendatore MG, Marinho C, Arias A, Giarratano E y Casas GN (2015) Nutritive and xenobiotic compounds in the alien algae *Undaria pinnatifida* from Argentine Patagonia. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 68(3):553-565.
- Gilby BL, Weinstein MP, Baker R, Cebrian J, Alford SB, Chelsky A, Ziegler SL (2021) Human actions alter tidal marsh seascapes and the provision of ecosystem services. Estuaries Coasts 44(6):1628-1636.
- Giuliani S, Bellucci LG (2019) Salt marshes: their role in our society and threats posed to their existence. In: Sheppard C (Ed.) World seas: An environmental evaluation (2nd Ed.). Academic Press, United Kingdom. pp 79-101.
- Giupponi L (2020) Intraspecific variation in functional strategy and leaf shape of *Campanula elatinoidea* reveals adaptation to climate. Flora 268:151605.
- Gjorgieva Ackova D (2018) Heavy metals and their general toxicity on plants. Plant Sci. Today 5(1):15-19.
- Gratani L (2014) Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. Advances in botany. 2014:208747.
- Greenberg R, Cardoni A, Ens BJ, Gan X, Isacch JP, Koffijberg K, Loyn R. (2014) The distribution and conservation of birds of coastal salt marshes. In: Maslo B, Lockwood JL (Eds.) Coastal conservation. University Press, Cambridge. pp 180-242.
- Greger M (2004) Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Prasad MNV (Ed.) Heavy Metal Stress in Plants from Biomolecules to Ecosystems (2nd Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp 1-27.
- Gul B, Ansari R, Flowers TJ, Khan MA (2013) Germination strategies of halophyte seeds under salinity. Environ. Exp. Bot. 92: 4-18.
- Gunz P, Mitteroecker P, Bookstein FL (2005) Semilandmarks in three dimensions. In: Slice DE (Ed.) Modern morphometrics in physical anthropology. Springer, Boston. pp 73-98.
- Gupta DK, Huang HG, Corpas FJ (2013) Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. Environ. Sci. Poll. Res. 20:2150-2161.
- Hamed KB, Ellouzi H, Talbi OZ, Hessini K, Slama I, Ghnaya T, Abdelly C (2013) Physiological response of halophytes to multiple stresses. Funct. Plant Biol. 40(9):883-896.
- Hampel M, Blasco J, Díaz MM (2016) Biomarkers and effects. In: Blasco J, Chapman PM, Campana O, Hampel M (Eds.) Marine Ecotoxicology. Academic Press, United Kingdom. pp 121-165.
- Han YL, Huang SZ, Gu JG, Qiu S, Che JM (2008) Tolerance and accumulation of lead by species of *Iris* L. Ecotoxicology 17:853-859.
- Hasnaoui SE, Fahr M, Keller C, Levard C, Angeletti B, Chaurand P, Smouni A (2020) Screening of native plants growing on a Pb/Zn mining area in eastern Morocco: Perspectives for phytoremediation. Plants 9(11):1458.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125(1):189-198.

- Hirve M, Jain M, Rastogi A, Kataria S (2020) Heavy metals, water deficit, and their interaction in plants: an overview.. In: Tipathi DK, Chauhan DK, Prasad SM, Ramawat N, Singh VP, Sharma S, Dubey NK (Eds) Plant life under changing environment. Academic Press, United Kindom. pp 175-206.
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) Growing plants without soil by the water-culture method.
- Hung G, Chmura G (2007) Metal accumulation in surface salt marsh sediments of the Bay of Fundy, Canada. *Estuaries Coasts* 30(4):725-734.
- Huang S, Yuan C, Li Q, Yang Y, Tang C, Ouyang K, Wang B (2017) Distribution and risk assesment of heavy metals in soils from a typical Pb-Zn mining area. *Pol. J. Environ. Stud.* 26(3):1105-1112.
- Huang XH, Zhu F, Yan WD, Chen XY, Wang GJ, Wang RJ (2019) Effects of Pb and Zn toxicity on chlorophyll fluorescence and biomass production of *Koeleria paniculata* and *Zelkova schneideriana* young plants. *Photosynthetica* 57(2):688-697.
- Huxham M, Whitlock D., Githaiga M, Dencer-Brown A (2018) Carbon in the coastal seascape: how interactions between mangrove forests, seagrass meadows and tidal marshes influence carbon storage. *Curr. For. Rep.* 4(2):101-110.
- Idaszkin YL, Bortolus A (2011) Ecological processes shaping Central Patagonian salt marsh landscapes. *Plant Ecol.* 212:553-561.
- Idaszkin YL, Bouza PJ, Marinho CH, Gil MN (2014) Trace metal concentrations in *Spartina densiflora* and associated soil from a Patagonian salt marsh. *Mar. Pollut. Bull.* 89 (1–2):444–450.
