



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS.
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Estudio de la absorción y transporte de Cu(II) en la
planta micorrizada *Tagetes erecta* L. (cempasúchil):
Implicaciones para la Fitorremediación”**

**Tesis que presenta el:
MC Omar Surisadai Castillo Baltazar**

**Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Directora de Tesis: Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert
Co-Director de Tesis: Dr. Héctor Javier Villegas Moreno**

Morelia, Mich., Agosto 2011



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Consejo Académico del Programa Institucional de
Doctorado en Ciencias Biológicas

DR. JAVIER PONCE SAAVEDRA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Estudio de la absorción y transporte de Cu(II) en la planta micorrizada *Tagetes erecta* L (cempasúchil): Implicaciones para la fitorremediación" presentado por el M.C. Omar Surisadai Castillo Baltazar, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.


Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, 17 de agosto de 2011


MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert


Dr. Hector Javier A. Villegas Moreno


Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez


Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco


Dr. John Larsen


Dr. Carlos Rubén Sosa Aguirre


Dra. Vilma Castellanos Morales

A Luz María.

A mi familia.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Interacción Suelo- Planta- Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Para la realización de esta investigación se contó con la beca de Doctorado 169682 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) además del apoyo del IIQB-UMSNH.

Quiero aprovechar la ocasión para agradecer a las personas que hicieron posible la realización de esta investigación:

A mi asesora de tesis Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert por su dedicación, apoyo y por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Le estoy profundamente agradecido.

A mi co-asesor Dr. Héctor Javier Villegas Moreno por su disposición y por toda la ayuda brindada durante el desarrollo de esta investigación.

A los revisores y miembros de mi comité tutorial cuyos comentarios y sugerencias ayudaron a enriquecer este trabajo: Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez, Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco, Dr. John Larsen, Dr. Carlos Rubén Sosa Aguirre y Dra. Vilma Castellanos Morales.

A mis papás Lourdes y Rubén, por todo su amor, por el trabajo de toda su vida, por querer hacer de mí una persona de bien. Muchas gracias, ni con una vida compenso lo que han hecho por este hijo suyo.

A mis hermanos Jordán, Lulú, Misael y Abraham, por todo su apoyo y por estar conmigo siempre. Son una parte muy importante en mi vida.

A Justo Landa, Jovita Zavaleta, Lucero y Tito, por todo su apoyo, sus palabras de aliento y por hacerme parte de su familia. Muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Carlos, Loops, Esther, Santos, AnaLau, Erika, Mariela, Quique con quien compartimos muchos momentos agradables.

A Lore por su invaluable ayuda, sus comentarios y su disposición en compartir sus conocimientos, muchas gracias.

A la MC Remedios Cisneros por toda su disposición y ayuda en el desarrollo de la experimentación de este trabajo.

Al Dr. José Apolinar Cortés, a la IQ Laura (FIQ) por todas las facilidades brindadas en la realización de este trabajo.

A mis amigas de toda la vida Reny y Meche y a todos quien me han brindado su amistad y cariño en toda mi vida.

Y muy en especial a la persona que ha querido compartir su vida conmigo, en presencia y en esencia. La persona a quien amo. Mi esposa Luz María.

¡GRACIAS... TOTALES!

ÍNDICE.

RESUMEN	1
SUMARY	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
1,1 Introducción	6
1.2 Fitorremediación	8
1.2.1 Fitoextracción	9
1.2.2 Fitoestabilización	9
1.2.3 Fitovolatilización	9
1.2.4 Fitodegradación	10
1.2.5 Rizofiltración	10
1.2.6 Limitaciones y ventajas de la fitorremediación	10
1.3 Mecanismos de movilización, transporte y acumulación de metal en suelo y plantas	11
1.3.1 Movilización del metal en la matriz del suelo	11
1.3.2 Absorción	13
1.3.3 Transporte en el xilema	13
1.3.4 Transporte a las hojas	14
1.3.5 Detoxificación/Quelación	14
1.3.6 Retención	15
1.4 Bioquímica del cobre	15
1.4.1 Propiedades físico-químicas del Cu	15
1.4.2 Función del Cu en plantas	17
1.4.2.1 Cuproproteínas	17
1.4.3 Deficiencia y toxicidad de Cu en plantas	18
1.4.3.1 Deficiencia	19
1.4.3.2 Toxicidad	19
1.5 Estrategias desarrolladas por las plantas al crecer en suelos contaminados con metales pesados	20
1.5.1 Plantas tolerantes	21

1.5.2 Plantas indicadoras (acumuladoras)	21
1.5.3 Plantas hiperacumuladoras	22
1.6 Fitorremediación de cobre	22
1.7 Micorriza	24
1.7.1 Tipos de asociaciones micorrízicas	25
1.7.2 Los HMA en fitorremediación	26
1.8 <i>Tagetes erecta</i> L.	29
1.8.1 Características morfológicas del cempasúchil.	30
1.8.2 Usos del cempasúchil.	31
1.8.3 Aplicaciones de <i>T. erecta</i> en fitorremediación	31
1.8.4 <i>T. erecta</i> en simbiosis con HMA	32
1.9 Justificación	32
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	35
2.2 Objetivo General	36
2.2.1 Objetivos específicos	36
RESULTADOS	
CAPÍTULO 3	
The effect of the symbiosis between <i>Tagetes erecta</i> L. (marigold) and <i>Glomus intraradices</i> in the uptake of Copper(II) and its implications for phytoremediation. OS Castillo , N Dasgupta-Schubert, CJ Alvarado, EM Zaragoza y HJ Villegas. <i>New Biotechnol.</i> (2011), doi:10.1016/j.nbt.2011.05.009	38
CAPÍTULO 4	
The Uptake of Copper by <i>Aldama dentata</i> : Ecophysiological Response, Its Modeling, and the Implication for Phytoremediation. N Dasgupta-Schubert, MG Barrera, CJ Alvarado, OS Castillo , EM Zaragoza, S Alexander, S Landsberger y S Robinson. <i>Water Air Soil Pollut.</i> (2011), 220:37-55.	48

CAPÍTULO 5

Modelo de Respuesta ecofisiológica r/K aplicado a *T. erecta* micorrizada
y no micorrizada con *G. intraradices* 69

CAPÍTULO 6**DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

6.1 DISCUSIÓN GENERAL 87

6.2 CONCLUSIONES 90

6.3 PERSPECTIVAS 91

APÉNDICES

APÉNDICE A. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL 93

APÉNDICE B. 103

REFERENCIAS 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias vegetales para remediar agua y suelo contaminado con compuestos orgánicos e inorgánicos.	8
Figura 2. Mecanismos moleculares que están involucrados en la acumulación de metales de transición por las plantas.	12
Figura 3. Trayectoria de los metales de transición desde el suelo hasta los sitios donde es usado y almacenado.	16
Figura 4. Estrategias conceptuales de respuesta de las plantas al incremento en las concentraciones de metales en el suelo.	21
Figura 5. (A) Ilustración de las estructuras de colonización en ectomicorriza y micorriza arbuscular. (B) Resumen esquemático del proceso de colonización de raíces por HMA.	26
Figura 6. Mecanismos de detoxificación de HMA.	28
Figura 7. Contribución de HMA en FR de MP.	29
Figura 8. Flor de <i>T. erecta</i> (cempasúchil).	30
Figura A1. Diagrama de flujo de la metodología experimental seguida para cumplir los objetivos de la investigación.	93
Figura A2. Análisis de viabilidad de esporas de <i>Glomus intraradices</i> .	95
Figura A3. Imágenes del semillero de germinación (A) y de macetas montadas en camas de madera (B) donde se trasplantó y creció <i>Tagetes erecta</i> .	96
Figura A4. Secuencia programada en SigmaPlot® para la modelación matemática de datos experimentales.	102
Figura B1. Imágenes de raíces de TeM crecida a concentraciones de Cu en el sustrato (C_s) de 2500 (A), 2000 (B), 1500 (C), 1000 (D), 500 (E), 0 (F) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Las flechas blancas indican las vesículas.	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Niveles de concentración de metales pesados en una composición normal o fondo biogeoquímico, suelos metalíferos y concentración crítica a la cual la biodiversidad y la función del ecosistema son afectadas.	6
Cuadro 2. Estrategias en fitorremediación útiles en problemas de contaminación.	8
Cuadro 3. Tipos de centros de Cu^{2+} existentes las cuproproteínas.	17
Cuadro 4. Funciones de las cuproproteínas en plantas superiores e inferiores.	18
Cuadro 5. Umbral de concentraciones de metales pesados en plantas hiperacumuladoras.	22
Cuadro 6. Plantas acumuladoras e hiperacumuladoras de Cu.	23
Cuadro A1. Densidad del sustrato empleado en el semillero y en las macetas para el crecimiento de <i>T. erecta</i> .	94
Cuadro A2. Diseño Experimental empleado para el análisis de fitoacumulación de Cu en <i>T. erecta</i> micorrizada y no micorrizada con <i>G. intraradices</i> .	97
Cuadro A3. Tratamientos del experimento empleado para el análisis de fitoacumulación de Cu en <i>T. erecta</i> micorrizada y no micorrizada con <i>G. intraradices</i> .	97
Cuadro A4. Concentración de los componentes de la Solución Nutritiva Long-Ashton usada para fertilizar <i>T. erecta</i> durante el experimento.	98

RESUMEN

El uso excesivo de fertilizantes y otras actividades antropogénicas han acumulado micronutrientes, como el cobre (Cu) en el suelo. La fitorremediación es una biotecnología ambiental que ayuda a remediar la contaminación ocasionada por elementos tóxicos como el Cu. Se sabe que las asociaciones micorrízicas incrementan la absorción y transporte de macro y micronutrientes de baja movilidad, a la planta hospedera, además que solubilizan fosfatos y aumentan el área de exploración. Para analizar el efecto de la micorriza en la fitoacumulación de Cu se estudió su capacidad de solubilizar Cu(II) y mejorar su absorción en *Tagetes erecta* L. (cempasúchil) colonizado con el hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Glomus intraradices*. *T. erecta* se desarrolló por 9 semanas en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo. El Cu se agregó en la forma insoluble de CuO, para simular las uniones Cu-O en el suelo. Se determinaron las variables de respuesta: colonización, área foliar, biomasa, pH de lixiviados y parámetros biométricos, en función de la concentración de Cu en raíces, brotes y lixiviados medidas por FAAS. El modelo r/K , basado en biología de sistemas- y dinámica de población- propuesto, explica las curvas de respuesta ecofisiológica: perfiles de concentración de raíces, brotes y planta completa, en *T. erecta* con y sin micorriza. Los resultados de absorción de Cu en *T. erecta* mostraron las micorrizadas acumularon más Cu en raíces, además *T. erecta* mostró un comportamiento típico de la plantas exclusora de metal. En *T. erecta* micorrizada, *G. intraradices* aumentó su tolerancia al Cu(II). El análisis de la colonización de las raíces de *T. erecta* micorrizada mostró que, al incremento en la concentración de Cu en el sustrato, se generó una abundante cantidad de vesículas. Estos resultados sugieren que *G. intraradices* acumula Cu en sus vesículas y al mismo tiempo *T. erecta* incrementa la tolerancia al Cu. Los valores de los factores de bioconcentración y de translocación sugieren que la simbiosis *T. erecta*-*G. intraradices* potencialmente fitoestabiliza Cu. Adicionalmente este trabajo confirma la aplicabilidad del modelo r/K para sistemas planta-HMA-metal pesado. Los factores r/K sugieren una nueva forma cuantitativa de analizar la fitodisponibilidad del metal y la capacidad de acumulación de metal en la planta. Acorde con la literatura revisada, este trabajo representa el

primer reporte sobre la modelación de la respuesta ecofisiológica (C_p - C_s) al estrés metálico para plantas colonizadas por HMA.

Palabras clave: *Tagetes erecta*, *Glomus intraradices*, Cu, fitoacumulación, modelo r/K .

SUMMARY

Excessive use of fertilizers and other anthropogenic activities have gradually accumulated micronutrients such as copper (Cu) in soils. Phytoremediation is an environmental biotechnology that seeks to remediate pollution caused by bioaccumulative inorganic toxins like Cu. It is known that symbiotic mycorrhizal associations can increase the uptake and delivery of low mobility macro and micronutrients, to the host plant because they solubilize nutrients and increase their exploration area. To analyze the effect of mycorrhizae on the phytoaccumulation of Cu, we studied their ability to solubilize Cu(II) and enhance its absorption by *Tagetes erecta* L. (marigold) colonized with the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Glomus intraradices*. Plants were grown for 9 weeks in a growth chamber under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod. Cu was added in the insoluble form of CuO to simulate the insoluble Cu-O bonded species in soil. The biotic and abiotic parameters of colonization, foliar area, biomass, pH of leachates and plant biometrics were determined as functions of the Cu concentration that was measured in the roots, shoots and lixiviates by FAAS. Using the r/K model, based in systems biology- and population dynamics-, is proposed that satisfactorily explains the plant Cu concentration (C_p) versus soil Cu concentrations (C_s) ecophysiological response curves for the root, shoot, and whole plant, in both systems *T. erecta* mycorrhized and non mycorrhized. The results of Cu absorption showed that colonized plants accumulated more Cu in the roots and all plants displayed the typical behavior of Cu excluders. In mycorrhizal plants, it appears that *G. intraradices* increases plant tolerance to Cu(II). The evaluation of the colonization of roots inoculated with *G. intraradices* showed that for increasing concentration of Cu in the substrate, a proliferation of vesicles developed. These results suggest that *G. intraradices* possibly accumulates Cu in its vesicles thereby enhancing the Cu tolerance of *T. erecta* even while increasing root Cu accumulation. The parameters Bioconcentration Factor and Translocation Factor suggest that the system *T. erecta*-*G. intraradices* can potentially phytostabilize Cu. This work confirms the applicability of the r/K model for systems plant-AMF-heavy metal. The $r-K$ factors suggest a new quantitative manner of analyze the phytoavailability of the metal and the plant's

accumulation capability. To our knowledge, this work is the first report on the modeling of ecophysiological response (C_p - C_s) to metal stress for colonized plants by AMF.

Keywords: *Tagetes erecta*, *Glomus intraradices*, Cu, phytoaccumulation, r/K model.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCIÓN.

Los metales pesados (MP) son contaminantes que se encuentran en todas las sociedades industrializadas. La contaminación del suelo por MP se diferencia de la contaminación de aire o agua debido a que los MP persisten en el suelo por mucho más tiempo que en otros sitios en la biósfera (Lasat 2002). Se considera que existe contaminación del suelo cuando su composición pasa de “normal”, al denominado nivel o fondo biogeoquímico (Cuadro 1). En décadas recientes, la liberación mundial anual de MP alcanzó las 22000 ton (toneladas métricas) para Cadmio(Cd), 939000 ton para Cobre(Cu), 783000 ton para Plomo (Pb) y 1350000 ton para Zinc (Zn) (Singh *et al.* 2003).

Cuadro 1. Niveles de concentración de metales pesados en una composición normal o fondo biogeoquímico, suelos metalíferos y concentración crítica a la cual la biodiversidad y la función del ecosistema son afectadas.

Elemento	Fondo biogeoquímico (mg·kg ⁻¹)	Suelo metalífero (mg·kg ⁻¹)	Concentración crítica (mg·kg ⁻¹)
Arsénico	2.2-2.5	1510	-
Cadmio	0.06-1.1	317	1.10
Cromo	7-221	3450	64.41
Cobre	6-80	3783	48.78
Mercurio	0.02-0.41	12000	0.56
Niquel	4-55	11260	54.64
Plomo	10-84	49910	75.68
Zinc	17-125	7480	207.32

Tomada de Peer *et al.* 2005.

Las fuentes de contaminantes de MP en suelos metalíferos son la minería, fundición de la industria metalurgia, los lodos de aguas residuales, los sitios de disposición de residuos, los fertilizantes agrícolas y los desechos de industrias electrónicas (Alloway 1995). Por ejemplo los desechos de las minas, ricos en sulfuros metálicos causan “drenaje ácido de mina” (DAM), mediante la reacción de los sulfuros con el oxígeno y el agua atmosféricos, y el DAM contiene elevados niveles de MP que pueden ser perjudiciales para animales y plantas (Stoltz y Greger 2002).

Cuando existen niveles altos en la concentración de MP solubles, de elementos esenciales: Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo y tóxicos: Cd, Pb, Hg, Cr. Los que causan daño en el ADN, con efectos cancerígenos en humanos y animales probablemente por su capacidad mutagénica (Knasmuller *et al.* 1998; Baudouin *et al.* 2002).

Algunos MP, como el Cu, tienen importancia biológica, en concentración traza es esencial para la vida ya que es cofactor de enzimas de funciones vitales, sin embargo en concentración elevada es tóxico (Csuros y Csuros 2002). La contaminación de Cu en suelos por causas naturales es poco común, por el contrario, está relacionada con actividades antropogénicas como: la minería; actividades industriales y el uso frecuente de plaguicidas a base de Cu (Gocht *et al.* 1988, He *et al.* 2005). El uso de fertilizantes y fungicidas, a través de los años, ha ocasionado la acumulación de óxidos e hidróxidos de Cu [CuOH^+ y el $\text{Cu}(\text{OH})_2$] (Evanko y Dzombak 1997), que han causado contaminación en el suelo en Europa, Australia y Latino América, como es el caso del Bourdeaux mix, que en su fórmula contiene CuSO_4 y $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Mirlean *et al.* 2007, Brun *et al.* 2001). En el noroeste de México se ha observado que la irrigación con fungicidas, a base de oxiclورو de Cu $\{\text{CuCl}_2 \cdot 3[\text{Cu}(\text{OH})_2]\}$ (Cupravit ®), ha provocado la contaminación de suelo y agua (Frías-Espericueta *et al.* 2004 y 2005, Páez-Osuna *et al.* 1998). En los huertos de aguacate del Estado de Michoacán es común el uso de fungicidas a base de Cu (CuSO_4 y CuOCl principalmente). Sin embargo se desconoce el nivel de concentración de Cu en suelos de huertos de aguacate derivado de estas prácticas [1].

Remediar el suelo impactado por MP es posible mediante técnicas, químicas, físicas o biológicas, las primeras son costosas, destruyen la estructura del suelo y la actividad biológica (McIntyre 2003). Las biológicas son menos costosas y no afectan la estructura y la fertilidad del suelo. La fitorremediación (FR) es una alternativa para la recuperación de suelos contaminados con MP.

1.2 FITORREMEDIACIÓN.

En general se define la FR como el conjunto de mecanismos vegetales para degradar, absorber, metabolizar o detoxificar MP, compuestos orgánicos, radioactivos y petroderivados a formas menos tóxicas. La FR tiene ventajas como la limpieza y la economía; no afectan negativamente a la estructura del suelo, se aplican prácticas agrícolas *in situ* y evitan el costo del transporte (Cunningham *et al.* 1995).

La FR se aplica tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos (Cuadro 2), en ambientes sólidos y líquidos (Figura 1):

Cuadro 2. Estrategias en fitorremediación útiles en problemas de contaminación.

Proceso	Mecanismo	Contaminante
Fitodegradación	Mineralización	Orgánicos
Fitoestabilización	Formación de complejos	Inorgánicos
Fitoextracción	Hiperacumulación	Inorgánicos
Fitovolatilización	Volatilización en las hojas	Orgánicos e inorgánicos
Rizofiltración	Acumulación en la rizósfera	Orgánicos e inorgánicos

Tomada de Ghosh y Singh 2005.

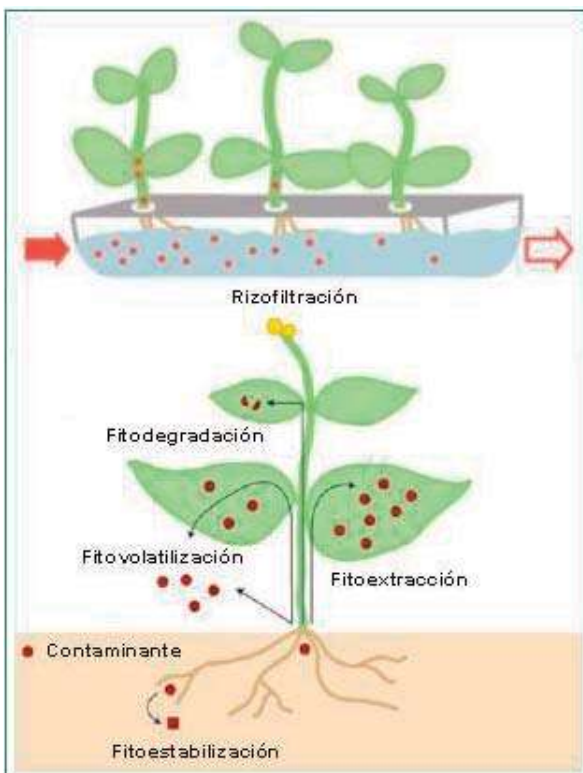


Figura 1. Estrategias vegetales para remediar agua y suelo contaminado con compuestos orgánicos e inorgánicos. Los círculos rojos representan el contaminante. (Modificada de Pilon-Smits 2005).

1.2.1 Fitoextracción. En este tipo de FR las plantas remueven toxinas, MP y metaloides, por sus raíces y subsecuente transporte a los órganos aéreos (Salt *et al.* 1998, Lombi *et al.* 2001a). Las plantas acumulan tanto en tallos como en hojas los contaminantes, posteriormente se cosechan y remueven del sitio. La fitoextracción se puede dividir en dos categorías: continua e inducida (Salt *et al.* 1998).