- Idaszkin YL, Pollicelli MP, Bouza PJ, Gil MN (2015) Metales traza en sedimentos de marismas colonizados por *Spartina* sp. (Póster). VIII Jornadas de Ciencias del Mar.
- Idaszkin YL, Lancelotti JL, Bouza PJ y Marcovecchi JE (2015) Accumulation and distribution of trace metals within soils and the austral cordgrass *Spartina densiflora* in a Patagonian salt marsh. *Mar. Pollut. Bull.* 101(1):457-465.
- Idaszkin YL, Lancelotti JL, Pollicelli MP, Marcovecchio JE, Bouza PJ (2017) Comparison of phytoremediation potential capacity of *Spartina densiflora* and *Sarcocornia perennis* for metal polluted soils. *Mar. Pollut. Bull.* 118(1-2):297-306.
- Idaszkin YL, Márquez F, Mateos-Naranjo E, Pollicelli MP, Cisneros HS (2019) Multidimensional approach to evaluate *Limonium brasiliense* as source of early biomarkers for lead pollution monitoring under different saline conditions. *Ecol. Indic.* 104:567-575.
- Idaszkin YL, Carol ES, Barcia-Piedras JM, Bouza PJ, Mateos-Naranjo E (2020) Trace metal concentrations in soil-plant complex in rocky shore salt marshes of Central Patagonia. *Cont. Shelf Res.* 211:104280.
- Idaszkin YL, Pollicelli MP, Márquez F (2023) Assessment of halophyte plant phenotypic responses under heavy metals pollution. Implications for monitoring and phytoremediation. *Environ. Pollut.* 331:121916

- Iqbal N, Nazir N, Nauman M, Hayat MT (2020) Agronomic crop responses and tolerance to metals/metalloids toxicity. In: Hasanuzzaman M (Eds.) Agronomic crops: stress responses and tolerance. Agronomic Crops. Springer, Singapore. pp 3191-208.
- Ivanov YV, Savochkin YV, Kuznetsov VV (2012) Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 2. Functioning of antioxidant enzymes in pine seedlings under chronic zinc action. Russ. J. Plant Physiol. 59:50-58.
- Jiang K, Wu B, Wang C, Ran Q (2019) Ecotoxicological effects of metals with different concentrations and types on the morphological and physiological performance of wheat. Ecotoxicol. Environ. Saf. 167:345–353.
- Jin X, Shi C, Yu CY, Yamada T, Sacks EJ (2017) Determination of leaf water content by visible and near-infrared spectrometry and multivariate calibration in *Miscanthus*. Front. Plant Sci. 8:721.
- Jordan FL, Robin-Abbott M, Maier RM, Glenn EP (2002) A comparison of chelator-facilitated metal uptake by a halophyte and a glycophyte. Environ. Toxicol. Chem. 21(12):2698-2704.
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soils and plants. CRC press, USA.
- Krayem M, El Khatib S, Hassan Y, Deluchat V, Labrousse, P (2021) In search for potential biomarkers of copper stress in aquatic plants. Aquat. Toxicol. 239:105952.
- Kachout SS, Leclerc JC, Mansoura AB, Rejeb MN, Ouerghi Z (2009) Effects of heavy metals on growth and bioaccumulation of the annual halophytes *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. J. App. Sci. Res. 5(7):746-756.
- Kachout SS, Mansoura AB, Leclerc JC, Mechergui R, Rejeb MN, Ouerghi Z (2010) Effects of heavy metals on antioxidant activities of: *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. Elec. J. Env. Agricult. Food Chem. 9(3).
- Kachout SS, Mansoura AB, Mechergui R, Leclerc JC, Rejeb MN, Ouerghi Z (2012) Accumulation of Cu, Pb, Ni and Zn in the halophyte plant *Atriplex* grown on polluted soil. J. Sci. Food Agric. 92(2):336-342.
- Kadim MK, Risjani Y (2022) Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. Emerg. Contam. 8:195-205.
- Kadukova J, Kalogerakis N (2007) Lead accumulation from non-saline and saline environment by *Tamarix smyrnensis* Bunge. Eur. J. Soil Biol. 43(4):216-223.
- Kanwal S, Bano A, Malik RN (2016) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals and effects on growth and biochemical activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants in Zn contaminated soils. Afr. J. Biotechnol. 15(20):872–883.
- Karakas S, Dikilitas M, Tıprıdamaz R (2020) Phytoremediation of salt-affected soils using halophytes. In: Grigore MN (Eds.) Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems towards Biosaline Agriculture. Springer, Cham, Suiza. pp 1-18.
- Kaur G, Kaur S, Singh HP, BatishDR, Kohli RK, Rishi V (2015a) Biochemical adaptations in *Zea mays* roots to short-term Pb 2+ exposure: ROS generation and metabolism. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 95:246-253.

- Kaur G, Singh HP, Batish DR, Kohli, RK (2015b) Adaptations to oxidative stress in *Zea mays* roots under short-term Pb²⁺ exposure. *Biologia* 70:190-197.