En la fitoextracción continua las plantas hiperacumulan contaminantes en su ciclo biológico de manera natural, mientras que en la inducida, la movilidad y la absorción de contaminantes se incrementan mediante la adición de quelantes sintéticos al suelo. Se ha reportado que la adición de EDTA a suelos contaminados con MP, incrementa la movilización y la posterior acumulación de Pb, Cd, Cr, Cu, Ni y Zn tanto en mostaza parda (*Brassica juncea*) como en girasol (*Helianthus annuus* L.) (Blaylock *et al.* 1997, Turgut *et al.* 2004). También se ha investigado el efecto de otros compuestos quelantes como CDTA, DTPA, EGTA, EDDHA y NTA en la acumulación de MP en diversas especies de plantas (Huang *et al.* 1997, Lombi *et al.* 2001b). Sin embargo, el uso de compuestos quelantes puede tener consecuencias desfavorables, debido a que, por lixiviación, los complejos metálicos solubles pueden llegar a contaminar aguas subterráneas (Wu *et al.* 1999, Lombi *et al.* 2001b).

1.2.2 Fitoestabilización. Es la acumulación de tóxicos en las raíces vegetales o su precipitación en el suelo por los exudados de las raíces que los inmoviliza y reduce su disponibilidad. Las plantas que crecen en sitios contaminados también estabilizan el suelo, reducen la erosión y evitan el contacto directo de los contaminantes con especies animales. Plantas con altos índices de transpiración, como plantas forrajeras y gramíneas son útiles en fitoestabilización ya que disminuyen la cantidad de agua subterránea y absorben los contaminantes (Suresh y Ravishankar 2004). La combinación de estas plantas con árboles densos de hojas perenes o raíces profundas son efectivas en la remediación del sitio (Berti y Cuningham 2000).

1.2.3 Fitovolatilización. En este proceso, los contaminantes solubles son absorbidos por las raíces de plantas y se volatilizan a la atmósfera por los estomas (Tollsten y Muller 1996, Newman *et al.* 1997, Davis 1998). El mejor ejemplo de esto es la volatilización del Mercurio (Hg) mediante la conversión a la forma elemental en

la planta transgénica de *Arabidopsis* y en el álamo amarillo, que expresan la enzima bacteriana mercurio reductasa *merA* que cataliza la reducción del mercurio iónico ($\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$) y favorece su volatilización (Rugh *et al.* 1996, 1998).

El Selenio (Se) es un caso especial, es un metal que puede ser absorbido por plantas y volatilizado como dimetil-selenio por microalgas *Chlorella* sp. (Neumann *et al.* 2003).

1.2.4 Fitodegradación. En este caso, las plantas convierten los contaminantes orgánicos en compuestos no tóxicos por enzimas secretadas por sus raíces (Schnoor 1997, Salt *et al.* 1998, Suresh y Ravishankar 2004). Uno de los principales contaminantes orgánicos de suelo y agua, el tricloroetileno (TCE) puede ser absorbido por el álamo del Canadá (*Populus deltoides x nigra*), y es mineralizado para formar CO_2 , ión cloro y agua (Newman *et al.* 1997, Schnoor *et al.* 1995).

1.2.5 Rizofiltración. Las plantas mediante sus raíces remueven contaminantes del agua y corrientes acuosas de desecho, como desechos agrícolas, descargas industriales y materiales nucleares (Salt *et al.* 1998, Suresh y Ravishankar 2004). Por absorción y adsorción radical.

1.2.6 Limitaciones y ventajas de la fitorremediación. La FR tiene una serie de limitaciones, tales como:

- a) la concentración del contaminante debe estar dentro de los límites de capacidad de la planta,
- b) la localización del contaminante cercano a las raíces vegetales,
- c) las condiciones físicas y químicas del suelo: pH, salinidad y el contenido de nutrientes, limitan el crecimiento vegetal,
- d) riesgos de lixiviación de los contaminantes más móviles, y
- e) accesibilidad de las plantas a la zona contaminada.

Las estrategias de FR son especialmente útiles para su aplicación en grandes extensiones de suelo en donde los contaminantes sean relativamente inmóviles, las concentraciones de contaminantes sean bajas, además se debe tener en cuenta que

la remediación del sitio contaminado es a largo plazo. Entre las ventajas que presentan estas estrategias, destacan:

- a) que se pueden realizar *in situ*, es decir sin necesidad de transportar el suelo o sustrato contaminado,
- b) son de bajo costo,
- c) permiten su aplicación, tanto a suelos como a aguas,
- d) sólo requieren prácticas agronómicas convencionales,
- e) actúan positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, y
- f) son medioambientalmente aceptables, debido a que se basan en la formación de una cubierta vegetal.

1.3 MECANISMOS DE MOVILIZACIÓN, TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN DE METAL EN SUELO Y PLANTAS.

En la planta la acumulación de un metal está en función de su capacidad de absorción y de los sitios de unión al metal. La figura 2 muestra los mecanismos involucrados en la acumulación vegetal de metales: movilización o solubilización, absorción, transporte en el xilema, transporte a las hojas, retención y almacenamiento en tejidos aéreos y raíces. En cada etapa la concentración y afinidad de los compuestos quelantes, así como la presencia y selectividad de los mecanismos de transporte, afectan el índice de acumulación del metal (Clemens 2002).

1.3.1 Movilización del metal en la matriz del suelo. En el suelo la mayoría de los metales existen de manera insoluble y tienden a estar disponibles a pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr que son solubles a pH alcalino (Kabata-Pendias 2000). En suelos donde el pH es moderadamente alcalino, la precipitación de los metales es en forma de hidróxidos. Debido a esto las plantas usan dos métodos para liberar metales de la matriz del suelo: la acidificación de la rizósfera mediante la acción de bombas de protones en la membrana plasmática y la secreción de ligandos que quelan el metal.

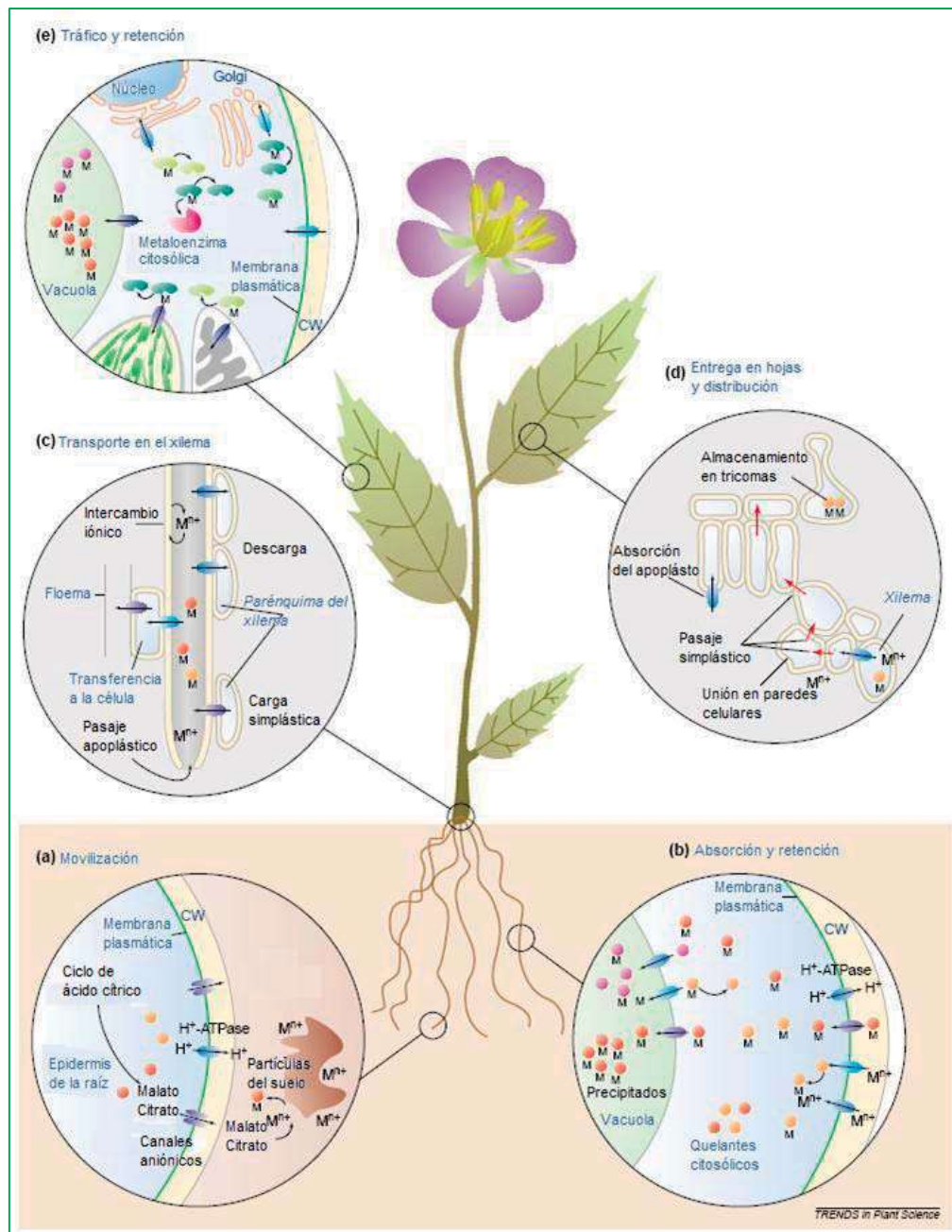


Figura 2. Mecanismos moleculares que están involucrados en la acumulación de metales de transición por las plantas. (a) Los iones metálicos son movilizados por la secreción de compuestos quelantes y mediante la acidificación de la rizósfera. (b) La absorción de los metales solubles o complejos metálicos es mediada por diferentes sistemas de absorción en la membrana plasmática. En el interior de las células, los metales son quelados y su exceso es transportado a la vacuola. (c) Los metales de transición son transportados desde la raíz hacia los brotes a través del xilema. Presumiblemente, la mayor parte llega al xilema a través del simplasto, en el apoplasto puede ocurrir en la epidermis y en la corteza de la raíz. Dentro del xilema, los metales están como iones hidratados o como complejos metálicos. (d) Posteriormente cuando alcanzan el apoplasto de las hojas, los metales son capturados diferencialmente por distintos tipos de células y se transportan célula a célula a través de los plasmodesmos. Aparentemente el almacenamiento se da preferencialmente en los tricomas. (e) La absorción dentro de las células de las hojas nuevamente es catalizada por diversos transportadores. La distribución intracelular (tráfico) de los metales de transición esenciales es mediada por chaperonas específicas y transportadores localizados en las membranas internas. Abreviaturas y símbolos: CW, pared celular; M, metal; círculos llenos, quelantes; óvalos llenos, transportadores; estructuras de forma de frijol, chaperonas (Modificada de Clemens *et al.* 2002).

Las plantas han perfeccionado estos procesos para liberar metales esenciales del suelo. Sin embargo, en aquellos con elevada concentración de metales tóxicos se solubilizarán también los metales esenciales para la vida. En el caso del Cu, se ha observado que la exudación de ácidos orgánicos por la raíz, principalmente de ácido cítrico incrementa la solubilidad del Cu en suelo (Yang *et al.* 2001, Murphy *et al.* 1999).

1.3.2. Absorción. Este es un mecanismo radicular de captura de metales. Primeramente los metales se unen a la pared celular, la cual es un intercambiador de iones de baja afinidad y baja selectividad. Los sistemas de transporte y los sitios de unión intracelular de gran afinidad impulsan la absorción a través de la membrana plasmática. La absorción de los iones metálicos es probable que se realice a través de transportadores secundarios como canales y/o proteínas transportadoras. El potencial de la membrana, que es negativo en la parte interna de la membrana plasmática y podría exceder los 200 mV en las células epidérmicas, proporciona la fuerza motriz para la absorción de cationes a través de los transportadores secundarios (Clemens *et al.* 2002). Sancenón *et al.* (2004), identificaron un transportador de Cu llamado COPT1 en la membrana plasmática de la raíz, concretamente en la zona apical. En la raíz de *A. thaliana* se ha encontrado otros transportadores que podrían intervenir en la adquisición de Cu, *AtZIP2* y *AtZIP4* (Mukherjee *et al.* 2006).

1.3.3 Transporte en el xilema. En este mecanismo bioquímico vegetal los metales solubles pueden ingresar dentro del simplasto de la raíz vegetal una vez que han atravesado la membrana plasmática de las células epidérmicas o a través del apoplasto por el espacio intercelular. El apoplasto continuo de la epidermis de la raíz y la corteza es fácilmente permeable para solutos. Las paredes celulares de la capa de células de la endodermis actúan como una barrera para la difusión apoplástica dentro del sistema vascular. En general los solutos deben ser absorbidos dentro del simplasto de la raíz antes de que puedan ingresar al xilema (Tester y Leigh 2001). Posterior a la absorción del metal en el simplasto de la raíz existen tres procesos que gobiernan el movimiento de metales hacia el xilema; la secuestación de metales

dentro de las células de la raíz, transporte simplástico dentro del conducto central y la liberación dentro del xilema. El transporte de iones dentro del xilema es generalmente un proceso controlado mediado por proteínas transportadoras de membrana (Gaymard *et al.* 1998). La mayoría de los metales tóxicos que cruzan esta membrana, se cree que emplean canales o transportadores destinados para elementos esenciales (Hall 2002, Meharg y Macnair 1992a, 1992b). En el caso particular del Cu la forma en que es transportado al interior del xilema aún se desconoce, pero probablemente se realiza a través de un transportador llamado OPT3 (Wintz *et al.* 2003). Este transportador, que ha sido identificado en *A. thaliana*, pertenece a la familia de transportadores oligopeptídicos OPT (Yen *et al.* 2001).

1.3.4. Transporte a las hojas. En este mecanismo vegetal los metales alcanzan el apoplasto de las hojas en la sabia del xilema de donde son tomados por las células de las hojas (Marschner, 1995). Los transportadores median la absorción dentro del simplasto y la distribución dentro de la hoja se realiza mediante el apoplasto o el simplasto (Karley *et al.* 2000). En el caso del metal de interés, se ha propuesto que el Cu se transporta del xilema hasta las hojas mediante el transportador AtYSL2, quien es capaz de transportar Fe^{2+} y Cu^{2+} cuando están quelados con nicotianamina (DiDonato *et al.* 2004, Schaaf *et al.* 2005).

El tráfico de metales que se produce dentro de cada célula de la planta, mantiene la concentración dentro de los intervalos fisiológicos específicos en cada órgano y asegura la entrega de metales a las proteínas que requieran estos metales. En condiciones de exceso de Cu, se acumula en la base de los tricomas y en las vacuolas de células de la epidermis de la hoja unido a diversos quelantes endógenos tal como ácidos orgánicos, proteínas y pirofosfato. Esta localización minimiza el efecto tóxico del Cu manteniéndolo lo más lejos posible de las células mesófilas, donde se realiza la fotosíntesis (Peer *et al.* 2005).

1.3.5. Detoxificación/Quelación. En los vegetales, el metal puede ser convertido a una forma menos tóxica mediante conversión química o por formación de complejos (quelación). Los diferentes estados de oxidación de los elementos tóxicos tienen características específicas para su absorción, transporte, retención o toxicidad.

1.3.6 Retención. El paso final para la acumulación de metales en vegetales es la retención de éstos lejos de los procesos celulares que pueden interrumpir. La retención normalmente se da en las vacuolas en donde el complejo (metal-ligando) debe ser transportada a través del tonoplasto. Los metales también pueden permanecer en la pared celular en lugar de atravesar la membrana plasmática, ya que los sitios negativos de las paredes celulares interactúan con los cationes polivalentes (Wang y Evangelou 1994).

Entre los mecanismos que determinan los índices de acumulación en plantas, definidos en esta sección, existen algunos que en la actualidad se busca mejorar para incrementar la cantidad de metal acumulado en tejidos aéreos y raíces, o inmovilizado en la matriz del suelo como estrategias de la FR. Estos procesos se muestran en la figura 3.

1.4 BIOQUÍMICA DEL COBRE

El Cu es un micronutriente esencial para los organismos vivos ya que es un constituyente indispensable de un gran número de enzimas y agentes redox que intervienen en el metabolismo celular. Para entender algunas de las funciones que desempeña el Cu, así como su homeostasis se consideran en primer lugar sus propiedades físico-químicas.

1.4.1. Propiedades físico-químicas del Cu. El Cu pertenece al grupo IB de la serie de metales de transición de la tabla periódica de elementos. Su estructura electrónica basal es $[\text{Ar}]3d^{10}4s$, mientras que sus estados de oxidación más habituales, Cu^+ y Cu^{2+} es $3d^{10}$ y $3d^9$, respectivamente. Los cationes de la serie de elementos d, como el Cu, tienen alta afinidad para formar complejos de coordinación. Debido a su elevada afinidad electrónica, los cationes mono y divalentes de Cu son los iones más efectivos para la unión a moléculas orgánicas.

La geometría, la estequiometría y la estabilidad de los centros de coordinación en las moléculas orgánicas depende de la naturaleza de los ligandos y del estado de oxidación del metal, en el ión +1 (Cu^+) tiene sus orbitales 3d ocupados y los números de coordinación más habituales son 2, 3 y 4 con geometría lineal (2), trigonal plana

(3) o tetraédrica (4). En el ión $+2$ (Cu^{2+}) posee un electrón desapareado en el orbital d y los números de coordinación más habituales son 4, 5 y 6 con geometría cuadrada plana (4), tetraédrica (5) u octaédrica (6). La geometría de coordinación del Cu han permitido definir tres tipos de centros de Cu^{2+} en las proteínas que contienen Cu o cuproproteínas, ver Cuadro 3 (Koch *et al.* 1997, Falconi y Desideri 2002).

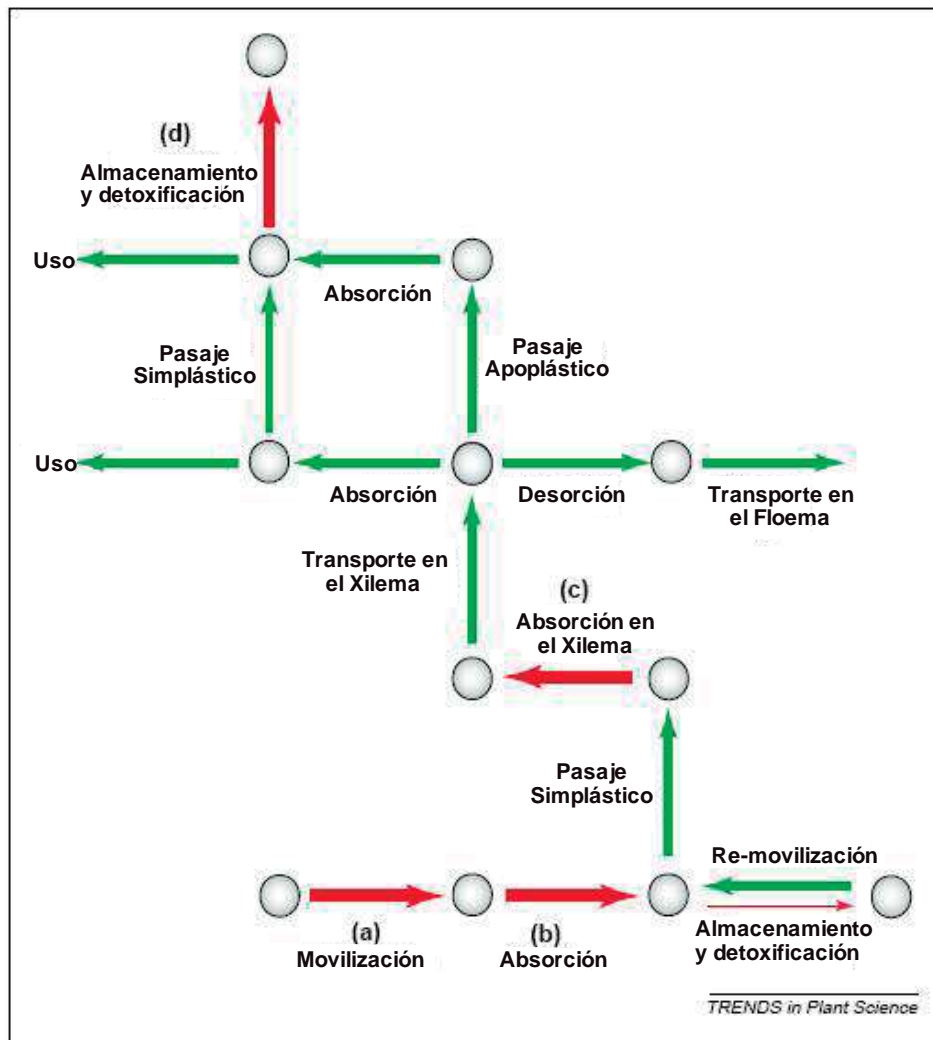
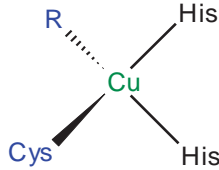
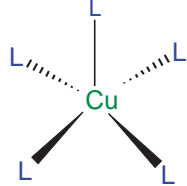
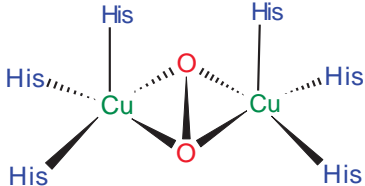
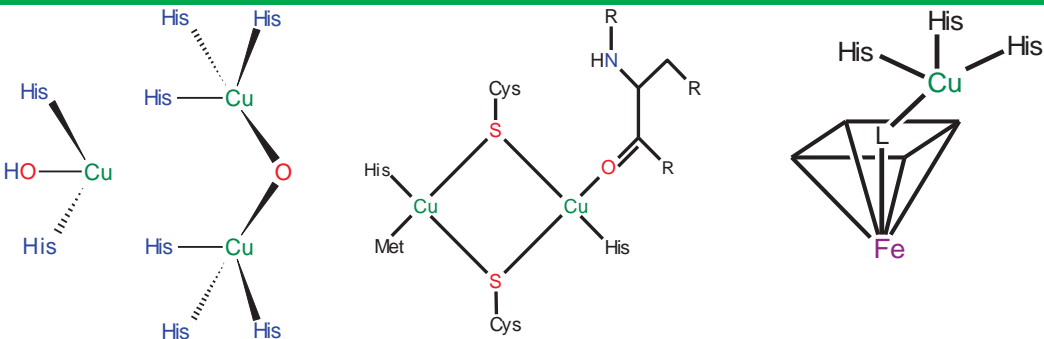


Figura 3. Trayectoria de los metales de transición desde el suelo hasta los sitios donde es usado y almacenado. Los procesos que regulan la acumulación de metal están representados en la figura 1 y descritos en el texto. Aquí son señalados por flechas, las rojas indican los mecanismos que actualmente se busca entender. Estos incluyen a) incrementar la movilización (solubilización) debido a la secreción de ácidos orgánicos, b) aumento de la absorción por la sobre expresión o la desregulación de transportadores, c) estimular la absorción en la raíz y la translocación a través del xilema por sobre producción de quelantes intracelulares, o d) mayor fuerza de los depósitos de metal en las hojas mediante la sobre expresión de mecanismos de almacenamiento y detoxificación. Los procesos que de acuerdo al conocimiento muestran distintas características moleculares en plantas hiperacumuladoras se muestran con flechas de diferentes tamaños. Una flecha más delgada indica un proceso con una actividad reducida en metalofitos. Esto aplica a la retención de metales en tejidos de la raíz (Modificada de Clemens *et al.* 2002).