- Kaur H, Garg N (2021) Zinc toxicity in plants: A review. *Planta* 253(6):129
- Kent JT y Mardia KV (2001) Shape, Procrustes tangent projections and bilateral symmetry. *Biometrika* 88:469-485.
- Kendall DG, Barden D, Carne TK, Le H (2009) Shape and shape theory. John Wiley and Sons, Singapore.
- Khalid S, Shahid M, Niazi NK, Murtaza B, Bibi I, Dumat C (2017) A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J. Geochem. Explor.* 182:247-268
- Khodaverdiloo H, Hamzenejad Taghliabad R (2014) Phytoavailability and potential transfer of Pb from a salt-affected soil to *Atriplex verucifera*, *Salicornia europaea* and *Chenopodium album*. *Chem. Ecol.* 30(3):216-226.
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molec. Ecol. Resour.* 11(2):353-357.
- Klingenberg CP (2008) MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University Manchester, United Kingdom.
- Klingenberg CP, McIntyre G (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52(5):1363-1375.
- Klingenberg CP (2015) Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 7(2):843-934.
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A (2002) Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909-1920.
- Klisarić NB, Miljković D, Avramov S, Živković U, Tarasjev A (2014) Fluctuating asymmetry in *Robinia pseudoacacia* leaves possible in situ biomarker. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(22):12928-12940.
- Krämer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:517-534.
- Křibek B, Nyambe I, Majer V, Knésl I, Mihaljevič M, VSracek O (2019) Soil contamination near the Kabwe Pb-Zn smelter in Zambia: Environmental impacts and remediation measures proposal. *J. Geochem. Explor.* 197:159-173.
- Kumar Yadav K, Gupta N, Kumar A, Reece LM, Singh N, Rezaia S, Ahmad Khan S (2018) Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. *Ecol. Eng.* 120:274–298.
- Kumari A, Sheokand S, Kumar A, Mann A, Kumar N, Devi S, Meena, BL (2019) Halophyte growth and physiology under metal toxicity. In: Hasanuzzaman M, Nahar K, Öztürk M (Eds. *Ecophysiology, abiotic stress responses and utilization of halophytes*. Springer, Singapore. pp 83-113.

- Kumar A, Kumar A, MMS CP, Chaturvedi AK, Shabnam AA, Subrahmanyam G, Yadav KK (2020) Lead toxicity: health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17(7):2179.
- Kumar M, Borah P, Devi P (2020) Priority and emerging pollutants in water. In: Devi P, Kansal SK, Singh P (Eds.) *Inorganic pollutants in water*. Elsevier, Amsterdam. pp. 33-49.
- Kupper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PM (2004) Tissue-and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol.* 134(2):748-757.
- Lam PK, Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46(2):182-186.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (2008) Photosynthesis. In: *Plant physiological ecology* (2nd Ed.). Springer, New York. 2:11-99.
- Latif A, Abbas A, Iqbal J, Azeem M, Asghar W, Ullah R, Chen Z. (2023) Remediation of environmental contaminants through phytotechnology. *Water Air Soil Pollut.* 234(3):139.
- Leung KL (2022) The use of multiple biomarkers in marine pollution monitoring: a case study in Victoria Harbour, Hong Kong. pp 1-60
- Liang L, Liu W, Sun Y, Huo X, Li S, Zhou Q (2017)a. Phytoremediation of heavy metal contaminated saline soils using halophytes: current progress and future perspectives. *Environ. Rev.* 25(3):269-281.
- Liang S, Jin Y, Liu W, Li X, Shen S, Ding L (2017)b. Feasibility of Pb phytoextraction using nano-materials assisted ryegrass: results of a one-year field-scale experiment. *J Environ. Manage.* 90:170-175.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME (2019) Pollution biomarkers in environmental and human biomonitoring. *Open Biomark. J.* 9:1-9.
- Löhmus K, Balke T, Kleyer M (2020) Spatial and temporal patterns of initial plant establishment in salt marsh communities. *J. Veg. Sci.* 31(6):1122-1132.
- Lomartire S, Marques JC, Gonçalves AM (2021) Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecol. Indic.* 122:107207
- Lombardi T, Bertacchi A, Pistelli L, Pardossi A, Pecchia S, Toffanin A, Sanmartin C (2022) Biological and agronomic traits of the main halophytes widespread in the Mediterranean region as potential new vegetable crops. *Horticulturae* 8(3):195.
- Lotmani B, Fatarna L, Berkani A, Rabier J, Prudent P, Laffont-Schwob I (2011) Selection of Algerian populations of the Mediterranean saltbush, *Atriplex halimus*, tolerant to high concentrations of lead, zinc and copper for phytostabilization of heavy metal-contaminated soils. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 5:20-26.