Cuadro 3. Tipos de centros de Cu^{2+} existentes las cuproproteínas.

Tipo de centro	Geometría	Estructura
I	Tetraédrica distorsionada	
II	Cuadrada distorsionada	
III	Piramidal	
Estructuras de centros trinucleares		
		

1.4.2. Función del Cu en plantas. En plantas, el Cu es un cofactor que interviene en el transporte de electrones durante la fotosíntesis y la respiración, así como en el mecanismo de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (O_2) (ERO). Las funciones del Cu en la planta están determinadas por las enzimas que lo requieren para su funcionamiento.

1.4.2.1. Cuproproteínas. Funcionalmente éstas se pueden clasificar en tres grupos, ver Cuadro 4 (De Rienzo *et al.* 2000, Halcrow *et al.* 2001, Lindley 2001a, 2001b, Vila y Fernández 2001): a) cuproproteínas que participan en el transporte de electrones,

b) involucradas en el transporte y oxidación del O₂ y en la reducción de compuestos inorgánicos y c) con diversas funciones.

Cuadro 4. Funciones de las cuproproteínas en plantas superiores e inferiores

Participan en el transporte de electrones		
Proteína	Tipo de centro	Función
Plastocianina	I	Fotosíntesis
Plantacianina	I	Desarrollo de la antera y polinización
Ascorbato oxidasa	Trinuclear	Metabolismo de la pared celular y defensa antioxidante
Lacasa	Trinuclear	Lignificación
Transporte y oxidación del oxígeno molecular y en la reducción de compuestos inorgánicos		
Citocromo c oxidasa	Trinuclear	Respiración aerobia
Diamino oxidasa	II	Lignificación y defensa
Polifenol oxidasa	III	Síntesis de pigmentos, defensa antioxidante y lignificación
Diversas funciones		
Superóxido dismutasa de Cu y Zn (CuZnSOD)	II	Defensa antioxidante
Cu-ATPasa	Metalotioneína	Distribución intracelular de Cu y Detoxificación
Metalotioneína	Metalotioneína	Detoxificación
Cuprochaperonas	Metalotioneína	Distribución intracelular de Cu

1.4.3. Deficiencia y toxicidad de Cu en plantas. Se sabe que el Cu es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo normal de la planta (6-12 mg Cu·kg⁻¹ de tejido seco). Si el Cu suministrado a la planta se encuentra por debajo del nivel fisiológico necesario (aproximadamente 5 mg Cu·kg⁻¹ de tejido seco), ésta mostrará síntomas de deficiencia y si por el contrario se encuentra por encima de los niveles fisiológicos, la planta tendrá síntomas de toxicidad, 20-30 mg Cu·kg⁻¹ de tejido seco (Marschner 1995).

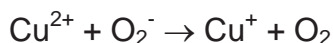
1.4.3.1 Deficiencia. En las plantas la falta de Cu se observa cuando crecen en suelos donde el nivel de Cu es bajo (ej. suelos calcáreos) y con alto contenido de materia orgánica donde el Cu está formando complejos (Marschner 1995).

En general la deficiencia de Cu provoca: i) atrofiamiento y enrollamiento de hojas; ii) clorosis; iii) necrosis; iv) retardo de la senescencia; v) disminución de la concentración de carbohidratos en el tejido vegetativo; vi) alteración de la composición lipídica de las membranas biológicas; vii) inhibición de actividades enzimáticas: lacasa, CuZnSOD, diamino oxidasa, ascorbato peroxidasa; viii) daño oxidativo; ix) bloqueo de la fotosíntesis a nivel del fotosistema I y x) inhibición débil de la respiración a través de la pérdida parcial de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (Marschner 1995).

1.4.3.2. Toxicidad. Debido a las propiedades redox del Cu cataliza múltiples reacciones biológicas, lo que lo hace un elemento esencial, y esas mismas propiedades son causantes de su toxicidad (Halliwell y Gutteridge 1989). El Cu cambia de forma cíclica su estado de oxidación dentro de la célula cuando entra en contacto con ERO's, como son: el radical superóxido (O_2^-), el anión peróxido (O_2^{2-}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Estas especies reactivas son generadas por la reducción incompleta del O_2 durante la fotosíntesis y la respiración. En estas condiciones, el Cu^+ genera radicales $\bullet OH$ mediante la catálisis de la reacción de Fenton:



El Cu^{2+} se puede volver a reducir en presencia del radical superóxido:



El balance neto de estas dos reacciones es lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss, en la cual el Cu cataliza la producción de radical $\bullet OH$ a partir del radical O_2^- y de H_2O_2 . El radical $\bullet OH$ es uno de los oxidantes más poderosos que se conocen, reacciona rápidamente con numerosos compuestos celulares esenciales,

que incluyen lípidos de membranas, proteínas, carbohidratos y ADN (Halliwell y Gutteridge 1989).

El hecho de que el Cu sea tóxico se debe a que interacciona inespecíficamente con cadenas laterales de aminoácidos como: cisteína, metionina e histidina. Este efecto causa cambios conformacionales en las proteínas, bloqueo del sitio activo, y la inactivación de su función biológica.

Para la mayoría de las especies vegetales, la gran concentración de Cu en el medio de cultivo es tóxica y provoca: i) clorosis; ii) necrosis; iii) atrofia; iv) decoloración de las hojas; v) descenso en el contenido de clorofila; vi) interacción con otros iones esenciales; vii) reducción de biomasa e inhibición del crecimiento de la raíz (Lidon y Henriques 1993, Maksymiec 1997, Pätsikkä *et al.* 2001, Panou-Filotheou y Bosabalidis 2004, Kopittke y Menzies 2006).

A nivel celular la toxicidad de Cu ocasiona: i) la inhibición de actividades enzimáticas y de la función de proteínas; ii) la peroxidación de lípidos (De Vos *et al.* 1993, Ouariti *et al.* 1997, Quartacci *et al.* 2001, Mithöfer *et al.* 2004); iii) estrés oxidativo (Navari-Izzo *et al.* 1998, Cuypers *et al.* 2000, Mithöfer *et al.* 2004); iv) alteraciones en la estructura cloroplástica y en la composición de la membrana tilacoidal (Baszynski *et al.* 1988, Lidon y Henriques 1991, 1993, Ciscato *et al.* 1997, Pätsikkä *et al.* 1998, Quartacci *et al.* 2000); v) la modificación de la morfología de los cromosomas durante el proceso de división celular (Jiang *et al.* 2001).

1.5. ESTRATEGIAS DESARROLLADAS POR LAS PLANTAS AL CRECER EN SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

Las plantas exhiben tres estrategias básicas cuando crecen en suelos con niveles potencialmente tóxicos de iones metálicos, sean esenciales o no (Baker 1981) (ver figura 4): exclusión, respuesta indicadora e hiperacumulación.

Cuando se categorizan plantas que pueden crecer en presencia de elementos tóxicos se emplean los términos “tolerante”, “indicadora” o “acumuladora” e “hiperacumuladora”.

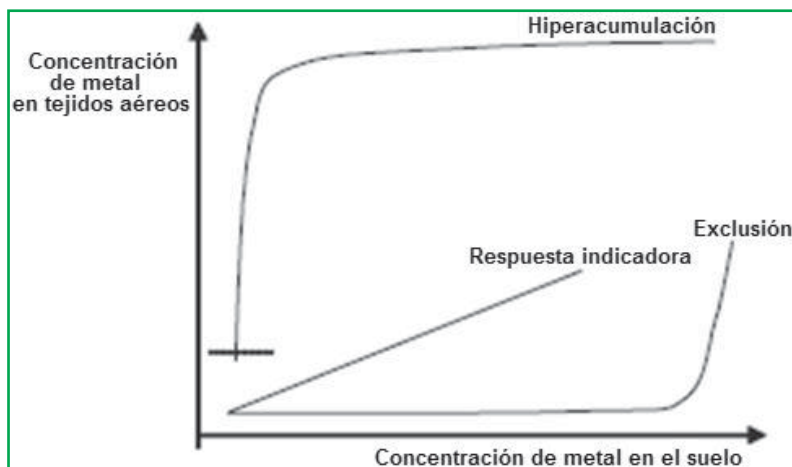


Figura 4. Estrategias conceptuales de respuesta de las plantas al incremento en las concentraciones de metales en el suelo.

1.5.1 Plantas tolerantes. Una especie vegetal tolerante es aquella que crece en suelos con concentración de un elemento particular que es tóxica para la mayoría de las plantas. Mientras que ambas especies, indicadoras e hiperacumuladoras son también tolerantes, existen estudios que muestran una distinción genética en los mecanismos involucrados (Assunção *et al.* 2001, Bert *et al.* 2003, Macnair *et al.* 1999). Sin embargo, las especies tolerantes no son necesariamente indicadoras o hiperacumuladoras, ya que las plantas tolerantes no acumuladoras pueden excluir los metales de manera que no ingresen a los tejidos de las raíces. En estos casos las plantas pueden alterar la permeabilidad de la membrana, alterar la capacidad de sus paredes celulares de unir metales o exudar mayores cantidades de compuestos quelantes (Ghosh y Singh 2005). Algunos ejemplos de tolerantes-excluidoras son *Holcus lanatus* (Meharg and Macnair 1992a, 1992b), *Agrostis capillaris*, *Mimulus guttatus* y *Silene vulgaris* (Pollard *et al.* 2002).

1.5.2. Plantas indicadoras (acumuladoras). Son plantas indicadoras las que absorben y transportan los metales a los tejidos aéreos cuando incrementa la concentración en el suelo (Baker 1981). Estas plantas toleran la concentración de metal existente mediante la producción de compuestos quelantes, o alterando los patrones de retención mediante el almacenamiento de metales en partes poco sensibles a la toxicidad por metales (Ghosh y Singh 2005).

1.5.3. Plantas hiperacumuladoras. Son las que absorben grandes cantidades de sustancias tóxicas, usualmente metales y metaloides, en sus brotes durante su crecimiento normal y reproducción (Reeves 1992, Baker y Whiting 2002). En plantas senescentes la hiperacumulación representa el rompimiento de los mecanismos que regulan la homeóstasis del metal y por lo tanto no es un proceso del crecimiento normal de las plantas, sin embargo tal acumulación podría ser tecnológicamente útil. En los primeros estudios sobre hiperacumulación Brooks *et al.* (1977) definió como hiperacumuladoras de Ni a aquellas plantas que acumularan más de $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa seca en sus hojas. Posteriormente Baker y Brooks (1989) establecieron el umbral de concentración de MP en los tejidos secos de plantas para que éstas puedan ser consideradas como hiperacumuladoras del MP en cuestión, ver Cuadro 5.

Cuadro 5. Umbral de concentraciones de metales pesados en plantas hiperacumuladoras.

Metal	Concentración $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masa seca	Referencia
Ni	1000	Brooks 1977, Baker y Brooks 1989.
Cd	100	Baker y Brooks 1989.
Cu	1000	Baker y Brooks 1989.
Co	1000	Baker y Brooks 1989.
Pb	1000	Baker y Brooks 1989.
Zn	10000	Baker y Brooks 1989.
Mn	10000	Baker y Brooks 1989.

Los niveles definidos de estos elementos son de una concentración de un orden de magnitud mayor que aquellas encontradas en especies vegetales no acumuladoras (Salt y Kramer 2000). Las plantas hiperacumuladoras se han encontrado en 45 diferentes familias, con las mayores incidencias entre las Brassicaceae y las Asteraceae (Reeves y Baker 2000). Estas plantas son variadas, desde arbustos perenes y árboles a pequeñas herbáceas anuales.

1.6. FITORREMEDIACIÓN DE COBRE.

Como se mostró en la sección 1.4 a niveles superiores al óptimo: $6\text{-}12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de tejido vegetal seco, el Cu es altamente tóxico para las plantas ya que inhibe funciones enzimáticas y causa daño oxidativo. Debido a ello es difícil

encontrar plantas con capacidad de tolerar o acumular Cu. En las últimas décadas se han reportado plantas que acumulan e incluso hiperacumulan Cu, la mayoría de éstas en la República Democrática del Congo, en donde los suelos tienen elevada concentración de Cu. En el Cuadro 6 se muestran las familias vegetales reportadas como acumuladoras e hiperacumuladoras de Cu divididas por géneros y especies.

Cuadro 6. Plantas acumuladoras e hiperacumuladoras de Cu.

Género Especie	Concentración máxima (mg·kg ⁻¹)	Referencia
Amarantaceae		
<i>Pandiaka metallorum</i>	6270	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Celosia trigyna</i> L.	2051	Brooks <i>et al.</i> 1987
Asteraceae		
<i>Anisopappus chinensis</i> L.	1657	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Anisopappus davyi</i>	3504	Malaisse <i>et al.</i> 1994
<i>Gutenbergia pubescens</i>	5095	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Heliantus annuus</i> L.	Acumuladora	Baker y Brooks 1989
<i>Veronia petersii</i>	1555	Brooks <i>et al.</i> 1987
Azollaceae		
<i>Azolla filiculoides</i>	Acumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Brassicaceae		
<i>Brasica juncea</i> L.	Acumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Commelinaceae		
<i>Commelia zigzag</i>	1214	Morrison <i>et al.</i> 1980
Convolvulaceae		
<i>Ipoema alpina</i>	12300	Malaisse <i>et al.</i> 1979
Cyperaceae		
<i>Ascolepis metallorum</i>	1211	Malaisse <i>et al.</i> 1994
<i>Bulbostylis cupricola</i>	1523	Morrison <i>et al.</i> 1980
<i>Bulbostylis pseudoperennis</i>	7783	Brooks <i>et al.</i> 1987
Diopteridaceae		
<i>Athyrium yokoscense</i>	Acumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Euforciaceae		
<i>Monadenium cupricola</i>	1234	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Phyllanthus williamoides</i>	1140	Reeves <i>et al.</i> 1999
Hydrocharitaceae		
<i>Vallisneria americana</i>	Hiperacumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Ireidaceae		
<i>Gladiolus gregarius</i>	1412	Malaisse <i>et al.</i> 1994
Labiatae		
<i>Aeolanthus biformifolius</i>	9000	Morrison <i>et al.</i> 1979
Lamiaceae		
<i>Aeolanthus subacualis</i> var. <i>linearis</i>	13700	Brooks <i>et al.</i> 1980
<i>Aeolanthus homblei</i>	1113	Morrison <i>et al.</i> 1980
<i>Haumaniastrum katangense</i>	9222	Paton y Brooks 1995
<i>Haumaniastrum robertii</i>	2070	Paton y Brooks 1995
<i>Haumaniastrum rosulatum</i>	1089	Brooks <i>et al.</i> 1987
Lemnaceae		
<i>Lemna minor</i>	Hiperacumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Poacea		
<i>Rendlia altera</i>	1560	Malaisse <i>et al.</i> 1994

<i>Sporobolus congoensis</i>	1671	Malaisse <i>et al.</i> 1994
Pontederiaceae		
<i>Eichhornia crassipes</i>	Acumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
Pteridaceae		
<i>Actiniopteris</i> sp.	3535	Malaisse <i>et al.</i> 1994
Scrophulariaceae		
<i>Bacopa monnieri</i>	Hiperacumuladora	McCutcheon y Schnoor 2003
<i>Buchnera henriquesii</i>	3520	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Crepidorhopalon perennis</i>	9322	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Striga hermonthica</i>	1105	Brooks <i>et al.</i> 1987
Tiliaceae		
<i>Triumfetta dekindtiana</i>	1283	Brooks <i>et al.</i> 1987
<i>Triumfetta digitata</i>	1057	Brooks <i>et al.</i> 1987
Zygophyllaceae		
<i>Larrea tridentate</i>	1000	Baker y Brooks 1989

En plantas que han sido reportadas como acumuladoras e hiperacumuladoras de Cu, existe controversia en definir si acumulan Cu o no. Song *et al.* (2004), sugirieron que es necesaria más investigación para definir si los elevados niveles de Cu se deben a la acumulación o a deposiciones de Cu en las hojas, de las 37 especies reportadas como acumuladoras o hiperacumuladoras de Cu, principalmente aquellas del Congo en África. En este sentido, originalmente se creía que *Elsholtzia splendens* era una hiperacumuladora de Cu. Sin embargo, investigaciones posteriores concluyeron que era una exclusora así como *E. argyi* (Jiang *et al.* 2004), *Silene vulgaris* (Song *et al.* 2004) y *Mimulus quttatus* (Harper *et al.* 1998).

Yruela (2005), propone mecanismos celulares involucrados en la tolerancia de las plantas al Cu: i) la reducción en la absorción de metal mediante la acción de micorrizas o exudados extracelulares; ii) la estimulación de la desorción del metal en la membrana plasmática; iii) la quelación de los metales con fitoquelatinas, metalotioneínas, ácidos orgánicos; y iv) retención del metal en la vacuola.

1.7 MICORRIZA.

El término micorriza hace referencia a las simbiosis mutualistas que se establecen entre las plantas y ciertos hongos del suelo, siendo este tipo de simbiosis cosmopolita (Barea y Azcón-Aguilar 1983) por el número de plantas superiores que la forman, alrededor del 90% de las terrestres lo hacen con algún tipo de micorrizas (Smith y Read 1997). La razón principal de que esta simbiosis ha sido exitosa es que

mejora la nutrición mineral de la planta hospedera y aumenta el área de exploración del suelo (Simon *et al.* 1993; Redecker *et al.* 2000). Sin embargo no son las únicas ventajas de las micorrizas ya que también contribuyen a la protección a estrés biótico y abiótico (Van Tichelen *et al.* 2001, Azcón-Aguilar *et al.* 2002, Ruíz-Lozano 2003). Por su parte, la planta hospedera proporciona al hongo los compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis necesarios para su crecimiento.

1.7.1 Tipos de micorrizas.

De acuerdo a la estructura, al tipo de plantas y a los hongos implicados, se pueden distinguir 2 grandes grupos de micorrizas (ver Figura 5A):

- a) **Endomicorrizas:** son las más extendidas en la naturaleza y tienen como característica principal que sus hifas penetran en el interior de las células corticales y/o de la epidermis de la raíz. Otra propiedad es que no forman manto. Dentro de este grupo las más ampliamente distribuidas en las plantas terrestres son las micorrizas arbusculares.
 - o **Arbusculares.** Los hongos implicados en la formación de micorrizas arbusculares (HMA), pertenecen al phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.* 2001). La simbiosis la realizan con la mayoría de las plantas terrestres entre el 80 y el 85%, son cosmopolitas y se pueden establecer en suelos contaminados (Smith y Read 1997, Barea y Jeffries 1995, Brundrett *et al.* 1996). La principal característica morfológica de los HMA es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células corticales, para la formación de arbusculos, sus estructuras típicas de colonización vegetal. Algunas especies de estos hongos forman estructuras en el interior de la raíz llamadas vesículas que contienen sustancias de reserva y por las que también se les conoce como hongos vesículo-arbusculares. En la figura 5B se muestra el proceso de colonización de los HMA en las raíces de la planta hospedera.
- b) **Ectomicorrizas.** Estas simbiosis micorrízicas existen en especies de plantas con importancia forestal como: Fabaceae, Betulaceae, Pinaceae, etc. Se

caracterizan principalmente porque las hifas del hongo limitan su crecimiento a los espacios intercelulares de la corteza sin penetrar las células de la raíz y dan lugar a una “red de Hartig”. En el exterior el entramado de hifas que rodea la raíz se le llama manto (Smith y Read 1997). Los hongos que forman este tipo de micorrizas son basidiomicetos y algunos ascomicetos.

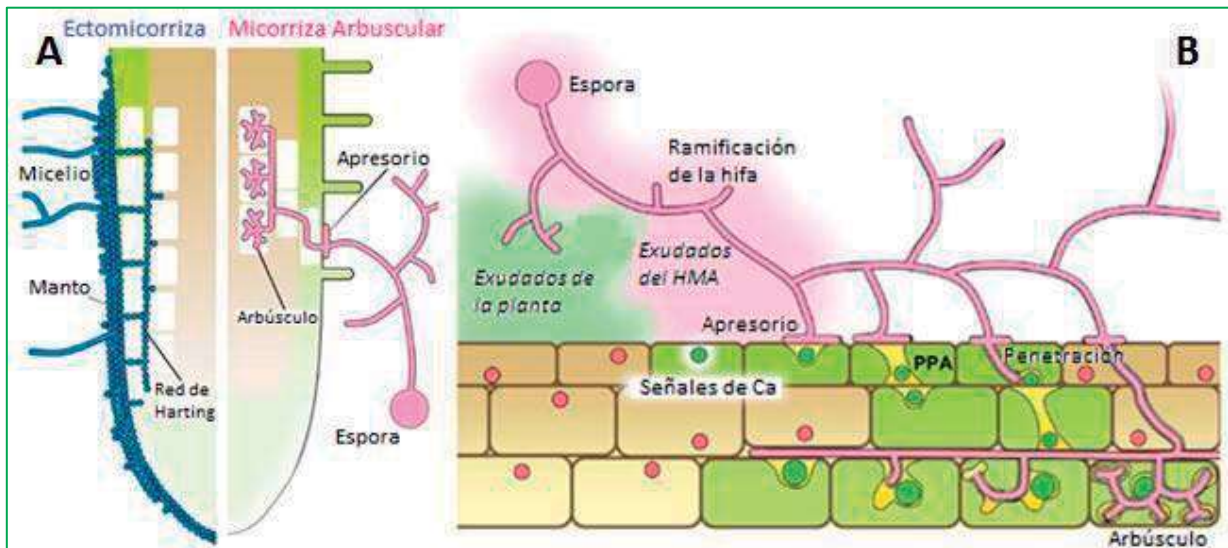


Figura 5 (A) Ilustración de las estructuras de colonización en ectomicorriza (azul) y micorriza arbuscular (rosa). El hongo ectomicorrízico rodea la punta de la raíz con un espeso manto piloso de hifas, mientras que la red de Hartig rodea las células epidérmicas. En la micorriza arbuscular la punta de la raíz normalmente no es colonizada. La hifa se desarrolla de una espora y produce un apresorio sobre la epidermis de la raíz. La colonización se produce intra e intercelular y culmina con la formación de arbusculos dentro de las células corticales. **(B) Resumen esquemático del proceso de colonización de raíces por HMA.** La germinación de la espora es seguida por la producción de una hifa germinativa. La percepción de los exudados liberados por la raíz de la planta hospedera induce la ramificación de la hifa incrementando la posibilidad del contacto directo entre los simbios. Mientras tanto los exudados del hongo son percibidos por la raíz, se desencadenan las señales de calcio a través de la activación de la vía SYM. La transducción de señal conduce a la activación de las respuestas celulares y transcripcionales (en verde células y núcleos). El contacto entre la planta y el hongo es seguido por la adhesión de un apresorio a la superficie de la raíz. Esto produce la formación de una apertura del citoplasma (en amarillo) en la célula endodérmica contactada y las subsecuentes células corticales. Esto es llamado aparato de prepenetración (PPA). Posteriormente la colonización intracelular sigue la ruta del PPA desde la epidermis a la corteza, entonces la hifa intercelular se puede desarrollar a lo largo de los ejes de la raíz. Eventualmente un arbusculo altamente ramificado ocupa la mayor parte del volumen de la célula con una superficie para el intercambio de nutrientes (Ambas modificadas de Bonfante y Genre 2010).

1.7.2 Los HMA en fitorremediación. Los HMA son importantes en la remediación de suelos contaminados con MP (Jamal *et al.* 2002). El micelio externo de los HMA permite una mayor exploración de volúmenes de suelo más allá de la zona la raíz, así promueve el acceso a mayores cantidades de MP en la rizósfera (Khan *et al.*

2005). Los MP absorbidos pueden almacenarse en las estructuras intra y extracelulares del HMA, y al mismo tiempo el HMA mejora la nutrición mineral de vegetales, la disponibilidad de agua y las propiedades de agregación del suelo. Esto permite el establecimiento y crecimiento de vegetales en suelos con elevada concentración de MP (Taylor y Harrier 2001, Auge 2001, Kabir y Koide 2000).

Los HMA existen en los suelos de la mayoría de los ecosistemas, incluye los contaminados. Varios autores reportan que HMA de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* se asocian con la mayoría de plantas que crecen en suelos impactados con MP, ahí se reporta que *Glomus intraradices* existe en suelos ricos en Zn, Cu, Pb, Ni y Cd (Raman *et al.* 1993, Sambandan *et al.* 1992). Para la adquisición de fosfatos $(\text{PO}_4)^{-3}$, micronutrientes, agua y el posterior transporte a su hospedera, los HMA, mejoran el estado nutricional de la planta hospedera. Similarmente, los MP son absorbidos por las hifas del HMA y transportados al vegetal. En algunos casos las plantas micorrizadas incrementan la absorción de MP y el transporte de la raíz a los brotes, mientras que en otros casos los HMA contribuyen a la inmovilización del metal en el suelo, promoviendo la fitoestabilización del MP.

Existen diversas estrategias de los HMA para inmovilizar el metal en el suelo; por secreción de compuestos, la precipitación de gránulos de polifosfato en el suelo, la adsorción en las paredes celulares del HMA y la quelación de metales dentro del hongo (Gaur y Adholeya 2004). La glomalina es un ejemplo de una glicoproteína producida y liberada por el HMA que se une al MP en el suelo (Gonzalez-Chavez *et al.* 2004). En el caso de HMA que forman vesículas en el interior de las raíces de la planta hospedera, se observa que las vesículas sirven como sitios de almacenamiento de MP (Turnau 1998, Weiersbye *et al.* 1999). El resultado de la colonización con HMA en la remediación de suelos contaminados depende de la combinación planta-HMA-MP y de las propiedades químicas y físicas del suelo. La figura 6 muestra los mecanismos de los HMA involucrados en la detoxificación de suelos contaminados por MP.

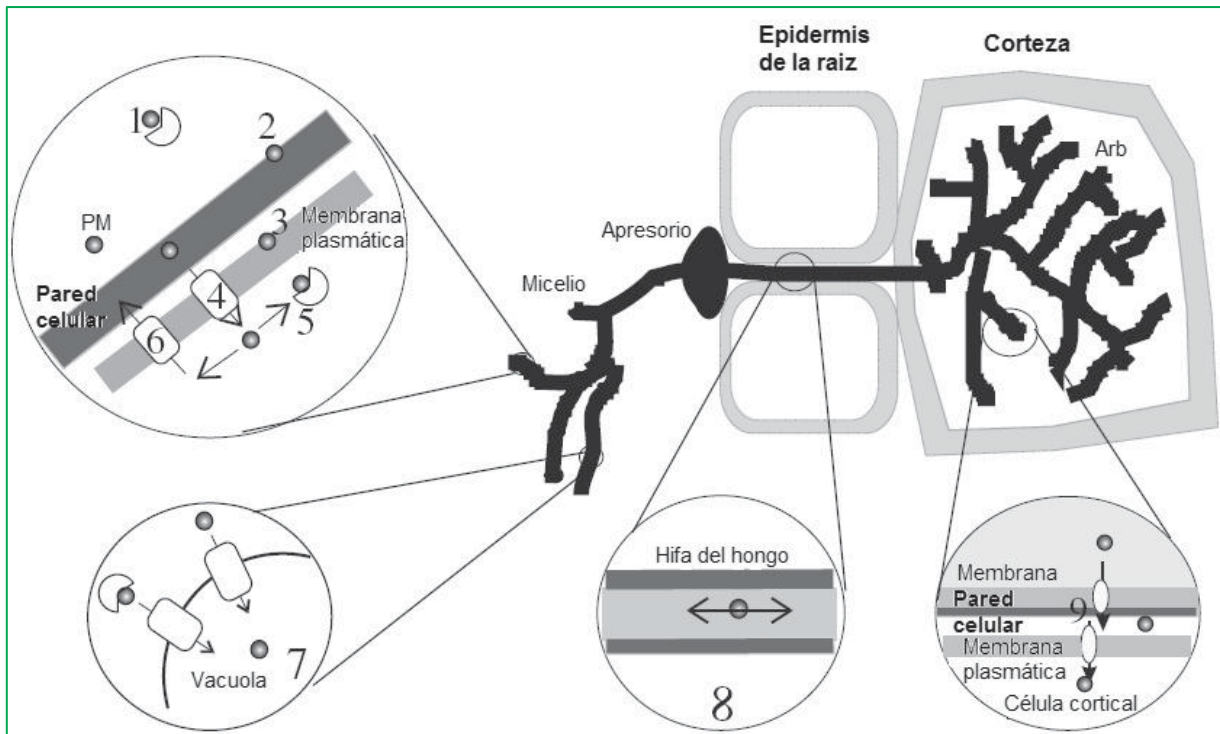


Figura 6. Mecanismos de detoxificación de HMA. 1 Secreción de agentes quelantes que se unen al metal en el suelo. 2 Unión de los MP a los componentes de la pared celular. 3 La membrana plasmática funciona como barrera selectiva. 4 Transportadores específicos y no específicos de membrana y canales (transporte activo y pasivo). 5 Compuestos quelantes en el citosol: metalotioneínas, ácidos orgánicos, amino ácidos y chaperonas. 6 Desorción a través de transportadores específicos y no específicos: transporte activo y pasivo. 7 Retención de los MP en las vacuolas. 8 Transporte de MP a través de las hifas del HMA. 9 Entrega del metal en los arbusculos (Modificada de Göhre y Paskowski 2006).

La importancia de los HMA en remediación de suelos contaminados por MP ha sido investigada (Gaur y Adholeya 2004, Khan, 2005). Existe abundante literatura sobre los efectos de los HMA en plantas bajo estrés de MP pero son contradictorias y ampliamente variadas (Khan 2005). Un mayor conocimiento de la tolerancia de plantas y HMA al estrés metálico ha definido parámetros valiosos para mejorar la FR. La utilidad de los HMA en remediación de suelos es importante en la agricultura sustentable, su aplicación es útil para superar problemas con MP, disminuir el estrés metálico e incrementar la producción agrícola. En numerosos casos los HMA son una barrera contra la transferencia de iones de MP de las raíces a los brotes. Mientras en otros casos la protección por los HMA y el incremento en su capacidad de absorción del metal y nutrientes minerales, y el transporte de estos a la planta hospedera,

generan una mayor producción de biomasa, una de las metas principales en FR (ver Figura 7).

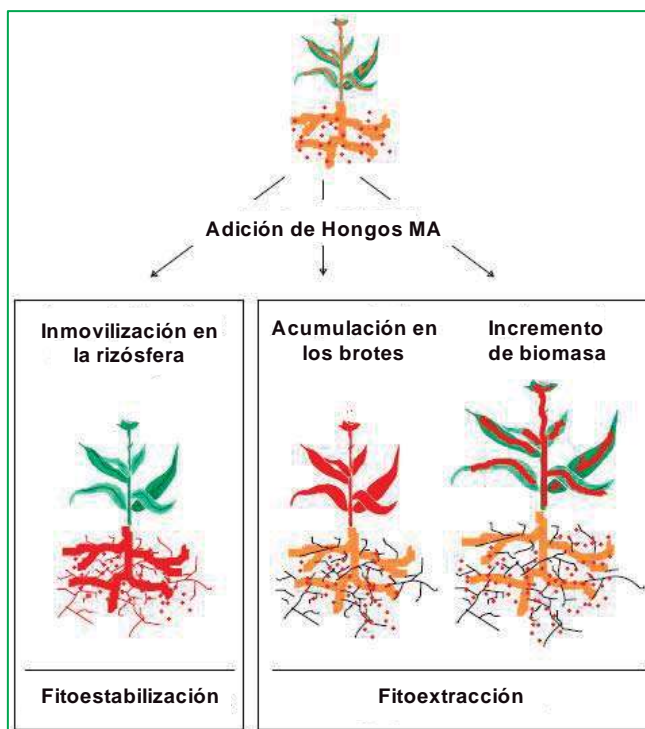


Figura 7. Contribución de HMA en FR de MP. Parte superior: Planta no micorrizada en un suelo contaminado con MP. Panel izquierda: Mejoramiento de la estabilización de MP en el suelo en colonización micorrízica. Se favorece la fitoestabilización. Panel derecha: Incremento en la absorción y transferencia de MP a los brotes (planta de la izquierda) y aumento en la producción de biomasa como resultado de la mejora en la nutrición por el HMA. Esto conduce a mayor remoción del MP del suelo (planta de la derecha); benéfico para la fitoextracción (puntos rojos: MP en el suelo; naranja o rojo: partes de la planta o del HMA a bajas y altas concentraciones de MP respectivamente) (Modificada de Göhre y Paskowski 2006).

1.8 *Tagetes erecta* L.

La familia Asteraceae (Compositae) es una de las más distribuidas en el mundo, aunque su mayor diversidad se ubica en el continente americano. México es un centro de diversidad de muchas de las tribus que conforman la familia Asteraceae. Ubicado en la tribu Tageteae, el género *Tagetes* se compone de 55 especies, de las cuales, la especie más popular es *T. erecta* conocida como cempasúchil, cempoaxóchitl, flor de muerto o zempoal (ver figura 8). El cempasúchil es nativa de México y se emplea tradicionalmente con fines ceremoniales durante las festividades del “Día de Muertos”. Los principales Estados productores de

cempasúchil son San Luis Potosí, Guanajuato, Chiapas, el Estado de México, Puebla, Sinaloa, Tlaxcala y Veracruz (Serrato-Cruz 2004, Chi Manzanero *et al.* 2002).



Figura 8. Flor de *T. erecta* (cempasúchil)^{[2][3]}.

1.8.1 Características morfológicas del cempasúchil.

Cempasúchil es una herbácea alta 100-120 cm con tallos erectos poco ramificados, glabros, y hojas color verde oscuro, opuestas en la parte inferior, alternas en la parte superior, punteadas de glándulas oleíferas translúcidas que emanan un olor acre. Las hojas son pinnadas-compuestas, largas 3-20 cm, con 9-20 hojas de lineares a lanceoladas, largas 1-3 cm y anchas 0,3-1,5 cm, con ápices acuminados y márgenes dentados. Las inflorescencias terminales, generalmente única, de 5-13 cm de diámetro sobre un pedúnculo largo 2-12 cm, son los típicos capítulos de las Asteraceae constituidos por una multitud de flores sésiles insertadas en espiral sobre una base redondeada, el receptáculo, circundada por un involucreo campanulado, largo 1-2,5 cm y ancho 0,5-1,5 cm, constituido por una serie de brácteas unidas entre ellas recorridas por dos filas de glándulas cada una (Rzedowski y Rzedowski 2001).

1.8.2 Usos del cempasúchil.

Desde la época prehispánica se ha utilizado al cempasúchil como planta medicinal; las comunidades indígenas y mestizas la emplean para curar variados padecimientos. Sin embargo, pocas son las evidencias científicas de la efectividad de esos tratamientos tradicionales. Aunque sí se tiene información de que *T. erecta* es efectiva contra infecciones dermatomucosas causadas por hongos y las soluciones acuosas de inflorescencias secas de *T. erecta* se usan para algunos tipos de úlceras en los ojos (Serrato-Cruz 2004).

En la agricultura el cempasúchil se puede aplicar como abono orgánico para suelo de cultivo ya que mejora su calidad y su actividad nematicida (Kimpinski *et al.* 2000, Ploeg 1999, Sipes y Arakaki 1997). El tiofeno llamado α -terpeinilo, es un compuesto sulfurado abundante en los tejidos de *T. erecta*, el cual tiene actividades fungicidas, insecticidas, antivirales y citotóxicas (Bakker *et al.* 1979; Hasan 1992).

Las inflorescencias de *T. erecta* constituyen una fuente de carotenoides, pigmentos utilizados como colorantes en la industria alimenticia. El 90% de los pigmentos de las inflorescencias de *T. erecta* son xantofilas, de las cuales a luteína es la más abundante con un 64% y el producto de mayor valor económico, por lo que algunos estudios se han enfocado en la obtención de este pigmento (Gregory *et al.* 1986, Chi Manzanero *et al.* 2002).

1.8.3 Aplicaciones de *T. erecta* en fitorremediación.

Existen investigaciones que demuestran la capacidad de *T. erecta* como una planta acumuladora de Cd (Uraguchi *et al.* 2006, Bosiacki 2008), Pb (Bosiacki 2009a, 2009b) y moderadamente Ni con un factor de bioconcentración (FBC) de 1.64 (Malarkodi *et al.* 2008). Bosiacki (2009b) reporta que inclusive bajo condiciones de estrés con Cd *T. erecta* incrementa su biomasa al mismo tiempo que aumenta la absorción del metal. Esto hace a *T. erecta* una planta de interés en la investigación de biorremediación de suelos contaminados con MP.

1.8.4 *T. erecta* en simbiosis con HMA.

Existe literatura sobre la simbiosis micorrízica de *T. erecta* y HMA. Gaur y Adholeya (2005), observaron que *T. erecta* es micorrizada con *Glomus intraradices* con una colonización máxima de 73.6%. Mientras que Linderman y Davis (2004), encontraron un 59% de colonización para la simbiosis *T. erecta*-*G. intraradices*, ahí las estructuras mayoritariamente observadas fueron arbusculos. También se ha documentado el aporte de la micorrización de *T. erecta* con HMA en condición de agobio hídrico (Zepeda-Guzmán *et al.* 2010, Asrar y Elhindi 2011). Sin embargo existen escasos reportes sobre la simbiosis *T. erecta*-HMA en la absorción de MP. Liu *et al.* (2011) reportan que la inoculación con HMA ayuda al crecimiento de *T. erecta* al mismo tiempo que tolera el estrés causado por Cd.

Por todo lo anterior, resulta interesante analizar el aporte de la simbiosis *T. erecta*-HMA en la acumulación de MP esenciales, como el Cu.

1.9 JUSTIFICACIÓN

La información disponible sobre los mecanismos de retención de Cu por plantas en asociación con HMA, indica que el Cu se adhiere por adsorción a los sitios con carga negativa de la pared celular o de la membrana plasmática de las células de la raíz y de manera similar a las estructuras fúngicas intracelulares como micelio y vesículas. En las raíces vegetales, una pequeña cantidad de Cu ingresa al citoplasma de las células corticales por procesos activos o pasivos y entra al xilema por el simplasto. El exceso intracelular de Cu en planta y HMA es retenido en las vacuolas.

Dada la importancia de la adsorción en los sitios de unión afines al Cu y puesto que la adsorción es un fenómeno superficial, es de esperar que el aumento en el área superficial intraradical expuesta al Cu biodisponible incrementará la concentración de Cu en la raíz y en la planta (C_p). Se sabe que las estructuras intraradicales de los HMA incrementan el área superficial en la raíz (Göhre y Paszkowski 2006), por lo que es lógico suponer que el sistema *T. erecta*-*G. intraradices* aumente C_p . Sin embargo, si el micelio extraradical es extenso y

ramificado habría una partición del Cu entre las partes intraradical y extraradical de los simbiontes que tendrá un efecto hasta ahora desconocido en la concentración de Cu en la raíz. Esto se puede dilucidar mediante una experimentación cuidadosa, lo que ayudará a responder la pregunta ¿*T. erecta* es útil en la FR de Cu cuando es micorrizada por *G. intraradices*?

CAPÍTULO 2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS

La colonización de raíces de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) por *Glomus intraradices* incrementa la fitoacumulación de Cobre insoluble.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta macrofisiológica (C_p) de *Tagetes erecta* colonizada por *Glomus intraradices*, a concentraciones de óxido de cobre (II) en sustrato artificial.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Analizar parámetros fisiológicos de la planta en función del estrés metálico y la colonización de las raíces con *G. intraradices*.
- Análisis del efecto de la colonización de *T. erecta* por *G. Intraradices* en el pH de la rizosfera y la solubilidad del CuO en el sustrato.
- Análisis de la distribución del Cu en los tejidos de la planta (raíces y partes aéreas).
- Simular los datos de concentración de Cu en tejidos con un modelo de respuesta eco-fisiológica al estrés metálico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3

The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper(II) and its implications for phytoremediation.

OS Castillo, N Dasgupta-Schubert, CJ Alvarado, EM Zaragoza y HJ Villegas.

New Biotechnol. (2011), doi:10.1016/j.nbt.2011.05.009



The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper(II) and its implications for phytoremediation

O.S. Castillo, N. Dasgupta-Schubert, C.J. Alvarado, E.M. Zaragoza and H.J. Villegas

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana (UMSNH), Ciudad Universitaria, Morelia, C.P. 58060, Michoacán, Mexico

Phytoremediation is an environmental biotechnology that seeks to remediate pollution caused by bioaccumulative toxins like copper (Cu). Symbiotic mycorrhizal associations can increase the uptake and delivery of low mobility nutrients and micronutrients to the host plant because they solubilize these substances and increase their catchment area. To analyze the effect of mycorrhizae on the phytoaccumulation of Cu, we studied their ability to solubilize Cu(II) and enhance its absorption by the plant *Tagetes erecta* L. colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Plants were grown for nine weeks in a growth chamber under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod. Cu was added in the insoluble form of CuO to simulate the insoluble Cu–O affixed species in soil. The biotic and abiotic parameters of colonization, foliar area, biomass and the pH of leachates were determined as functions of the Cu concentration that was measured in the roots, shoots and leachates by AAS. The results of Cu absorption showed that the colonized plants accumulated more Cu in the roots as well as the whole plant and that both the colonized and non-colonized plants displayed the typical behavior of Cu excluders. Mycorrhizal colonization of the roots resulted in a proliferation of vesicles and this was observed to scale with root tissue Cu concentrations. Also, the *G. intraradices*–*T. erecta* system displayed a higher resistance to the toxicity induced by Cu while nonetheless improving the indices of phytoaccumulative yields. These results suggest that *G. intraradices* possibly accumulates Cu in its vesicles thereby enhancing the Cu tolerance of *T. erecta* even while increasing root Cu accumulation. The parameters of bioconcentration factor and translocation factor measured in this work suggest that the system *T. erecta*–*G. intraradices* can potentially phytostabilize Cu in contaminated soils.