- Luo ZB, He XJ, Chen L, Tang L, Gao S, Chen (2010) Effects of zinc on growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedlings. *Int. J. Agric. Biol.* 12(1):119-24.

- Lutts S, Lefèvre I (2015) How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? *Ann. Bot.* 115(3):509-528.
- Ma D, He Z, Bai X, Wang W, Zhao P, Lin P, Zhou H (2022) *Atriplex canescens*, a valuable plant in soil rehabilitation and forage production. A review. *Sci.Total Environ.* 804:150287.
- Mardia KV, Bookstein FL y Moreton IJ (2000) Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika.* pp 285:300.
- Magara G, Varello K, Pastorino P, Francese DR, Arsieni P, Pezzolato M, Bozzetta E (2022) Multi-level system to assess toxicity in water distribution plants. *Int. J. Environ. Res. Public Helth.* 19(14):8469
- Małkowski E, Sitko K, Zieleźnik-Rusinowska P, Gieroń Ź, Szopiński M (2019) Heavy metal toxicity: Physiological implications of metal toxicity in plants. In: Sablok G (ed.) *Plant metallomics and functional omics.* Springer, Cham, Suiza. pp 253-301.
- Manousaki E, Kalogerakis N (2009) Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 844-854.
- Manousaki E, Galanaki K, Papadimitriou L, Kalogerakis N (2014) Metal phytoremediation by the halophyte *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss: Two contrasting ecotypes. *Int. J. Phytoremediat.* 16(7-8):755-769.
- Maresca V, Fusaro L, Sorbo S, Siciliano A, Loppi S, Paoli L, Basile A (2018) Functional and structural biomarkers to monitor heavy metal pollution of one of the most contaminated freshwater sites in Southern Europe. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163:665-673
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47(3):469-474.
- Martínez-Sánchez MJ, García-Lorenzo ML, Pérez-Sirvent C, Bech J (2012) Trace element accumulation in plants from an aridic area affected by mining activities. *J. Geochem. Explor.* 123:8-12.
- Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L, Davy AJ (2013) Silicon alleviates deleterious effects of high salinity on the halophytic grass *Spartina densiflora*. *Plant Physiol. Biochem.* 63:115-121
- Mateos-Naranjo E, Castellanos EM, Perez-Martin A (2014) Zinc tolerance and accumulation in the halophytic species *Juncus acutus*. *Environ. Exp. Bot.* 100:114-121.
- Mateos-Naranjo E, Pérez-Romero JA, Redondo-Gómez S, Mesa-Marín J, Castellanos EM, Davy AJ (2018) Salinity alleviates zinc toxicity in the saltmarsh zinc-accumulator *Juncus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163:478-485.
- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Luque T, Figueroa ME (2008) Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Plant Biol.* 10(6):754-762.
- Maurya AK (2020) Oxidative stress in crop plants. In: Hasanuzzaman M. (Ed.) *Agronomic crops.* Springer, Singapore. pp 349-380.

- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51(345):659-668.
- McCarty LS, Munkittrick KR (1996) Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Human Ecol. Risk Assess. Int. J.* 2 (2):268–274.
- Mcowen CJ, Weatherdon LV, Van Bochove JW, Sullivan E, Blyth S, Zockler C, Fletcher S. (2017) A global map of saltmarshes. *Biodivers. Data J.* (5) 11764.
- Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran TB, Nainu F, Khusro A, Simal-Gandara J (2022) Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *J. King Saud Univ. Sci.* 34(3):101865
- Mitsch WJ, Gosselink JG (2015) *Wetlands* (1st Ed.). John Wiley and Sons, New Jersey.
- Mitsch WJ, Gosselink JG, Zhang L, Anderson CJ (2009) *Wetland ecosystems*. John Wiley and Sons, New Jersey.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9):405-410.
- Mocek-Płóćiniak A, Mencil J, Zakrzewski W, Roszkowski S (2023) Phytoremediation as an effective remedy for removing trace elements from ecosystems. *Plants* 12(8):1653.
- Monnet F, Vaillant N, Vernay P, Coudret A, Sallanon H, Hitmi A (2001) Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J. Plant Physiol.* 158(9):1137-1144.
- Monteiro L (1999) Multivariate regression models and geometric morphometrics: The search for causal factors in the analysis of shape. *Syst. Biol.* 48(1):192-199.
- Morales M, Munné-Bosch S (2019) Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiol.* 180(3):1246-1250.
- Mosa KA, Saadoun I, Kumar K, Helmy M, Dhankher OP (2016) Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Front. Plant Sci.* 7:303.
- Mujeeb A, Aziz I, Ahmed MZ, Shafiq S, Fatima S, Alvi SK (2021) Spatial and seasonal metal variation, bioaccumulation and biomonitoring potential of halophytes from littoral zones of the Karachi Coast. *Sci. Total Environ.* 781:146715.
- Munne-Bosch S, Pinto-Marijuan M (2016) Free radicals, oxidative stress and antioxidants. *Encycl. Appl. Plant Sci.* 2:16-19.
- Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC (2004) Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (boiss.) Kuntze. *Z. Naturforschung C.* 59(7-8):477-480.
- Muro-González DA, Mussali-Galante P, Valencia-Cuevas, Flores-Trujillo K, Tovar-Sánchez E (2020) Morphological, physiological, and genotoxic effects of heavy metal bioaccumulation in *Prosopis laevigata* reveal its potential for phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27:40187-40204.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8:199-216.

- Negrin VL, Gironés L, Serra AV (2020) Eco-friendly Strategies of Remediation in the Marine System. In: Botte SE, Arias HA (Eds.) Coastal and deep ocean pollution (1st Ed.). CRC Press, London. pp 184-214.
- Nicotra AB, Leigh A, Boyce CK, Jones CS, Niklas KJ, Royer DL, Tsukaya H (2011) The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Funct. Plant Biol.* 38(7):535-552.
- Nikalje GC, Saini N, Suprasanna P (2019 a). Halophytes and heavy metals: Interesting partnerships. In: Srivastava S, Srivastava A, Suprasanna P (Eds.) Plant-metal interactions. Springer, Cham, Suiza. pp 99-118.
- Nikalje GC, Bhaskar SD, Yadav K, Penna S (2019 b). Halophytes: Prospective plants for future. In: Hasanuzzaman M, Nahar K, Öztürk M (Eds.) Ecophysiology, abiotic stress responses and utilization of halophytes. Springer, Singapore. pp 221-234
- Nikalje GC, Yadav K, Penna S (2019 c) Halophyte responses and tolerance to abiotic stresses. In: Hasanuzzaman M, Nahar K, Öztürk M. (Eds.) Ecophysiology, abiotic stress responses and utilization of halophytes. Springer, Singapore. pp 1-23.
- Nouet C, Motte P, Hanikenne M (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* 16(7):395-404.
- Noulas C, Tziouvalekas M, Karyotis T (2018) Zinc in soils, water and food crops. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49:252-260.
- Oladoye PO, Olowe OM, Asemoloye MD (2022) Phytoremediation technology and food security impacts of heavy metal contaminated soils: A review of literature. *Chemosphere* 88:132555.
- Ouni Y, Mateos-Naranjo E, Abdelly C, Lakhdar A (2016) Interactive effect of salinity and zinc stress on growth and photosynthetic responses of the perennial grass, *Polypogon monspeliensis*. *Ecol. Eng.* 95:171-179.
- Oyarzun R, Higuera P, Lillo J (2011) Una introducción a los impactos y su remedación. In: Oyarzun R, Cubas P (Eds.) Minería Ambiental. Ediciones GEMM.
- Påhlsson AMB (1989) Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants: a literature review. *Water Air Soil Pollut.* 47:287-319.
- Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5(5):333-340.
- Pandey VC, Bajpai O (2019) Phytoremediation: from theory toward practice. In: Pandey VC, Baudh K (Eds.) Phytomanagement of polluted sites. Elsevier, India. pp 1-49.
- Pandey VC, Souza-Alonso P (2019) Market opportunities: in sustainable phytoremediation. In: Pandey VC, Baudh K (Eds.) Phytomanagement of polluted sites. Elsevier, India. pp 51-82.
- Peng G, Lan W, Pan K (2022) Mechanisms of metal tolerance in halophytes: A mini review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 109(5):671-683.
- Pinheiro JC, Bates DM (2006) Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer science and business media. Springer, New York.

- Pirzadah TB, Malik B, Tahir I, Hakeem KR, Alharby HF, Rehman RU (2020) Lead toxicity alters the antioxidant defense machinery and modulate the biomarkers in Tartary buckwheat plants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 151:104992
- Pollicelli MP, Idaszkin YL, Gonzalez-José R, Márquez F (2018) Leaf shape variation as a potential biomarker of soil pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164:69-74.
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews Env. Contamination T.* 213:113-136.
- Prasad KVSK, Saradhi PP, Sharmila P (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot.* 42(1):1-10.
- Primost MA, Gil MN, Bigatti G (2017) High bioaccumulation of cadmium and other metals in Patagonian edible gastropods. *Mar. Biol. Res.* 13(7):774-781.
- Rahman MM, Mostofa MG, Keya SS, Siddiqui MN, Ansary MMU, Das AK, Rahman MA, Tran L.S.-P (2021) Adaptive mechanisms of halophytes and their potential in improving salinity tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22:10733.
- Rai R, Agrawal M, Agrawal SB (2016) Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. In: Singh A, Prasad S, Singh R (Eds.) *Plant responses to xenobiotics*. Springer, Singapore. pp 127-140.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180(2):169-181.
- Rastgoo L, Alemzadeh A (2011) Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Aust. J Crop Sci.* 5(4):375-383.