Introduction

Copper is classified as a persistent bio-accumulative environmental toxin [1a]. Its beneficial role as an essential micronutrient to all living organisms [1b] is reversed to that of a toxin at high environmental concentrations of the metal. The anthropogenic discharge of Cu into the environment is ubiquitous given its use as a biocide and in various metallurgical industries [2]. Phytoremediation is an emergent environmental biotechnology [3,4] that uses metalophilic or metal toxicity resistant plants, to remediate the environment

of heavy metal (HM) contamination. In most normal plants at concentrations higher than 20–30 mg kg⁻¹ dry shoot, Cu becomes a serious toxin, inhibiting plant growth, impairing the functioning of chromatin and of the photosynthetic apparatus [5,6]. Most Cu-tolerant plants are the so-called metal excluders (ME) [7] that are characterized by a preferential accumulation of the Cu in the root while its transport to the shoot is suppressed. However, to quantify the metal tolerance of the plant as well as to probe the systemic mechanism of Cu uptake, it becomes necessary to determine the concentrations of Cu in the different morphological tissues (C_p) over a range of environmental Cu concentrations (C_s) that is

Corresponding author: Dasgupta-Schubert, N. (nita@ifm.umich.mx)

sufficiently large to be of interest to the suite of phytoremediation technologies [8]. In this work the substrate concentration (C_s) range covered is 0 (control) to 2500 mg Cu kg⁻¹ dry substrate.

Cu in contaminated substrates usually presents itself as a species of low mobility, generally found adsorbed onto negative sites of substrate minerals and organic matter, such as those containing the electronegative oxygen [9]. Many laboratory dose–response studies however, use dissolved Cu, which does not truly simulate the geochemistry of Cu contaminated soil [10]. Furthermore, it obscures the study of the role of rhizospheric entities or processes such as root exudates and root–microorganism symbiosis in the solubilization of the immobile Cu to render it phytoavailable. In this work, the insoluble copper (II) oxide, CuO, where the Cu is affixed by direct chemical bonding to oxygen, is used as the source of soil Cu. Using such a form of Cu and the combination of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus *G. intraradices* with the plant *Tagetes erecta* L., this work seeks to observe the root–mycorrhizal symbiotic process in the solubilization and subsequent phytoaccumulation of Cu via the plant's C_p – C_s profile, as well as the impact of high Cu concentrations on plant foliar area (FA), dry biomass yields (B_p) and root colonization by the fungus. The rationale behind the choice of this plant–AM fungus system is laid out in the following.

In most non-hyperaccumulating plants, HM stress occasioned by high C_s causes a reduction in plant dry biomass [11]. This affects the magnitude of the mass of metal sequestered by the plant, M_p , because it is a product of C_p and B_p . M_p is an important index in phytoremediation and is used to quantify its yield. By contrast, it is known that symbiotic AM associations can enhance the plant's endurance to several environmental stresses [12]. This is in part because they can increase the uptake and delivery of macro- and micro-nutrients including low mobility ones, to the host plant through the increased solubilization of these substances and the increase of their catchment area. Thus it is possible that root colonization by an appropriate AM fungus could enhance the delivery of Cu to the plant root while protecting plant vigor through the supply of nutrients. Such an association may or may not explicitly increase B_p , but could nonetheless enhance M_p through the combined product of C_p and B_p at a higher C_s value than that endured by a non-inoculated plant. Although there exists extensive literature on the effects of AM colonization on plants under HM stress, there are also contradictory observations and a wide variation in results [13,14]. Moreover, relatively little has been studied on the role of AM fungi in the conferment of Cu tolerance to the host plant and its role in Cu phytoremediation [15]. *G. intraradices* is considered to be more tolerant of HM than other AM genotypes [13]. Glasson *et al.* [16] have shown that different grasses colonized by *G. intraradices* were best able to accumulate arsenic, cadmium, lead, selenium and zinc as compared to the colonization by other types of AM fungus.

T. erecta L. (*Asteraceae*), common name Mexican marigold, is a plant native to Mexico and Central America with ample commercial value in these regions. Its features of rapid growth, adequate biomass, well known property as an AM host and the support of studies that have demonstrated its capability as an accumulator of Cd [17,18], Pb [19] and moderately of Ni with a bioconcentration factor (BCF) of 1.64 [20], make it attractive as a plant for the study of the *G. intraradices* assisted phytoremediation of Cu (BCF is defined as the ratio of C_p to C_s).

Materials and methods

Biological material

Seeds of *T. erecta* (2008 batch) were obtained from the nursery and seed company, Rancho Los Molinos S.A de C.V (Mexico City, Mexico). Before germination, the seeds were surface sterilized by shaking with a solution of 1% (v/v) NaClO for ten minutes and subsequently by washing four times with 20 ml of distilled water for 20 min. The inoculation of the seedlings with the AMF was performed by adding 1 ml of an aseptic suspension of spores of *G. intraradices* at the concentration of approximately 50 spores ml⁻¹ (with a viability of 90%) obtained from an *in vitro* culture [21]. The spore viability had been determined according to the method described by An and Hendrix [22].

Substrate

The substrate employed in this work was a mixture of expanded perlite (Hortiperl[®], Termolita S.A. de C.V. Mexico) and peat moss (Premier[®], Premier Horticulture Inc. Quakertown, PA, USA) in the ratio of 2:1 by volume. The perlite was passed through appropriate sieves and divided into the sets of one with particle size > 2000 μm and another with particle size between 1000 μm and 2000 μm, before the mixing. The peat moss was dried for 48 h under an infrared lamp (250 W, Osram[®]). The substrate mixture was sterilized two times at 121°C and 103.42 kPa for 20 min, before being used in the seedling nursery and in the plant pots. Cu was added to the substrate before its sterilization in the form of the insoluble CuO (J.T. Baker[®] 1814-50) and divided into separate sets with the concentrations of 0 (Control), 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 mg kg⁻¹.

Plant growth

T. erecta was germinated and grown in the dark in the sterilized substrate contained in a plant nursery and till the first shoots appeared (day 10) after which growth in light was continued till day 15. The seedlings were then transferred to the sterilized substrate filled column pots (volume 300 ml, height 20 cm) in a plant growth chamber. Only robust seedlings of an average height of 3.0 cm were transplanted. The inoculation of the *T. erecta* seedlings with *G. intraradices* was carried out at the moment of transplantation in the manner described in the foregoing. The experimental design consisted in all of 12 treatments each with 5 replicates (60 plants in total). The 12 treatments were divided as 6 with inoculated plants and 6 with non-inoculated plants where the 6 refers to the 6 Cu concentrations of the substrate described before. *T. erecta* was grown for nine weeks in a growth chamber under controlled conditions of temperature (25 °C), relative humidity (60%) and photoperiod (16 h light-8 h dark). Plants were irrigated daily with 20 ml of distilled water and fertilized once per week with the Long-Ashton nutrient solution in which nitrogen had been added in the form of nitrate (Ca(NO₃)₂, 2 mM) [23]. During the plant growth the substrate was maintained at field capacity of irrigation [24] which was achieved daily by irrigating till a volume of 20 ml for the leachate, collected below the column, was reached. This 20 ml collected from each pot was returned to the pot daily as a component of the irrigation and removed at the same time every week for the measurement of pH. The cumulatively collected leachate at the end of the experiment was analyzed for its dissolved Cu content and its value of the pH was also measured.

Experimental data and chemical analysis

Nine weeks after the transplantation, the plants were harvested and cleaned. Immediately afterwards, the fresh weights and foliar areas were measured. The foliar area was determined using the standard method of digital image analysis using the software SIDELOOK® [25]. Root sub-samples from randomly selected specimens of the inoculated plants were taken and preserved in a solution of 50% (v/v) ethanol at a temperature of 3°C for the subsequent staining and the determination of the percentage of root colonization. Later, the residual root portions, the root specimens not selected for the estimation of fungal colonization and the shoots were dried in the oven (Shell Labs® CEF5) at 60°C for 72 h and the dry weights of plant parts determined. Dried plant parts were ground using the plant grinder Thomas Scientific® 3383L10 and later sieved (mesh size 40). Dried powders of plant tissue (aerial parts and roots) were weighed and then digested according to the protocol USEPA SW-846 Method 3050B [26]. Substrate leachates were centrifuged (Damon IEC HN.SII) at 4000 rpm for 45 minutes and later filtered using Whatman™ 41 filter paper. The pH of the leachates was measured weekly (pH meter, Accumet® AB15). The values reported in this work, however, are those for the leachate volumes combined cumulatively at the end of the experiment. The Cu concentrations in the roots, shoots and leachates were measured by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) using a PerkinElmer 3100 spectrometer. Method blanks and spikes were run with each analytical batch and were found to be within general guidelines for validating the analytical data. Root staining and the analysis of the percent colonization of the inoculated roots were done using the protocols described in [27,28] respectively. To determine the percentage of colonization, the protocol described in [28] was followed whereby per plant, 10 segments of the stained root, each approximately 10 mm in length, were randomly selected. The segments were mounted on slides and examined under an optical microscope (Leica DM750) with a magnification (objective) of 40x. Each segment was scanned in steps of 2 mm for the presence or absence of fungal structures (arbuscules, mycelia, vesicles), so that in all 50 observations were obtained per plant, using which the percentage of colonization was defined for the given plant and subsequently for each Cu treatment. To check for cross-contamination of the non-inoculated plants by the AM fungus, individual root sub-samples of these plants were also randomly selected and examined analogously for fungal structures. No significant cross-contamination was detected.

Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) and the determination of significant differences (T-test) of the results were made with the software Assistat Statistical Program version 7.5.

Results and discussion

Mycorrhizal colonization of the root

Figures 1–9 and Table 1 show the results obtained in this work. From Fig. 1 it is apparent that the mycorrhizal colonization of the roots of *T. erecta* increases, in fact dramatically so, with the increase of C_s . Chen *et al.* [29] have observed that the sequestration of lead (Pb) in roots was correlated with the increase of the number of fungal vesicles in highly colonized species. The prevailing opinion

TABLE 1

Values of the shoot translocation factor (TF) and the plant bioconcentration factor (BCF) corresponding to the inoculated and non-inoculated treatments

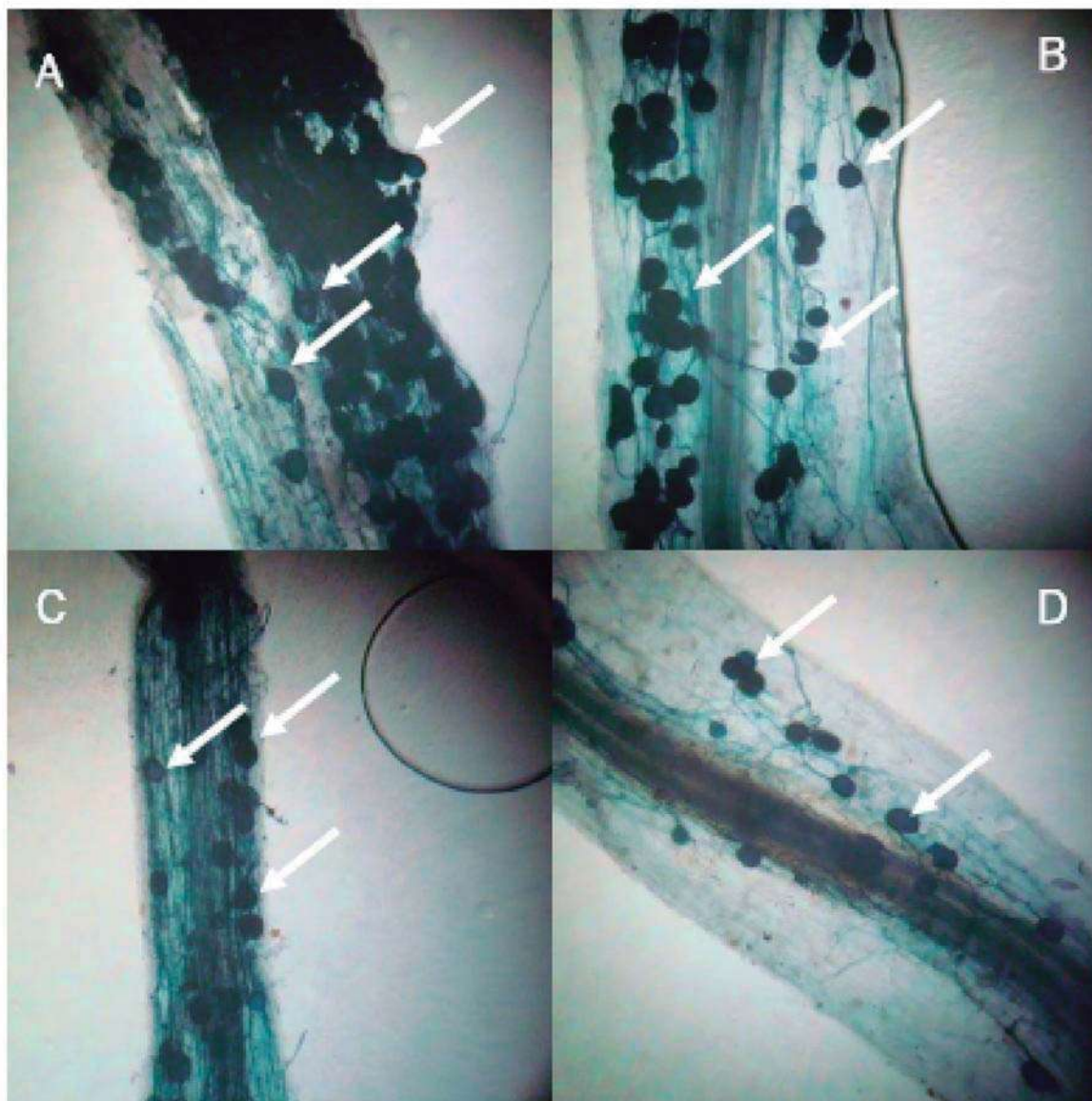
Cu in substrate (mg kg ⁻¹)	TF	BCF
<i>T. erecta</i> non-inoculated		
500	0.021 ± 0.008	0.070 ± 0.021
1000	0.016 ± 0.002	0.062 ± 0.003
1500	0.019 ± 0.011	0.075 ± 0.029
2000	0.029 ± 0.002	0.104 ± 0.043
2500	0.221 ± 0.041	0.110 ± 0.000
<i>T. erecta</i> inoculated		
500	0.074 ± 0.035	0.152 ± 0.017
1000	0.059 ± 0.003	0.153 ± 0.028
1500	0.050 ± 0.004	0.110 ± 0.011
2000	0.023 ± 0.005	0.126 ± 0.022
2500	0.012 ± 0.001	0.125 ± 0.028

[13,29] is that fungal vesicles may be involved in storing toxic compounds and thereby could provide an additional mechanism of detoxification, in a manner analogous to plant and fungal vacuoles. Figure 1 therefore leads one to expect that the root concentration of Cu in *T. erecta* would be higher in the colonized plant as compared to the non-colonized one. This is borne out by the C_p – C_s profiles as discussed in the following.

C_p – C_s profiles

Figs 2–4 show the C_p – C_s profiles of the root, the aerial part and the whole plant. For the root the C_p of the inoculated plant is consistently higher than for the non-inoculated one. Given the relevance of the high C_s values in phytoremediation, it can be seen from Fig. 2 that at C_s values ≥ 2000 mg kg⁻¹, the average improvement of C_p between the colonized and non-colonized roots is approximately by a factor of 1.34 while for the whole plant it falls to a value of ~ 1.20 . These values, especially for the root, are substantially high. This is a consequence of the well-known ability of AM fungus to aid the delivery of mineral solutes to plants [30]. The external mycelia of the *G. intraradices* augment the dissolution of the Cu in the medium and aid its subsequent uptake by the root of *T. erecta*. Evidence in the literature indicates that (in the presence of high ambient Cu concentrations) Cu in the roots is mainly fixed in the apoplast where it attaches itself to the negatively charged components of the cell walls [31,32]. It has been suggested in previous work [33] that the AM fungus employs a similar mechanism, among others (see below), to detoxify the HM: passive adsorption onto high affinity components such as chitin in the fungal cell walls leads to the sequestration of the HM with the result that HM-tolerant fungi demonstrate a two to four times higher affinity for the HM than root cells [33]. Fungal cellular structures within the root, such as the hyphae, present an extensive surface area even though the vesicular–arbuscular mycorrhizae are known to contribute not more than 10% of the root weight [30]. Dasgupta-Schubert *et al.* [34] have employed a systems-biology and population-dynamics inspired model to show quantitatively the connection between the extra and intracellular metal binding sites (which scale with the surface area) of ME type plants, and HM, particularly Cu, phytoaccumulation.

The transport of the HM (in this case, Cu) to the aerial parts can occur through apoplastic or symplastic *vias* although the latter, is

**FIGURE 1**

Images of the colonized roots of *T. erecta* grown in the substrate with the Cu concentrations (C_s) of 2500 (a), 2000 (b), 1500 (c) and 1000 mg kg^{-1} (d). The white arrows show the vesicles. The percentage mycorrhizal colonization at the aforesaid C_s values are 100.0 ± 0.0 , 94.7 ± 5.0 , 56.7 ± 36.0 , and 30.7 ± 18.0 , respectively.

considered to be more efficient [10]. To enter the xylem the HM must cross the Casparian strip or pass through the cells of the endodermis where it would have to cross the plasma membrane. Specific and non-specific molecular transporters and pores for Cu are required to facilitate trans-membrane transport utilizing active or passive transport mechanisms involving the chemical potential of the Cu species, while the passage of the metal across the cytosol is aided by agents such as protein (e.g. metallothioneins), organic acid etc., chelators [10,13]. It is clear from Fig. 3 that for the non-inoculated *T. erecta*, xylem loading is strongly inhibited resulting in C_p values much lower than those of the root. Consequently, the shoot translocation factor, TF ($= C_p(\text{aerial part})/C_p(\text{root})$) is <1 (Table 1). *T. erecta* therefore is not a Cu metal hyperaccumulator (MHA) but rather a Cu ME plant which preferentially sequesters Cu

in the root, thus protecting its sensitive photosynthetic organs from Cu toxicity. At the maximal C_s value of 2500 mg kg^{-1} , Fig. 3 shows that the C_p increases suddenly. This could be due to the stress caused to the Cu regulatory processes and/or features such as membrane permeability [15] in the root endodermal cells by the high chemical potential of the Cu in the cortex, resulting thereby in high xylem ingress. The interesting feature at this C_s value is that the $C_p(\text{aerial part})$ is about an order of magnitude greater than the maximum Cu concentrations tolerated by normal plants (see the 'Introduction' section). Although toxicity effects showed up as reduced plant vigor, the fact that the plant was able to survive demonstrates the resistance of *T. erecta* L. to high ambient Cu contamination.

In the *G. intraradices* inoculated *T. erecta* case, Fig. 3 shows that C_p is higher by a factor of maximally ~ 7 over the non-inoculated

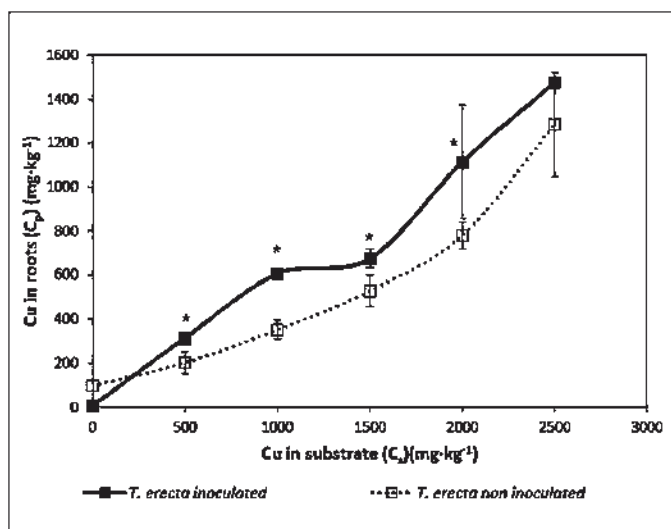


FIGURE 2

Plots of the concentration of Cu in the substrate (C_s) versus the concentration of Cu in the roots (C_p) for the inoculated and non-inoculated treatments. Each result is the average over 5 independent replicates. The asterisks mean significant differences by the *t*-test, $P < 0.05$.

plant at C_s values $< 2000 \text{ mg kg}^{-1}$. This is considerably higher than the equivalent case for the root. It illustrates the enhanced delivery of nutrients to the aerial part mediated by the AM fungus. Although the exact mechanism to date is still not clear, it is believed that nutrients, including in this case Cu, may leak out of the intact arbuscles and enter the plant cell via active or passive transport in a manner more or less analogous to the process for plant cells described in the preceding [13,30]. Plant cell-to-cell transport from the cortex to the xylem then takes over. By contrast, at high C_s values ($\geq 2000 \text{ mg kg}^{-1}$) the C_p of the inoculated plants falls, so much so as to be less than the values for their non-

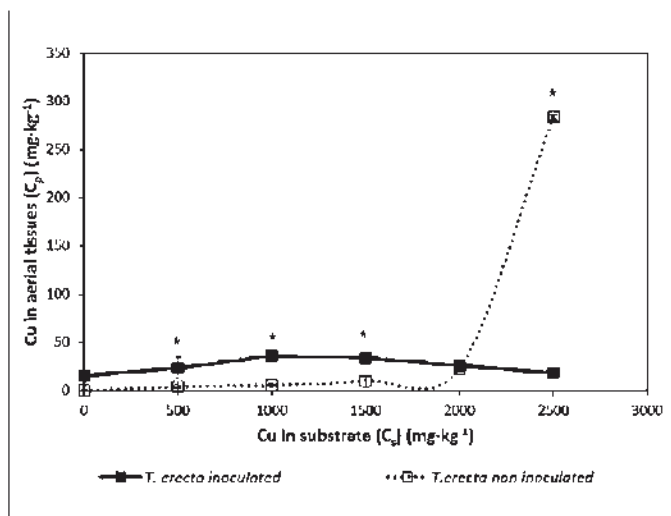


FIGURE 3

Plots of the concentration of Cu in the substrate (C_s) versus the concentration of Cu in the aerial parts (C_p) for the inoculated and non-inoculated treatments. Each result is the average over five independent replicates. The asterisks mean significant differences by the *t*-test, $P < 0.05$.

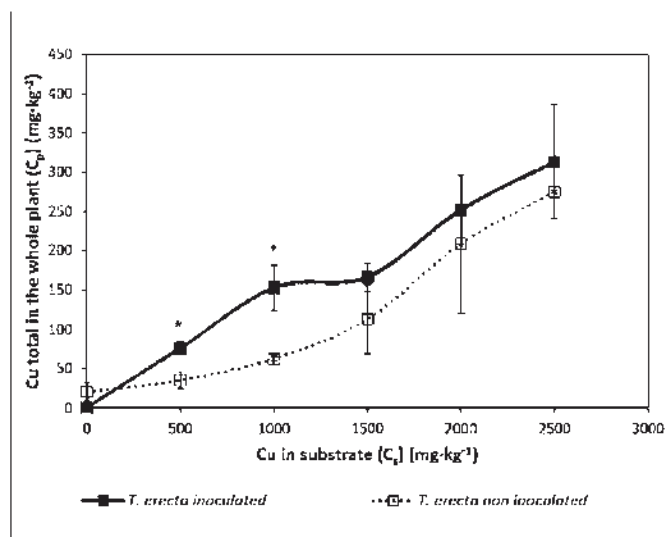


FIGURE 4

Plots of the concentration of Cu in the substrate (C_s) versus the concentration of Cu in the whole plant (C_p) for the inoculated and non-inoculated treatments. Each result is the average over five independent replicates. The asterisks mean significant differences by the *t*-test, $P < 0.05$.

inoculated counterparts. This illustrates clearly the participation of the fungus in regulating toxic Cu delivery and maintaining Cu homeostasis in the symbiotic system. At high values of C_s , the intraradical cells of *G. intraradices* serve as a 'barrier' to the sudden 'flooding' of the xylem by the Cu species which takes place for the non-inoculated plants. Physically, the inoculated plants even at such high C_s values appeared to be more vigorous than their non-inoculated counterparts. It is believed that the fungus employs similar strategies as its host for the cellular transport and detoxification of the HM [13,14]. In addition to affixation to cell wall sites alluded to in the preceding, these may include (a) the sequestration of the Cu in the vacuoles of the intraradical mycelium using agents such as the aforesaid chelators, (b) the metal may be exported out of the mycelium via specific or non-specific transporters in a passive or active way and (c) the increase of the number of vesicles that can sequester the HM. In view of the great increase of the number of vesicles (Fig. 1) and similar reports by other workers [29], vesicular sequestration probably plays the dominant role in the *G. intraradices* mediated protection of the aerial parts of *T. erecta* at high ambient Cu concentrations. Since at these high C_s values the net root C_p did not decrease, the Cu efflux process of (b) if significantly operative, would discharge the Cu to fungal or plant binding sites within the root. The discussion of this section is captured in a nutshell by the TF values for the inoculated plant shown in Table 1. The values steadily fall in response to increasing C_s indicating the regulation of Cu transport to the aerial parts by *G. intraradices*.

Figure 4 shows the C_p - C_s profile for the whole plant. This follows the pattern for the root, although depressed in amplitude by approximately an order of magnitude. This is because the major concentration in the root drives the profile for the whole plant but the much higher biomass of the aerial part weighs down the contribution. The BCF values for the whole plant shown in Table 1 are all < 1 in contrast to a MHA plant for which BCF is $\gg 1$.

However, it is nearly two times greater for the inoculated plants as compared to the non-inoculated ones. Thus, the ME plant *T. erecta* symbiotically colonized by the AM fungus *G. intraradices*, could be a useful plant for future studies on the feasibility of the phytostabilization of Cu in contaminated soil.

Substrate leachate pH and dissolved Cu concentrations

Figures 5,6 show the pH of the leachate solutions and the concentrations of dissolved Cu with respect to the concentrations of the individual Cu treatments to the substrate, for *T. erecta* grown with and without the inoculation with *G. intraradices*. The solutions correspond to the cumulative ones obtained by pooling all the leachates collected during the duration of growth for each experimental set. All pots received the same amount of the Long-Ashton nutrient solution which is designed to maintain a pH in the neighborhood of its pH value, which in this case was measured as 5.11. However, for both the inoculated and non-inoculated sets the tendency over all substrate C_s values was to maintain the pH at a slightly more acidic value, in the environs of 4.9: the global average values were 4.95 ± 0.03 for the non-inoculated set and 4.92 ± 0.04 for the inoculated. These values do not differ statistically (Student's *t*-test, $P < 0.05$) between themselves but do show a significant difference (*t*-test, $P < 0.01$) to the pH of the nutrient-only medium. (For the purpose of this discussion, the observation for the inoculated set holds the greater interest.) The much larger volume of the pots as compared to the volume of the living matter, acted as a physical buffer so that a greater sensitivity and resolution of the measurements could not be achieved. Nonetheless, the statistically significant lowering of the global average pH of the inoculated set might indicate that the exudates from the root together with exudates from the extraradical mycelium of the AM fungus tend to relatively, slightly acidify the substrate solution.

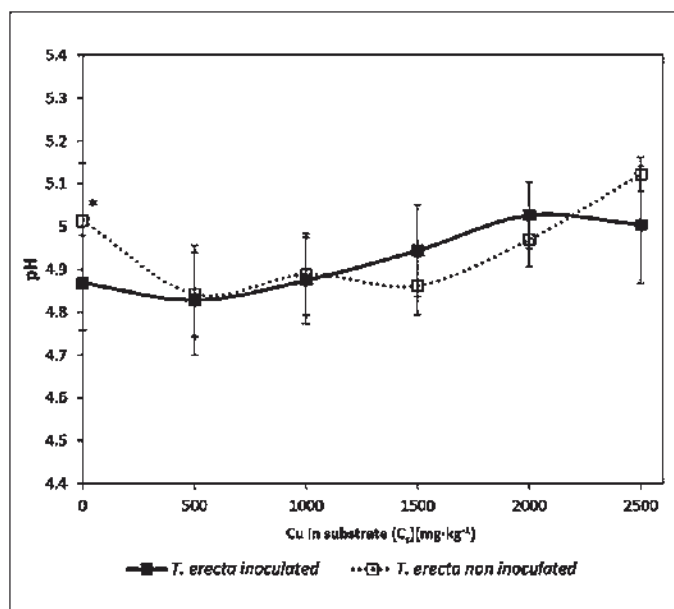


FIGURE 5

pH of the leachates obtained for the inoculated and non-inoculated treatments with respect to C_s . Each result is the average over five independent replicates. The asterisks mean significant differences by the *t*-test, $P < 0.05$.

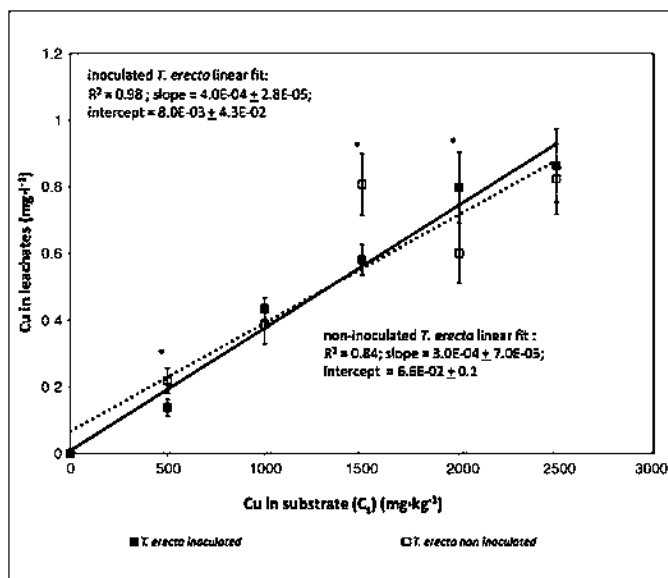


FIGURE 6

Concentration of Cu in the leachates (C_s^{sol}) obtained for the inoculated and non-inoculated treatments with respect to C_s . Each result is the average over five independent replicates. The asterisks mean significant differences by the *t*-test, $P < 0.05$.

This is in line with previous observations. Although the secretion of organic acids by plant roots is well-known, Koide and Kabir [35] report that *G. intraradices*-inoculated plants also release organic acids that reduce rhizospheric pH and facilitate nutrient availability.

Figure 6 shows the Cu concentrations in the leachates for the two experimental cases with respect to C_s . The concentrations are nearly the same but at higher C_s values the dissolved Cu concentrations in the leachates from the *T. erecta*-*G. intraradices* set were slightly higher. This can be appreciated by the fact that the slopes and intercepts of the linear tendencies for both sets as indicated in Fig. 6, differ significantly (*t*-test, $P < 0.05$), indicating distinct tendencies. Only the dissolved Cu species can be phytoabsorbed. In this work, consistently higher root concentrations of Cu in the inoculated plant over the entire C_s range (Fig. 2) were observed. However concomitantly, the Cu leached out in the downward movement of the substrate solution was only marginally enriched in dissolved Cu (Fig. 6). This means that the symbiotic association is able to increase plant Cu accumulation with minimal secondary damage to the subterranean environment. This is a serious consideration in the deployment of synthetic chelating agents to soil to increase HM mobility, because in this case high plant accumulation is accompanied by the risk of secondary contamination to subterranean aquifers by excessive leach-out of the dissolved HM [10]. In both cases, however, the magnitudes of the leachate concentrations were very low, confirming the low mobility of Cu in Cu contaminated soil. Given the fact that in its isolated form, CuO is extremely insoluble [36], the solubility yields show that the complex biotic environment in the substrate/soil matrix breaks down even hard-to-dissolve chemical compounds.

The solubility yield has been quantitatively defined [34] as the ratio of the incremental increase of the HM concentration in the soil aqueous phase (C_s^{sol}) per unit increment in C_s . In perspective,

the rhizospheric solubility yields of Song *et al.* [37] who worked with aged copper sulfate contaminated soil and the well-known Cu ME plant *Silene vulgaris*, show similar or only slightly higher values over a similar C_s range. The slightly higher values could simply be a consequence of the much larger biomass of their plants as compared to the ones obtained in this work. The linear dependence of the solubilized fraction, C_s^{sol} , versus C_s in Fig. 6 follows the typical trend for low mobility HM in soil [34]. In such cases, the solubility yield is simply the slope of the straight line [34]. From Fig. 6, it is seen that the solubility yield of the *T. erecta*-*G. intraradices* system is differentially higher by ~33% compared to the non-inoculated plant system. Given the small mass of the AM fungus, this difference is noteworthy.

Foliar area (FA) and the B_p - C_p profile

The FA is an important quantity as the amount of photosynthetic energy harvested by the plant depends on it. This affects plant growth and bio-productivity. To study the impact of Cu on the photosynthetic organ, the FA was plotted against the C_p of the whole plant (Fig. 7). For both inoculated and non-inoculated plants the toxicity of Cu to the leaves decreases the FA. In the case of the inoculated plants the decrease is more than the non-inoculated plant but its FA is higher than the latter at or near the highest Cu concentrations. This could be a direct consequence of the toxicity effects of Cu because in the case of the inoculated plants, the C_p (aerial part) is higher than for the non-inoculated plants at the lower C_s range (Fig. 3). At high C_s the AM fungal barrier properties that reduce xylem loading (lower C_p (aerial part)), afford a degree of protection to the photosynthetic organs, leading to an increase in the FA. One consequence of this protection is expected to be reflected in the biomasses (B_p) of the plant's parts.

Figures 8,9 show the biomasses of the root and whole plant. The colonized plants demonstrate a lower root biomass and in general

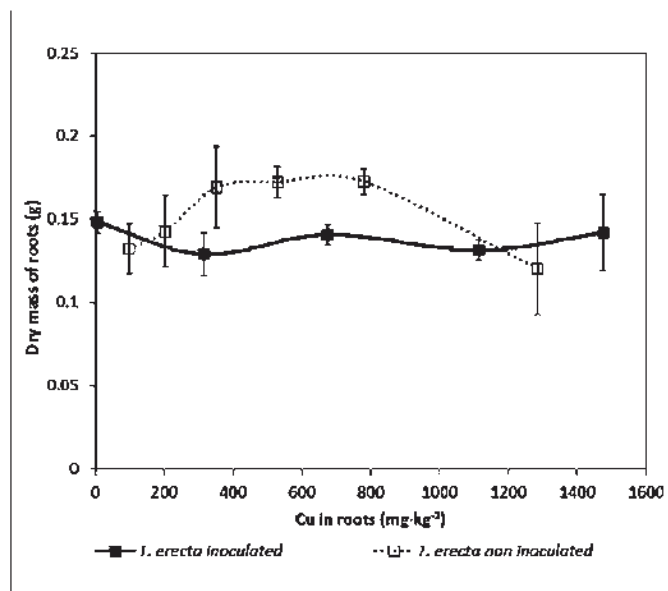


FIGURE 8

Dry mass (B_p) of roots obtained in the inoculated and non-inoculated treatments versus the concentration of Cu in the roots (C_p). Each result is the average over five independent replicates.

a lower whole plant biomass. Since these plants had also absorbed the higher Cu concentrations (Figs 2,4), the overall toxicity of the Cu in plant tissue probably dominates over other beneficial effects of the AM fungus colonization such as increased nutrient delivery, leading to a reduction in the biomass. This correlation is brought out clearly at the highest value of C_s (corresponding to the highest value of C_p in Figs 8,9) where the non-inoculated plant had absorbed a relatively rather high concentration of the Cu (Fig. 3). The consequent higher toxicity to the aerial parts, which is also reflected in the value of the FA at this C_s , impacts the B_p in

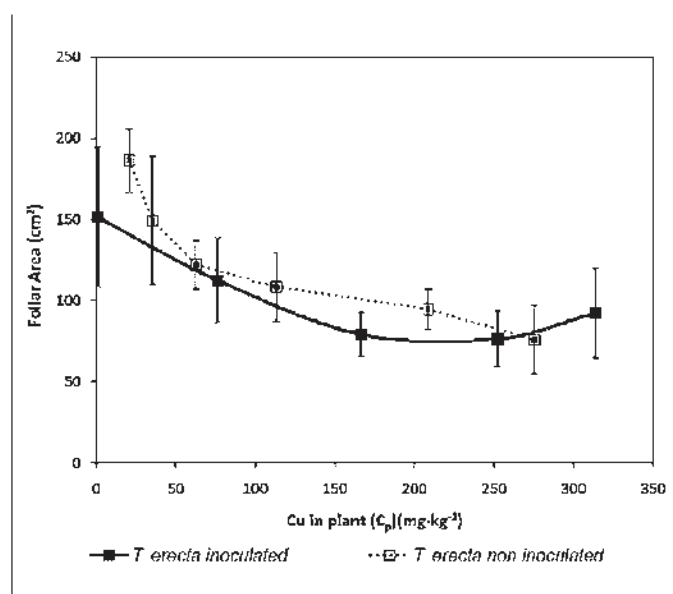


FIGURE 7

Foliar area (FA) of *T. erecta* obtained in the inoculated and non-inoculated treatments versus the concentration of Cu in the whole plant (C_p). Each result is the average over five independent replicates.

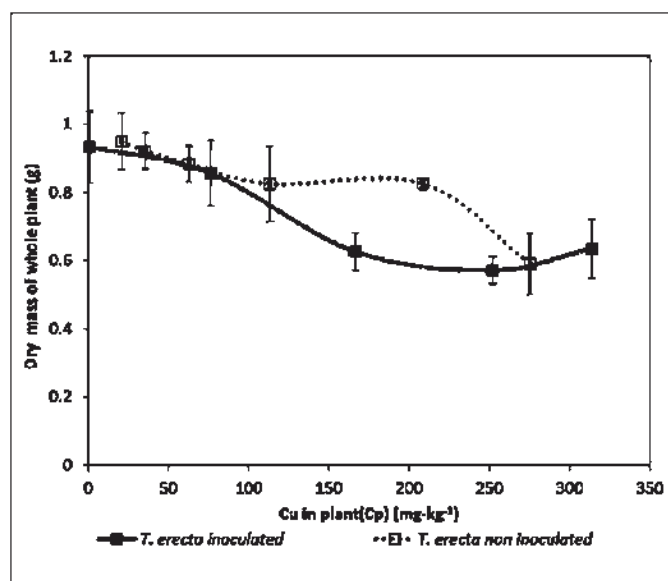


FIGURE 9

Dry mass (B_p) of the whole plant obtained in the inoculated and non-inoculated treatments versus the concentration of Cu in the whole plant (C_p). Each result is the average over five independent replicates.

both the root and whole plant where it suddenly reduces the B_p . However, because the C_p (aerial part) for the inoculated plant decreases at this C_s value, the whole plant B_p may consequently have become higher (by tendency) as compared to the B_p of the non-inoculated plant. Thus in the case of B_p too, at around the highest values of C_s – that are relatively of the greater interest to phytoremediation – the protection afforded by the *G. intraradices*–*T. erecta* symbiosis, might result in a net benefit. A calculation of the M_p accumulated by this symbiotic plant system at the highest C_s value of 2500 mg kg⁻¹ (Figs 4,9), shows that approximately 33% more Cu is accumulated by the inoculated plant versus the non-inoculated one. Turnau and Mesjasz-Przybylowicz [38] show that the *G. intraradices* colonized nickel (Ni) MHA *Berkheya coddii* accumulated 30% more Ni as compared to the non-mycorrhizal plant from soil very rich in Ni (0.3–0.7%). The result of the ~33% increase of the Cu accumulated by the *G. intraradices*–*T. erecta* system obtained in the present work compares very favorably. In this context, it is worth noting that *T. erecta* is not a Cu MHA, in fact to date there are no undisputed reports of the existence of a Cu MHA [37], and that no synthetic chelators were used to enhance the phytoaccumulative yield. Rather, the combination of a relatively high C_p and a B_p shielded from excessive diminution by Cu toxicity via AM fungus protection, resulted in a relative enhancement of the phytoaccumulative yield comparable to that achieved in a Ni MHA colonized by the same type of AM fungus. This bears out the premise mentioned in the 'Introduction' section on which this work was largely based – that a non-MHA Cu-tolerant plant if sufficiently augmented by natural

processes such as AM fungus colonization, might be able to enhance Cu phytoremediation yields in a sustainable way. The utility of the higher B_p of non-MHA plants with techniques to enhance their C_p s has been mentioned in the literature [13] as possible alternative routes to those using MHA plants, to serve the ends of phytoremediation.

Conclusion

This work is the first report of a detailed investigation of the role of the symbiosis of the AM fungus *G. intraradices* with the plant *T. erecta* L. in the phytoaccumulation of copper. The results of this work indicate that the symbiotic association protects the plant against the toxicity induced by Cu while at the same time improving the indices of phytoaccumulative yields. The system could find potential use as a phytostabilizer of Cu in contaminated soil. Further work on this system is needed to understand and exploit its potential utility for phytoremediation. This should include the test of the system on actual contaminated soil as well as the exploration of the limits of its tolerance to high environmental Cu concentrations.

Acknowledgements

The authors thank M.R. Cisneros of the Instituto de Investigaciones Metalúrgicas and L. Carreto of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, University of Michoacan, Mexico for technical assistance. CJA and OSC thank CONACyT of Mexico for their doctoral scholarships numbered 168355 and 169682, respectively.