- Rastgoo L, Alemzadeh A, Tale AM, Tazangi SE, Eslamzadeh T (2014) Effects of copper, nickel and zinc on biochemical parameters and metal accumulation in Gouan, '*Aeluropus littoralis*'. *Plant Knowl. J.* 3(1):42-49.
- Raza A, Khan AHA, Nawaz I, Qu Z, Yousaf S, Ali MA, Sayal AU, Iqbal M (2019) Evaluation of arsenic-induced stress in *Dahlia pinnata* Cav.: morphological and physiological response. *Soil Sediment. Contam.* 28:716-728.
- Reboreda R, Caçador I (2007) Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environ. Pollut.* 146(1):147-154.
- Reeves RD, Baker AJ, Jaffré T, Erskine PD, Echevarria G, van Der Ent A (2018) A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytol.* 218(2):407-411.
- Resende, AC, Pereira DMC, Resende MAC (2022) Package 'IBRtools'.
- Roe RA, Yu RMK, Rahman MM, MacFarlane GR (2021) Towards adverse outcome pathways for metals in saltmarsh ecosystems—A review. *J. Hazard. Mat.* 416:126252.
- Roe RA, MacFarlane GR (2022) The potential of saltmarsh halophytes for phytoremediation of metals and persistent organic pollutants: An Australian perspective. *Mar. Pollut. Bull.* 180:113811.

- Rohlf FJ, Archie J (1984) A comparison of Fourier methods for description of wing shape in mosquitos (Diptera: Culicidae). *Syst. Zool.* 33(3):302-317.
- Rohlf FJ (1999) Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *J. Classif.* 16(2):197-223.
- Rohlf FJ (2017a) TPSDig2, Version 2.3. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.
- Rohlf FJ (2017b) TPSUtil, Version 1.74. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.
- Rohlf FJ (2017c) TPSRelw v.1.67. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.
- Rohlf FJ (2008) TpsDig Version 2.12. Department of Ecology and Evolution. New York, USA: Suny at Stony Brook.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Manual de minería. (2000) Estudios mineros de Peru S.A.C.
- Saddhe AA, Manuka R, Nikalje GC, Penna S (2020) Halophytes as a potential resource for phytodesalination. In: Grigore MN (Eds.) *Handbook of halophytes. From molecules to ecosystems towards biosaline agriculture.* Springer, Cham, Suiza. pp 1-21.
- Santa Ana C (2004) Los derechos de uso territorial (DUTs) como alternativa para el manejo sustentable de recursos pesqueros: El caso de la comunidad de recolectores de la costa de El Riacho (Golfo San José, Argentina). Seminario de Licenciatura. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn.
- Sagardoy R, Morales F, López-Millán AF, Abadía A, Abadía J (2009) Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biol.* 11(3):339-350.
- Sagardoy R, Vázquez S, Florez-Sarasa ID, Albacete A, Ribas-Carbó M, Flexas J, Morales F (2010) Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New Phytol.* 187(1):145-158.
- Samiei L, Pahnehkolayi MD, Karimian Z, Nabati J (2020) Morpho-physiological responses of halophyte *Climacoptera crassa* to salinity and heavy metal stresses in in vitro condition. *S. Afr. J. Bot.* 131:468-474.
- Sánchez O (2007) Ecosistemas acuáticos: diversidad, procesos, problemática y conservación. In: Sánchez O, Herig M, Peters E, Márquez R, Zambrano L (Eds.) *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México.* pp 11-34.
- Sanchez W, Burgeot T, Porcher JM (2013) A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20:2721-2725.
- Sandeep G, Vijayalatha KR, Anitha T (2019) Heavy metals and its impact in vegetable crops. *Int. J Chem. Stud.* 7(1):1612-1621.

- Sarika M, Zikos A (2021) Coastal salt marshes: Structure and function of plant communities. In: Grigore MN (Ed) Handbook of Halophytes: From molecules to ecosystems towards biosaline agriculture. Springer, Cham, Suiza. pp 199-237.
- Scoffoni C, Rawls M, McKown A, Cochard H, Sack L (2011) Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiol.* 156(2):832-843.
- Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:35-52.
- Shen X, Dai M, Yang J, Sun L, Tan X, Peng C, Naz I (2022) A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere* 291:132979.
- Sheoran V, Sheoran A, Poonia P (2011) Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41:168–214.
- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P (2016) Factors affecting phytoextraction: a review. *Pedosphere* 26(2):148-166.
- Si W, He X, Li A, Liu L, Li J, Gong D, Zhang X (2016) Application of an integrated biomarker response index to assess ground water contamination in the vicinity of a rare earth mine tailings site. *Env. Sci. Pollut. Res.* 23:17345-17356.
- Sidhu MK, Raturi HC, Kachwaya DS, Sharma A (2019) Role of micronutrients in vegetable production: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 8(1S):332-340.
- Siedlecka A (1995) Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64(3):265-272.
- Siingh MP (2021) An analysis of advantages, limitations and prospects of bioremediation techniques. *AJRSSH.* 11(11):378-383.
- Sindelar A. (1987) Problemas del comercio e ciertos productos obtenidos de la explotación de recursos naturales. Estudio sobre el plomo y sus manufacturas. Organización mundial del comercio Acuerdo general de Aranceles Aduaneros.
- Singh VK, Singh R, Rajput VD, Singh VK (2023) Halophytes for the sustainable remediation of heavy metal-contaminated sites: Recent developments and future perspectives. *Chemosphere* 137524.
- Slice DE (2001) Landmark coordinates aligned by Procrustes analysis do not lie in Kendall's shape space. *Syst. Boil.* 50(1):141-149.
- Slice DE (2007) Geometric morphometrics. *Annu. Rev. Anthropol.* 36:261-281.
- Smith MC (2016) Heavy metal contamination increases fluctuating asymmetry in *Rhus glabra* l. (anacardiaceae). *SW Nat.* 61(2):156-159.
- Souri Z, Cardoso AA, da-Silva CJ, de Oliveira LM, Dari B, Sihi D, Karimi N (2019) Heavy metals and photosynthesis: Recent developments. *Photosynth. Prod. Environ. Stress.* 107-134.

- Sousa AI, Lillebø AI, Pardal MA, Caçador I (2010) The influence of *Spartina maritima* on carbon retention capacity in salt marshes from warm-temperate estuaries. *Marine Mar. Pollut. Bull.* 61(4-6):215-223.
- Stefani A, Arduini I, Onnis A (1991) *Juncus acutus*: germination and initial growth in presence of heavy metals. *Ann. Bot. Fenn.* 28:37-43.
- Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH (2005) Increase of glutathione in mine population of *Sedum alfredii*: a Zn hyperaccumulator and Pb accumulator. *Phytochemistry* 66(21):2549-2556.
- Syed K, Tiwari S, Sikka J, Panwar K (2008) Impact of air pollution on floral morphology and characteristics of *Cassia glauca* Lamk. In Indore (India). *J. Environ. Res. Dev.* 3(9):91-96.
- Tambussi EA, Graciano C (2010) La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante. In: Fernández ME, Gyenge J (Eds.) *Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos*. INTA. Buenos Aires. pp 129-140.
- Team RC (2023) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Teranishi Y, Tanaka A, Osumi M, Fukui S (1974) Catalase activities of hydrocarbon-utilizing *Candida yeasts*. *Agric. Biol. Chem.* 38(6):1213-1220.
- Thakur S, Singh L, Zularisam AW, Sakinah M, Din MFM (2017) Lead induced oxidative stress and alteration in the activities of antioxidative enzymes in rice shoots. *Biol. Plant.* 61:595-598.
- Tinker PB (1981) Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 294(1071):41-55.
- Tiryakioglu M, Eker S, Ozkutlu F, Husted S, Cakmak I (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20(3):181-189.
- Tsikis D (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* 524:13-30.
- Tsonev T, Cebola Lidon FJ (2012) Zinc in plants-an overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture (EJFA)*. 24(4)322-333.
- Tsukaya H (2005) Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *Int. J. Dev. Biol.* 49 (5-6):547-555.
- United States Environmental Protection Agency (1994). Method 200.7: Determination of metals and trace elements in water and wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (Revision 4.4). Cincinnati, OH: U.S. Government Printing Office.
- United States Environmental Protection Agency (1996) Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. In *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846)* (3rd ed.). Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

- Usman K, Abu-Dieye, MH, Zouari N, Al-Ghouti MA (2020) Lead (Pb) bioaccumulation and antioxidative responses in *Tetraena qataranse*. *Sci. Rep.* 10(1):17070.
- 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 der Ent A, Baker AJ, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362:319-334.
- Van Oosten MJ, Maggio A (2015) Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Environ. Exp. Bot.* 111:135-146.
- Vázquez NN, Gil MN, Esteves JL y Narvarte M (2007) Monitoring heavy metal pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79(2):121-125.
- Veličković MV (2010) Reduced developmental stability in *Tilia cordata* leaves: effects of disturbed environment. *Period. Biol.* 112(3):273-281.
- Verkleij JAC, Schat H (1990) Mechanisms of metal tolerance in plants. In: Shaw AJ (Ed.) Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects .CRC Press, USA. pp 179-93.
- Vujić V, Avramov S, Tarasjev A, Barišić KN, Živković U, Miljković D (2015)a. The effects of traffic-related air pollution on the flower morphology of *Iris pumila* comparison of a polluted city area and the unpolluted deliblato sands (nature reserve). *App. Ecol. Environ. Res.* 13(2):405-415.
- Vujić V, Rubinjoni L, Selaković S, Cvetković D (2015)b. Geometric morphometric examination of small-scale variations in leaf shape caused by anthropogenic disturbance in dioecious forest forb *Mercurialis perennis*. *App. Ecol. Environ. Res.* 13(2):405-415.