References

- (a) Pollution Prevention Fact Sheet, September 2002, No. 2, OhioEPA, State of Ohio Environmental Protection Agency, http://www.epa.ohio.gov/portals/41/p2/mercury_pbt/fact92.pdf (accessed April 2011);
(b) Copper Homeostasis, 2006, <http://www.uv.es/cufe/copper.html> (accessed April 2011)
- Purves, D. (1985) *Trace Element Contamination of the Environment*. Elsevier
- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15–39
- Chaney, R.L. et al. (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields, commercial phytoextraction and phytomining technologies. *J. Environ. Qual.* 36, 1429–1443
- Ducic, T. and Polle, A. (2005) Transport and detoxification of Mn and Cu in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 103–112
- Maksymiec, W. (1997) Effect of Cu on cellular processes of higher plants. *Photosynthetica* 34, 321–342
- Reeves, R.D. and Baker, A.J.M. (2000) Metal accumulating plants. In *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment* (Raskin, I. and Ensley, B.D., eds), pp. 193–231, Wiley
- McGrath, S.P. et al. (2000) Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (Terry, N. and Bañuelos, G., eds), pp. 109–128, Lewis Publishers
- Dube, A. et al. (2001) Adsorption and migration of heavy metals in soil. *Pol. J. Environ. Stud.* 10, 1–10
- Peer, W.A. et al. (2005) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification, Topics in Current Genetics*, (Vol. 14) (Tamás, M.J. and Martinoia, E., eds) pp. 299–340, Springer-Verlag
- Hagemeyer, J. (2004) Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. In *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems* (2nd edn) (Prasad, M.N.V., ed.), pp. 201–222, Springer-Verlag
- Khan, A.G. et al. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 21, 197–207
- Göhre, V. and Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223, 1115–1122
- Gaur, A. and Adholeya, A. (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr. Sci.* 86, 528–534
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11
- Glasson, P. et al. (2006) Enhanced phytoremediation: a study of mycorrhizoremediation of heavy metal-contaminated soil. *Remediation J.* 17, 97–110
- Uraguchi, S. et al. (2006) Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *J. Exp. Bot.* 57, 2955–2965
- Bosiacki, M. (2008) Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 7, 21–31
- Bosiacki, M. (2009) Phytoextraction of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 8, 15–26
- Malarkodi, M. et al. (2008) Phytoextraction of nickel contaminated soil using castor phytoextractor. *J. Plant Nutr.* 31, 219–229
- Villegas, J. and Fortin, J.A. (2002) Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO₃⁻ as nitrogen source. *Can. J. Bot.* 80, 571–576
- An, Z.Q. and Hendrix, J.W. (1988) Determining viability of endogonaceous spores with a vital strain. *Mycologia* 12, 5004–5007
- Smith, G.S. et al. (1983) Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytol.* 94, 537–548
- Rothamstead Research Laboratory Methods version 896/019. Rothamstead Research In: <http://www.rothamsted.ac.uk/aen/smbweb1/methods.php?id=896>
- Nobis, M. and Hunziker, U. (2005) Automatic thresholding for hemispherical canopy-photographs based on edge detection. *Agric. Forest Meteorol.* 128, 243–250
- US Environmental Protection Agency. (1996) Acid digestion of sediments, sludges and soils. In *Method 3050b Rev. 2*. December (<http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>)
- Vierheilig, H. et al. (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for Arbuscular–Mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5004–5007

- 28 Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500
- 29 Chen, X. *et al.* (2005) Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* 60, 665–671
- 30 Taiz, L. and Zeiger, E. (1991) *Plant Physiology* (1st edn), Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc
- 31 Allan, D.L. and Jarrel, W.L. (1989) Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiol.* 89, 823–832
- 32 Bernal, M. *et al.* (2006) Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells. *Funct. Plant Biol.* 33, 1001–1012
- 33 Joner, E.J. *et al.* (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 226, 227–234
- 34 Dasgupta-Schubert, N. *et al.* The uptake of copper by *Aldama dentata*: ecophysiological response, its modeling and the implication for phytoremediation. *Water Air Soil Pollut* doi:10.1007/s11270-010-0733-1 (in press)
- 35 Koide, R.T. and Kabir, Z. (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol.* 148, 511–517
- 36 Weast, R.C. and Astle, M.J. (1982) *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (62nd edn), CRC Press, Inc
- 37 Song, J. *et al.* (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 128, 307–315
- 38 Turnau, K. and Mesjasz-Przybylowicz, J. (2003) Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13, 185–190

CAPÍTULO 4

The Uptake of Copper by *Aldama dentata*: Ecophysiological Response, Its Modeling, and the Implication for Phytoremediation.

N Dasgupta-Schubert, MG Barrera, CJ Alvarado, **OS Castillo**, EM Zaragoza, S Alexander, S Landsberger y S Robinson.

Water Air Soil Pollut,(2011), 220:37-55.

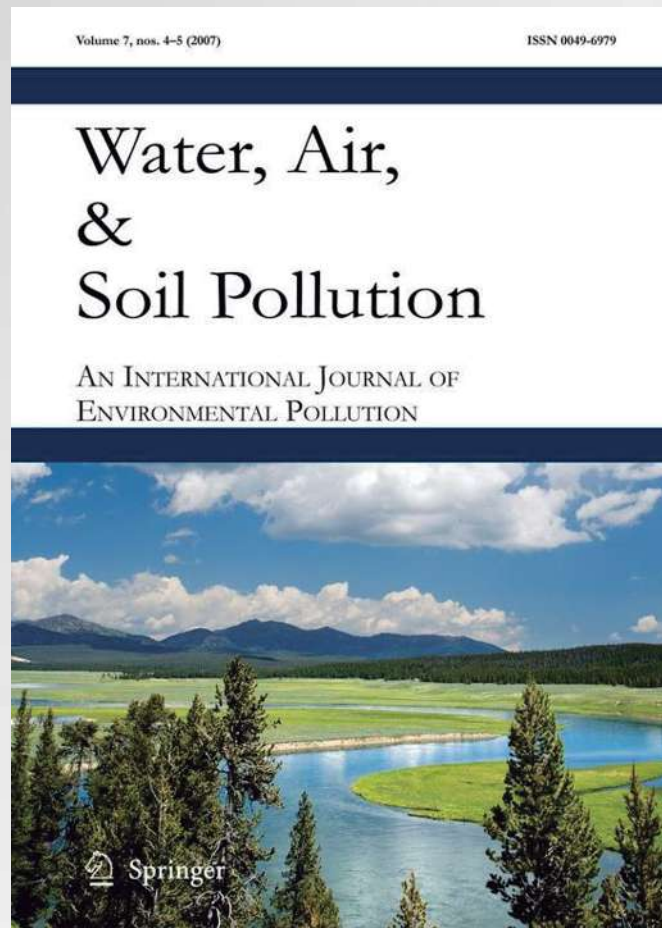
*The Uptake of Copper by *Aldama dentata*:
Ecophysiological Response, Its Modeling,
and the Implication for Phytoremediation*

*N. Dasgupta-Schubert, M. G. Barrera,
C. J. Alvarado, O. S. Castillo,
E. M. Zaragoza, S. Alexander,
S. Landsberger & S. Robinson*

Water, Air, & Soil Pollution
An International Journal of
Environmental Pollution

ISSN 0049-6979
Volume 220
Combined 1-4

Water Air Soil Pollut (2011)
220:37-55
DOI 10.1007/s11270-010-0733-1



The Uptake of Copper by *Aldama dentata*: Ecophysiological Response, Its Modeling, and the Implication for Phytoremediation

N. Dasgupta-Schubert · M. G. Barrera · C. J. Alvarado · O. S. Castillo · E. M. Zaragoza · S. Alexander · S. Landsberger · S. Robinson

Received: 6 June 2010 / Accepted: 21 December 2010 / Published online: 21 January 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract *Aldama dentata* Llave & Lex. is a plant native to Latin America that exhibits metallicolous populations. Its ecophysiological (EP) response to Cu stress, administered as graded soil concentrations (C_s) of the fungicide copper(II) oxychloride, is examined in depth. Using a systems biology- and population dynamics-inspired approach, an r/K -driven model is proposed that satisfactorily explains the plant Cu concentration (C_p) versus C_s EP response curves for the root, shoot, and whole plant. *A. dentata* was found to be a Cu excluder (ME). The dual role of Cu as a nutrient and toxin at low and high concentrations, respectively, manifested as a parabolic variation of the foliar area where the toxicity appeared as a second-order

effect. The power-law variance of biomass (B_p) with C_p expected from the universal allometric scaling law of biology was loosely followed and is discussed in terms of the mode of Cu uptake by the plant and Cu's dual physiological role. Biometric growth indices reflected the impact of Cu on the photosynthetic energy harvest. The general applicability of the r/K -driven model was corroborated by its successful application to the published C_p – C_s data of the well-known Cu ME, *Silene vulgaris*. The r – K factors suggest a new quantitative manner of comparing the phytoavailability of the metal and the plant's accumulation capability across soil types. *A. dentata* with high root C_p but low B_p diminution could potentially find use as a Cu phytostabilizer.

Keywords Copper · *A. dentata* · Phytoremediation · Ecophysiology · r/K

N. Dasgupta-Schubert (✉) · M. G. Barrera · C. J. Alvarado · O. S. Castillo · E. M. Zaragoza
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana (UMSNH),
Ciudad Universitaria,
Morelia, Michoacán C.P. 58060, Mexico
e-mail: nita@ifm.umich.mx

S. Alexander
Physics Department, Southwestern University,
1001 E. University Avenue,
Georgetown, TX 78626, USA

S. Landsberger · S. Robinson
Nuclear Engineering Teaching Lab.,
University of Texas at Austin,
Pickle Research Campus,
Austin, TX 78712, USA

1 Introduction

Copper (Cu) is a micronutrient essential for the normal development of plants. It is involved in numerous redox-active physiological processes, such as photosynthetic electron transport and oxidative stress response (Yruela 2005). For most plants, at concentrations higher than 20–30 mg kg⁻¹ dry shoot, Cu becomes a serious toxin, inhibiting plant growth and impairing the functioning of chromatin and of the photosynthetic apparatus (Ducic and Polle 2005; Maksymiec 1997). The anthropogenic discharge of

Cu into the environment is ubiquitous given its use as a fungicide and in various metallurgical industries. Copper-based fungicides (such as the Bordeaux mixture, $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$) have been intensively used in Europe and elsewhere over the last 100 years to control plant, particularly vine (*Vitis vinifera* L.), fungal diseases such as downy mildew. More recently, other Cu compounds, notably Cu-oxychloride ($\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$), have been introduced and are used for the control of fungal pathogens in a variety of agricultural crops. The warm and humid climatic conditions prevalent over many parts of the tropical and subtropical regions of the world compel the use of higher fungicide doses to control the more intense development of downy mildew. In regions such as Latin America, the long-term use of Cu agrochemicals has contributed to areas of high Cu accumulations in soil (e.g., $>3,000 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ in southern Brazil; Komárek et al. 2010), with the associated consequence of higher Cu concentrations in aquifers and streams (e.g., of the Culiacán estuary in northwestern Mexico; Páes-Osuna et al. 1998; Ruelas-Inzunza et al. 2010).

Phytoremediation is an emergent environmental biotechnology (Pilon-Smits 2005; Chaney et al. 2007) that uses metalophilic plants—classified as metal hyper-accumulators (MHA), accumulators, or excluders (ME; Reeves and Baker 2000)—to remediate the environment of heavy metal (HM) contamination. A milestone was the conceptual picture of the different profiles of the concentration of the HM in the plant tissue (C_p) vis-à-vis the soil concentration of the metal (C_s) for the three metallophytic types (Baker 1981). The C_p – C_s profiles are considered to constitute one of the fundamental HM ecophysiological responses of the plant and have served as the cornerstone for the planning of appropriate phytoremediation strategies (McGrath et al. 1999; Reeves and Baker 2000).

Most Cu-accumulating plants found to date are ME. These accumulate more in the roots and restrict Cu translocation to the shoot (Greger 2004). The successful deployment of any of the suite of phytoremediation technologies necessitates the identification and characterization of an appropriate plant, preferably one adapted to local conditions, which in turn is likely to be found in local metal-rich zones. Metalliferous soils of both natural and anthropogenic origins are abundant in Latin America given its multifarious mineralized zones and the long-term use of HM-based agrochemicals, as for instance the aforesaid fungicide, Cu-oxychloride.

Despite this fact, there are few reports on the HM absorption characteristics of native Latin American flora (Ginocchio and Baker 2004). *Aldama dentata* Llave & Lex. (Asteraceae), common name *flor amarilla*, is endemic to the swathe from Central Mexico to Venezuela and is found thriving in metalliferous and polluted zones (Rzedowski and Rzedowski 2001).

Surprisingly, little has been studied of this plant despite its prevalence. This work presents the first experimental investigation of its ecophysiological (EP) response to environmental Cu stress and the concomitant effects on its biometrics. The objective was to examine several macroscopically manifested aspects of the EP response in order to consolidate toward a global impression of the metallophyte–Cu interaction that is important for the concept of phytoremediation efficiency. Specifically, the C_p of Cu(II) in the root, the stems, and the leaves, their corresponding dry biomasses (B_p), as well as the foliar area and the plant shoot biometrics are measured in the range 0–5,000 mg kg^{-1} of the C_s of Cu(II) applied in the form of Cu-oxychloride. The set of experimental observations are then modeled using empirical analysis or by statistical regression fits. The rationale behind the key elements is laid out in the following.

Complex mechanisms at the molecular level govern HM homeostasis and stress management in the plant in response to a given concentration of the HM (C_s) in the substrate. At the whole organism level, they affect the plant's tissue concentration of the HM (C_p) and, through the budgeting of metabolic energy, its biomass (B_p). A quantitative description of the variation of C_p and B_p with C_s is necessary for a more fundamental understanding of the EP response of the plant and, also connectedly, for the accuracy of the predictive estimates of phytoremediation efficiency. The controlling parameter in the latter is M_p , the amount of metal absorbed by the plant in a given growth cycle. M_p is the product of C_p and B_p . Predictive estimates of M_p generally assume that C_p or the bioconcentration factor, BCF (where $\text{BCF} = C_p/C_s$), remain constant with changing C_s and that B_p is unaffected by C_p (and therefore also by C_s ; Reeves and Baker 2000; McGrath and Zhao 2003). These assumptions concerning the C_p – C_s relationship have been shown to result in underestimates of the number of crop cycles (or time) required to achieve the targeted reduction in soil HM content (van Nevel et al. 2007; Koopmans et al. 2007). A recent practice has been to

use regression fitting to obtain a linear functional relationship between the logarithms of C_p and C_s in specific experimental cases (Zhao et al. 2003; Song et al. 2004; Koopmans et al. 2007; Liang et al. 2009) using which the aforesaid premise regarding the number of crop cycles has been substantiated. However, the log scale for both variables reduces the sensitivity of the graph, “damping” the profile of an underlying functional dependence emerging at the level of the physiology of the particular organ or whole plant. This functional form could yield clues to the implicit mechanism. Furthermore, a purely statistical fit presents difficulties in the assignment of a physical meaning to the regression constants.

The importance of “validated mechanistic models” to reproduce the vegetation–soil HM interaction has been recognized for some time (Robinson et al. 2006; van Nevel et al. 2007). A (mathematical) functional relationship between C_p and C_s derived from a mechanistic model would contribute to the understanding of the basis of their interrelationship. A reductionist model, i.e., a model that builds up from the level of the various interdependent and complex soil–plant processes to the eventual macroscopic level of the whole organism’s C_p , is a daunting task complicated further by the insufficient knowledge of the full set of biogeochemical parameters and the conditions that govern them. Nonetheless, attempts have been made, notably by Robinson et al. (2003), to introduce a manner of predictability to phytoextraction outcomes with a focus (Robinson et al. 2003) on the MHA *Berkheya codii* in Ni-contaminated soil

In this work, we adopt a systems biology-inspired holistic approach for the C_p – C_s relationship: The Verhulst mathematical model of population growth (Verhulst 1838) serves as *ansatz* to view the net absorption of Cu as a competition between the free access of, and restriction to, the plant accumulation sites by the entering and affixed Cu species, respectively. From the qualitative standpoint, such an approach is encouraged by the observed similarity of the C_p – C_s curves for plants within each metallophyte type (Baker 1981, 2009) across all soil types with a bioavailable HM fraction.

At high C_s and for non-MHA at least, HM stress is expected to reduce B_p (Hagemeyer 2004). A functional analysis of the B_p – C_p data would reveal the quantitative trend of the impact of the HM on B_p . We take a quasi-systems view also for the B_p – C_p

relationship where the concept of the universal allometric scaling of metabolism-dependent variables with biomass (West and Brown 2005) is invoked to explain the graphical trend.

The aforesaid analyses facilitate a broadly unified and quantitative intercomparison with other similar Cu metallophytes, albeit differences in detail exist. An example with the published data of *Silene vulgaris* is demonstrated and the results compared with those of *A. dentata*.

2 Materials and Method

2.1 Plant Growth and Cu Treatment of the Soil (C_s)

Seeds of *A. dentata* were collected from an urban wasteland at 19°43' N, 101°12' W, altitude 1,940 m above sea level in Michoacan, Mexico. Sixty-eight seeds were disinfected (20% H₂O₂ solution, 24 h), wrapped in sterile deionized (DI) water-moistened absorbent paper, and germinated in the dark for an average period of 8.07 days. The germinated seeds were planted in an indoor nursery containing commercially available natural potting soil (Bandini® potting soil 105, Los Angeles) with known physicochemical characteristics (Pittenger 1986; Duncan et al. 1995), which had previously been autoclaved and oven-dried at 60°C for 48 h. The seedlings were irrigated with DI water every third day and allowed to grow for 24 days before the transplantation of 30 of the most robust seedlings (6.0–6.5 cm in height) each to its designated pot in the plant growth laboratory. Each pot contained 120 g (dry weight) of the potting soil similarly sterilized and dried. The 30 plants corresponded to six sets of five replicates of which the first set was the control. After a 14-day period of acclimatization, each pot of the six sets was treated with 120 ml of a suspension of the sparingly soluble fungicide Cupravit® (Bayer CropScience AG, Monheim, Germany), CuCl₂·3Cu(OH)₂, that corresponded to six Cu(II) concentrations of 0 (control), 108.1, 1,800.9, 2,701.6, 3,601.8, and 4,502.5 mg Cu kg⁻¹ dry soil (the control received 120 ml of only DI water). The emphasis is on the higher soil concentration range because that is the environmentally significant range pertinent to soil polluted with accumulated Cu. Moreover, the very low mobility and phytoavailability of insoluble Cu at low total soil Cu concentrations result

in no appreciable physiological impact on the plant—rather, interesting and important differences between the different metallophyte types set in at the higher end of the concentration scale (Baker 1981). To obviate a sudden impact of the fungicide, the 120 ml was administered in the stages of 40 ml per week at the same time of the week for the successive 3 weeks. Each pot was irrigated with DI water alone at the average rate of 48 ml per week during the experiment. Plant biometrics of height (H) and maximum transverse diameter (MTD), among others, were measured once per week at the same time for all plants. All lengths were the physical extensions. The ambient growth conditions on average were a photoperiod of 13 h with average photon flux of $114.6 \pm 9.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, maximum and minimum temperatures of 26°C and 14°C , respectively, and a relative humidity of 45%.

After four subsequent weeks, the plants were harvested and cleaned as per standard practice (Dasgupta-Schubert et al. 2007). Fresh weights of the whole plant, of the roots, stems, and leaves were taken. The plant's foliar area was measured by digital image analysis of photo-scanned leaves using the plant metrological software SIDELOOK® (Nobis and Hunziker 2005) as per standard procedure (O'Neal et al. 2002). The roots, stems, and leaves were oven-dried at 60°C for 48 h (or until constant dry weights were attained), then weighed to obtain their dry biomasses.

Soil solutions in a set of pots with the aforesaid Cu treatments were extracted before the plant experiments, in the manner prescribed by Song et al. (2004): Soils were maintained at 100% water holding capacity (Rothampstead protocol vers. 896/019, Rothampstead Research Laboratories 2004) for 1 week and soil solutions were then extracted by centrifugation/filtration as per Reynolds (1984).

2.2 Cu Elemental Analysis

The dried plant parts were ground to a powder, weighed, and digested according to the protocol USEPA SW-846 Method 3050B (US Environmental Protection Agency 1996). The digested plant matter and soil solutions were filtered, appropriately adjusted for volume, and thereupon analyzed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS, Perkin-Elmer 3100-AAAnalyst, Waltham, MA, USA) using deuterium background correction and a high-efficiency nebu-

lizer. Method blanks and spikes were run with each analytical batch and were found to be within general guidelines for validating the analytical data (Dasgupta-Schubert et al. 2007). Recovery corrections using the root and shoot matrix spike recovery values of $91.2 \pm 4.2\%$ and $85.4 \pm 12.5\%$, respectively, were applied as appropriate. The analytical method used had previously been validated using standard reference materials (1570a and 1573a, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) and cross-laboratory analysis.

Some of the very low metal content samples were analyzed by thermal instrumental neutron activation analysis (INAA) using the TRIGA 1.1MW research reactor of the University of Texas at Austin, USA. Samples were irradiated with a neutron flux of approximately $2.7 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for short durations, cooled, and analyzed gamma spectrometrically via the short-lived ^{66}Cu (5.10 min) product nuclide using a Compton suppressed gamma-ray spectrometer consisting of a 35% HPGe detector (Canberra Inc., Meriden, CT, USA) and a NaI active shield (St. Gobain Crystals, Hiram, OH, USA). The elemental concentrations were calculated using the standard comparative method employing the program NADA (Landsberger et al. 1992)

The FAAS and INAA results on average agreed to the extent of 92% for the samples on which both types of analysis had been performed.

2.3 Data Analysis

Precision values on the concentrations and other primary experimental results were computed as the standard deviation errors of the replicate plant samples. The overall precision errors on secondary or formula-derived experimental results were obtained using the standard formulae of statistical error propagation (Mandel 1984). Statistical regression and ANOVA analyses were done using SigmaPlot® (Systat Software Inc. 2008). The repeatability of the experiment was checked by replicate experiments whereupon the averages and trends were found to be consistent.