- Wang H, Jin JY (2005) Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency. *Photosynthetica* 43(4):591-596.
- Wang J, Delavar MA (2023). Techno-economic analysis of phytoremediation: A strategic rethinking. *Sci. Total Environ.* 165949.
- Weis JS, Segarra KEA, Bernal P (2017) Salt marshes. In: The group of experts of the regular process (Eds.) The first global integrated marine assessment. World assessment I. University Press, Cambridge. pp 887–892.
- Weis JS, Weis P (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Internat.* 30(5):685-700.
- Wiszniewska A, Koźmińska A, Hanus-Fajerska E, Dziurka M, Dziurka K (2019) Insight into mechanisms of multiple stresses tolerance in a halophyte *Aster tripolium* subjected to salinity and heavy metal stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180:12-22.
- Woch MW, Stefanowicz AM, Stanek M (2017) Waste heaps left by historical Zn-Pb ore mining are hotspots of species diversity of beech forest understory vegetation. *Sci.Total Environ.* 599:32-41.
- Wójcik M, Sugier P, Siebielec G (2014) Metal accumulation strategies in plants spontaneously inhabiting Zn-Pb waste deposits. *Sci. Total Environ.* 487:313-322.

- Wójcik M, Gonnelli C, Selvi F, Dresler S, Rostański A, Vangronsveld J (2017) Metallophytes of serpentine and calamine soils—their unique ecophysiology and potential for phytoremediation. In: Advances in botanical research. Academic Press, United Kingdom. pp 1-42.
- World Health Organization. (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva.
- Wu H, Liu X, Zhao J, Yu J (2013) Regulation of metabolites, gene expression, and antioxidant enzymes to environmentally relevant lead and zinc in the halophyte *Suaeda salsa*. J. Plant Growth Regul. 32:353-361.
- Wuana RA, Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN Ecology. 2011:1-20.
- Wungrampha S, Rawat N, Singla-Pareek SL, Pareek A (2020) Survival strategies in halophytes: adaptation and regulation. In: Grigore MN (Ed.) Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems towards Biosaline Agriculture. Springer, Cham, Suiza. pp 1-22.
- Xiao R, Shen F, Du J, Li R, Lahori AH, Zhang Z (2018) Screening of native plants from wasteland surrounding a Zn smelter in Feng County China, for phytoremediation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 162:178-183.
- Yan ZZ, Ke L, Tam NFY (2010) Lead stress in seedlings of *Avicennia marina*, a common mangrove species in South China, with and without cotyledons. Aquat. Bot. 92(2):112-118.
- Yang L, Wang J, Yang Y, Li S, Wang T, Oleksak P, Kuca K (2022) Phytoremediation of heavy metal pollution: Hotspots and future prospects. Ecot. Environ. Saf. 234:113403.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem. Rev. 111(10):5944-5972.
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Zedler JB, Bonin CL, Larkin DJ, Varty A (2008) Salt Marshes. In: Jorgensen SE, Fath BD (Eds.) Encyclopedia of Ecology (2nd Ed.). Elsevier. University of Wisconsin, Madison, USA. pp. 614-622.
- Zelditch M, Swiderski D, Sheets H, Fink W (2004) Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press London, United Kingdom.
- Zhang S, Ni X, Arif M, Yuan Z, Li L, Li C (2020) Salinity influences Cd accumulation and distribution characteristics in two contrasting halophytes, *Suaeda glauca* and *Limonium aureum*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 191:110230.
- Zhao M, Zeng S, Liu S, Li Z, Jing, L (2020) Metal accumulation by plants growing in China: Capacity, synergy, and moderator effects. Ecol. Eng. 148:105790.
- Zhu G, Xiao H, Guo Q, Song B, Zheng G, Zhang Z, Okoli CP (2018) Heavy metal contents and enrichment characteristics of dominant plants in wasteland of the downstream of a lead-zinc mining area in Guangxi, Southwest China. Ecotoxicol. Environ. Saf 151:266-271.

- Zlatic N, Budečević S, Stanković M (2023) Geological Substrate Effects on *Teucrium montanum* L. (Lamiaceae) Morphological Traits: Geometric Morphometrics Approach. *Plants* 12(12):2381.
- Zoulias N, Harrison EL, Casson SA, Gray JE (2018) Molecular control of stomatal development. *Biochem. J.* 475(2):441-454.
- zu Ermgassen PS, Baker R, Beck MW, Dodds K, zu Ermgassen SO, Mallick D, Turner RE (2021) Ecosystem services: Delivering decision-making for salt marshes. *Estuar. Coast.* 44(6):1691-1698.
- Zulfiqar U, Farooq M, Hussain S, Maqsood M, Hussain M, Ishfaq M, Anjum, MZ (2019) Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *J. Environ. Manage.* 250:109557.