Data reduction of published graphs¹ from the literature (Song et al. 2004), as required for the

¹ Data from Song et al. (2004) have been reproduced with permission from Elsevier Ltd. (www.elsevier.com).

comparisons with *S. vulgaris*, was read off electronically so as to ensure accuracy. In the tables created for subsequent graphing, close lying data points for the total soil Cu and soil solution Cu were averaged out, as also the corresponding plant tissue Cu concentration values. A back-check on the derived values was made through a comparison of the deduced and original graphs, and the two were found to match. It must be mentioned, however, that the original graphs contained several occulted or poorly resolvable data points that have been omitted in the present analysis.

3 Results and Discussion

All experimental observations within each replicate set showed substantial variation, which translates to the higher precision variability of the data discussed below. This is to be expected among the genetically diverse individuals of the wild plant *A. dentata*. A similar wide variability was observed in the results obtained for the Cu-tolerant plants *S. vulgaris* and *Elsholtzia splendens* by Song et al. (2004). Apropos this, Reeves and Baker (2000) remark that one of the most notable features of the Cu-accumulating plants studied in the Congo was the “great variability in the concentrations of Cu, a feature that contrasts strongly with that of Ni accumulators.” In the present work where by experimental design the conditions were carefully controlled, the precision variability was found not to affect the consistency of average trends (Section 2.3).

3.1 Cu Concentration in Plant Tissue (C_p)

The results of the variation of C_p in each plant organ with respect to C_s are shown in Fig. 1a, b. In Fig. 1a, the mutually opposed C_p in the leaves and stems at each C_s value seems to indicate that the shoot (aerial part) Cu concentration is either localized in the cellular compartments of the leaves or else in those of the stem, but not distributed evenly between them. The net aerial C_p that results from the weighted averaging of the C_p between the two morphological parts follows a smoothly increasing pattern toward an eventual saturation. This same pattern is followed by the root's C_p versus C_s in Fig. 1b. For all C_s values, the root's C_p is around an order of magnitude higher

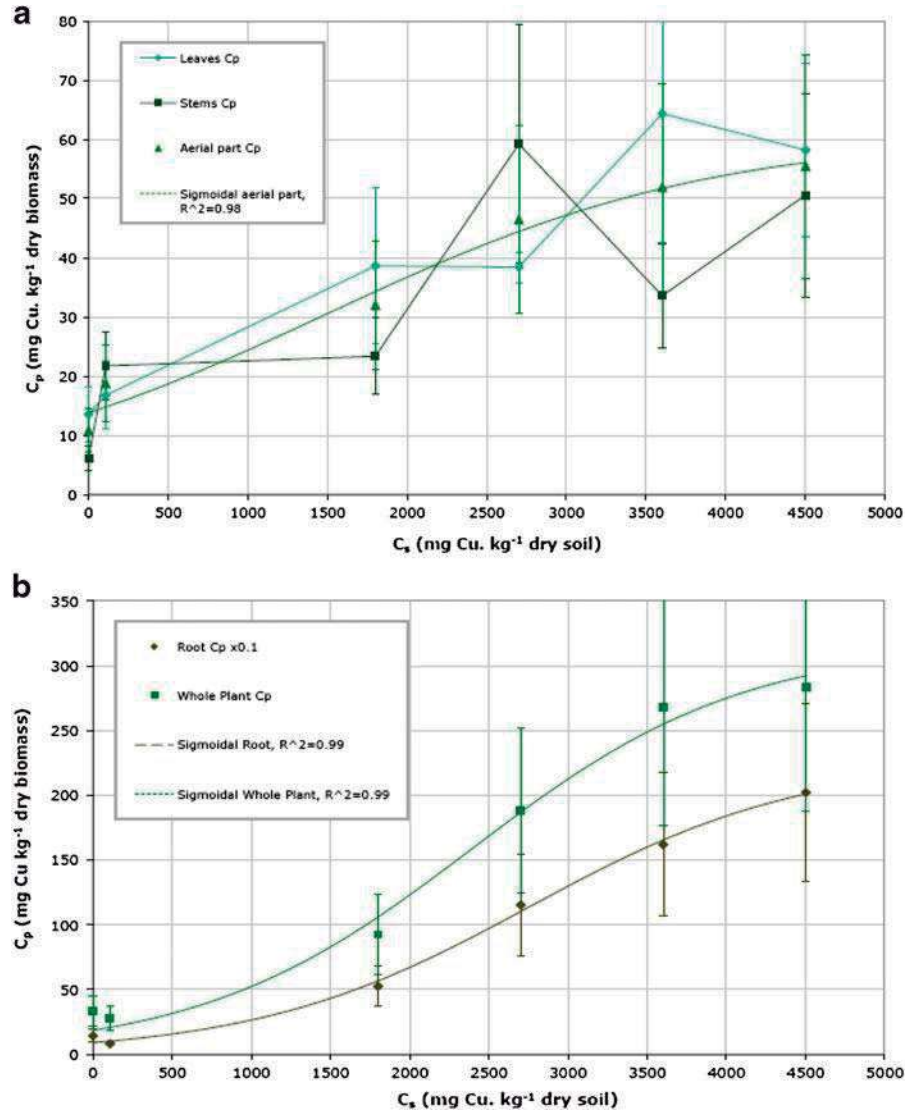
than the C_p of the shoot. *A. dentata* is seen to be a plant that preferentially accumulates in its root where the concentrations are $>2,000$ mg Cu kg^{-1} root dry weight for soil total Cu between 4,000 and 5,000 mg Cu kg^{-1} soil dry weight. The whole plant C_p (Fig. 1b) is obtained as the weighted average of the root and shoot C_p s. However, the root does not influence it very much because of its low weight relative to that of the shoot, with the result that *A. dentata* as the whole entity does not concentrate a substantial amount of Cu in its tissues.

This issue is better illustrated by the plant's BCF and the shoot translocation factor (TLF) values, as shown in Fig. 2. The BCF for the whole plant is defined as the ratio $C_p(\text{whole plant})/C_s$ and the TLF as $C_p(\text{shoot})/C_p(\text{root})$. The BCF for the whole plant is substantially <1 for all C_s , whereas the BCF for the root ($=C_p(\text{root})/C_s$) is an order of magnitude larger, though still <1 . The TLF is also low, significantly <1 . *A. dentata*, thus, is not a Cu hyper-accumulator which would have required a BCF $\gg 1$ and a TLF > 1 (Baker 1981). Rather, it preferentially accumulates Cu in its roots and strategizes its survival in highly Cu-contaminated soil by suppressing the translocation of Cu to the shoots, thereby preventing damage to its sensitive photosynthetic apparatus. This is the typical response of an ME. Interestingly, the TLF at the C_s value of 108.1 mg kg^{-1} is higher than for the control, which could perhaps be an instance of chemical hormesis, often witnessed at low heavy metal concentrations in the substrate (Calabrese and Blain 2009). With the aforesaid characteristics, *A. dentata* is unsuitable for Cu phytoextraction, but could be used for phytostabilization whereby the plant's roots would immobilize the heavy metal and prevent it from leaching out to subterranean aquifers. In the opinion of some in the field (Ernst 2005; Chaney 2009), among the suite of current phytoremediation technologies, phytostabilization holds relatively greater promise.

3.2 C_p Versus C_s Curves and “ r/K Selection”

The similarity of the trends in Fig. 1a, b indicates that there is a systemic response to the presence of Cu in the environment. This is about the same in the root as in the shoot, and it manifests in the same manner at the whole plant level. We use a systems biology-inspired approach to describe this systemic EP response using as *ansatz* the Verhulst ecological

Fig. 1 **a** Plots of the variation of the Cu(II) concentrations in the leaves, the stems, and in the aerial part of *A. dentata*, C_p (mg Cu·kg⁻¹ dry biomass) versus the soil total Cu concentration C_s (mg Cu·kg⁻¹ dry soil). The *straight lines* between the points are linear connectors, while the *dotted line* is the fit, $R^2=0.98$, of the aerial part's experimental data to Eq. 2. **b** Plots of the C_p of the root and of the whole plant of *A. dentata* versus C_s . The experimental C_p values for the root have been scaled down by a constant factor of 0.1 to allow accommodation in the same graph. The *dotted lines* show the fits to Eq. 2. For both fits (unscaled root and whole plant), $R^2=0.99$



model (Verhulst 1838) of population growth. The rate of metal concentration in the plant with respect to the environmental concentration of the metal, dC_p/dC_s , is considered to be driven by two mutually antagonistic forces: (1) the unimpeded increase of C_p which is likely when the metal concentration within the plant is small and (2) the restriction to further metal ingress due to a substantial concentration of metal already within the plant. Accordingly,

$$\frac{dC_p}{dC_s} = rC_p \left(1 - \frac{C_p}{K} \right) \quad (1)$$

where the constant r defines the rate of acquisition of metal within the plant and K is the carrying

capacity. In terms of the capacity to store metal in the plant, the factor K would be dependent on the number of metal-binding sites (MBS), i.e., number of extracellular adsorption and/or intracellular absorption sites. The total number of such cells would be proportional to the net biomass. Initially, a large concentration gradient exists across the soil–plant barrier and few sites within the plant are occupied by the metal. Effect (1) operates where the concentration potential drives the unimpeded metal ingress given by the term rC_p . In a plant with ample MBS facing low C_s , little restriction exists to the occupation of sites within the plant by the metal. As C_s increases, and more sites within the plant get occupied by the metal, available sites for further metal ingress diminish, resulting in the

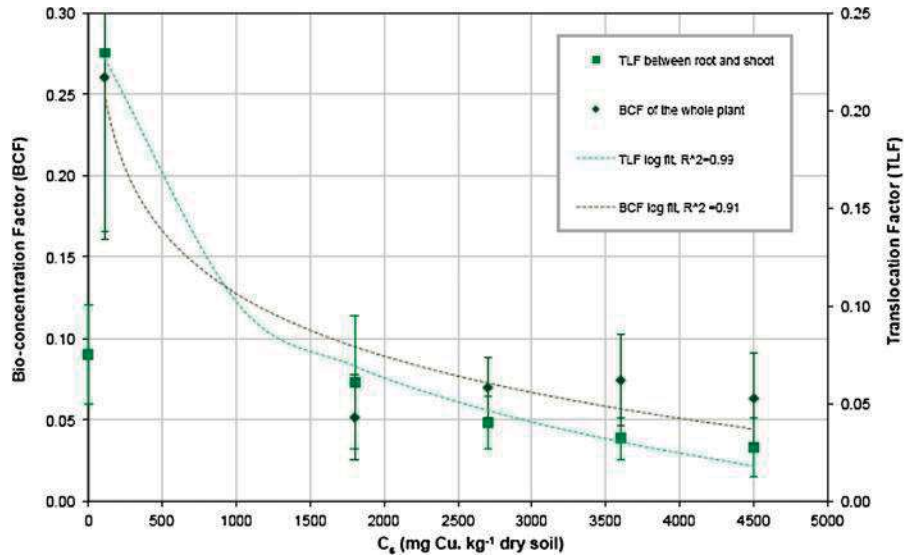


Fig. 2 The variation of the bio-concentration factor (*BCF*) for the whole plant and of the shoot translocation factor (*TLF*) with C_s . The dotted lines are regression fits to the equation $Y = a \cdot \ln(X) + b$,

with the values of R^2 indicated in the legend. X is C_s and Y is the bio-concentration factor (*BCF*) and the shoot translocation factor (*TLF*) indicated on the y -axes to the left and right, respectively

increasing assertion of factor (2). This is given by the term $-rC_p^2/K$. This competition between the two factors reduces the combined rate of the growth of C_p with C_s until C_p levels off to a “saturation” value. Implicit in this treatment is the assumption that the net number of sites or the biomass does not change during the process of metal transport into the plant. This is approximately valid because the timescale of biomass growth with respect to diffusion over short distances (Nobel 1999) is relatively slow.

The solution of the first-order nonlinear differential Eq. 1 with the boundary condition of $C_p = C_p(0)$ at $C_s \approx 0$ (i.e., $C_p(0)$ is the plant metal concentration at the background soil concentration) results in,

$$C_p = \frac{C_p(0)Ke^{rC_s}}{K + C_p(0)\{e^{rC_s} - 1\}} \quad (2)$$

which is the familiar logistic function (Verhulst 1838; Weisstein 2010). The model considers the variation of C_p with C_s over a given period of growth for all plants of a given type considered in the set. However, different growth periods for the set would likely result in a family of C_p - C_s curves, i.e., time would enter only parametrically. Thus, the model is not an explicit kinetic model. Finally, it is worth noting that the model has not been built up from the level of the different fundamental interactions (many at the molecular or “microscopic”

scale) in the soil and plant that govern the accumulation, C_p . Rather, it is a simple phenomenological model.

The dotted lines in Fig. 1a, b show the fits of the experimental data to this function. In all three cases, the fits were very good, resulting in R^2 values of ~ 0.99 . For the root, aerial part, and the whole plant, the values of $C_p(0)$ (mg kg⁻¹), r (mg⁻¹ kg), and K (mg kg⁻¹) were as shown in Table 1. Clearly, the r factor is small relative to K . The $C_p(0)$ value for the whole plant is in the range of Cu concentrations deemed as “sufficient” for crop plants (Rehm and Schmitt 2002). The r value for the aerial part is lower than for the root and the K value much lower. This seems to suggest that the metal flow into the shoot is impeded as compared to the root and there exists an insufficiency of specific transporter species that would facilitate symplastic transport and the loading of Cu onto the xylem. Entering the xylem by crossing the Casparian strip and the endodermal cells is difficult, whereas entering via the younger root parts where the Casparian strip is less developed is easier, but still restricted by virtue of physical volume (Greger 2004). Also, if a ready availability of Cu translocators and membrane transport molecules was present, both the rate and capacity of shoot Cu uptake would likely have been significantly higher. From the point of view of available sites, intracellular MBS would make more sites available both initially and

Table 1 Values of the r ($\text{mg}^{-1} \text{kg}$), K (mg kg^{-1}), and $C_p(0)$ (mg kg^{-1}) parameters of Eq. 2 as obtained by fits to the experimental data of the concentration of Cu in the plant tissue, C_p (mg Cu kg^{-1} dry biomass) to the soil total Cu concentration,

C_s (mg Cu kg^{-1} dry soil), and to the Cu concentration in the soil solution, C_s^{sol} (mg Cu/l), for the plants *A. dentata* and *S. vulgaris*. The data for the latter were obtained from Song et al. (2004), as described in Section 2.3

Plant part	Coefficients in the r/K model		
	r	K	$C_p(0)$
<i>C_p versus C_s</i>			
<i>Aldama dentata</i>			
Root	1.16±0.13E-03 $P=0.0028$	2,276.76±138.27 $P=0.0005$	90.51±4.85 $P=0.0003$
Whole plant	1.16±0.23E-03 $P=0.0147$	317.36±28.76 $P=0.0016$	18.43±1.81 $P=0.0020$
Shoot	8.23±1.85E-04 $P=0.0212$	60.76±6.41 $P=0.0025$	13.81±3.59 $P=0.0310$
<i>Silene vulgaris</i>			
Root	1.48±0.47E-03 $P<0.0001$	1,376.00±59.10 $P<0.0001$	68.12±11.80 $P<0.0001$
Shoot	6.56±0.57E-04 $P<0.0001$	269.69±14.22 $P<0.0001$	11.51±0.73 $P<0.0001$
<i>C_p versus C_s^{sol}</i>			
<i>Silene vulgaris</i>			
Root	1.25±0.62 $P<0.0001$	1,407.13±108.15 $P<0.0001$	125.20±39.82 $P<0.0001$
Shoot	0.54±0.02 $P<0.0001$	265.87±2.57 $P<0.0001$	11.22±0.17 $P<0.0001$

until the “saturation” point. If such a scenario prevailed, *A. dentata* would have likely displayed high aerial accumulation and rate of uptake. Equation 2, with its values of r and K , allows a means to compare ME plants grown under similar (ideally, the same) conditions in a generally unified and quantitative way. The application of Eq. 2 to the Cu uptake by *S. vulgaris* is dealt with in Section 3.5.

Mechanistically, the C_s in question is actually the solubilized C_s (C_s^{sol}), for only this fraction results in the phyto-absorbed component. The solubility yield ε ($\varepsilon = C_s^{\text{sol}}/C_s$) of the HM in the particular soil–plant system is the scale factor that translates from the C_s^{sol} axis to soil total C_s axis in the comparison of C_p with the latter. This does not change the essentials of Eq. 1 so that Eq. 2 is likely to be followed equally with respect to total C_s as with C_s^{sol} . The r factor will reflect the change in scale, but not K since this is dependent on the total uptake by the plant which, for a given maximum of C_s^{sol} , is determined by the

particular plant’s physiology. Section 3.5 illustrates this. Furthermore, with regard to the scale factor, since the solubility is rather low for highly bound HM such as Cu in soil (Komárek et al. 2010), the variation of C_s^{sol} with C_s in the range of soil C_s normally encountered is a slow almost linear variation that vanishes at $C_s=0$. As a result, the scale factor can be regarded as approximately constant over the normally encountered soil C_s ranges, simplifying the conceptualization. The r – K analysis allows a quantitative assessment of the uptake and accumulation capacity of the plant using either the C_p – C_s^{sol} or the C_p –total C_s responses. This is explored in Section 3.5.

Depending on growth conditions, metallophyte, and HM type, there could be departures from the scenario of Eq. 1. In the case of very young seedlings grown in substrates containing high dissolved metal concentration, the plant biomass is probably not sufficiently large to afford a large number of initially unfilled MBS. In this case, a graded opposition to

uptake is expected to dominate, and the C_p versus C_s curve will not follow the sigmoidal pattern. This was seen in the case of young *Brassica juncea* seedlings grown in agar gel media with high concentrations of dissolved Ni (Dasgupta-Schubert et al. 2007) where the curves were logarithmic.

Returning to the question of the BCF and TLF, Fig. 2 shows that both tend to decrease logarithmically to a near constant value. This is a direct consequence of the “saturation” behavior of the C_p – C_s curves of the respective morphologies shown in Fig. 1a, b at high values of C_s , which results in $C_p \rightarrow K$. Zhao et al. (2003) also observe a decrease in the BCF for Zn in the MHA *Thlaspi caerulescens*. They conjecture that the BCF decrease “maybe due to a saturation of Zn uptake and/or root to shoot transport (TLF), or a down-regulation of Zn uptake and/or root to shoot transport when internal Zn concentration is high.” This conjectured saturation is not demonstrated by their log-linear fits of the C_p versus C_s of *T. caerulescens*. However, as seen in the aforesaid C_p – C_s analysis for *A. dentata*, it emerges naturally in the linear scale graphs of the experimental data and in the r/K -based mathematical analysis.

3.3 Plant FA and Biometrics

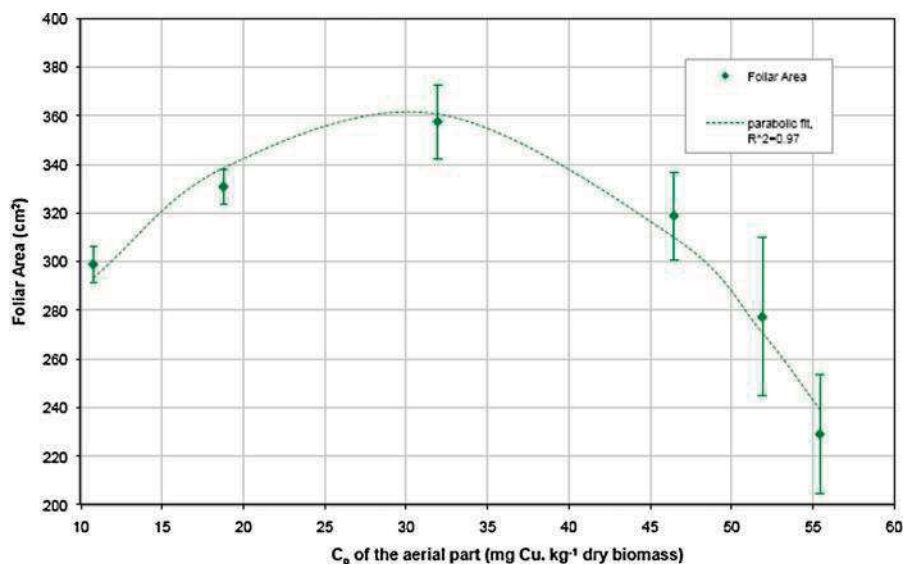
The foliar area (FA) of the plant is a fundamentally important quantity as the amount of photosynthetic energy harvested by the plant depends on it (Nobel

1999). This in turn affects plant growth and bio-productivity. To study the impact of Cu on the photosynthetic organ, the average FA results obtained experimentally were plotted against the shoot's experimental C_p values (Fig. 3). The trend of the rise and fall of FA follows the known fact of the benefit of Cu as a micronutrient at low concentrations and its toxicity at higher concentrations (see Section 1). These two mutually opposing roles of Cu intuitively suggest at its simplest a parabolic functional relationship. Accordingly, the observed FA with respect to C_p was regression modeled as:

$$FA(\text{cm}^2) = FA(0) + aC_p - bC_p^2 \quad (3)$$

The first-order term reflects Cu's nutritional effect and the second-order term its toxicity. Their relative magnitudes are indicated by the coefficients a ($\text{cm}^2/\text{mg kg}^{-1}$) and b [$\text{cm}^2/(\text{mg kg}^{-1})^2$], while $FA(0)$ (cm^2) is the residual FA independent of Cu. As seen in Fig. 3, Eq. 3 fitted the data very well ($R^2=0.97$), with the values of $FA(0)$, a , and b resulting as 194.59 ± 22.16 ($P=0.0031$), 11.17 ± 1.608 ($P=0.0061$), and 0.187 ± 0.024 ($P=0.0042$), respectively, in the appropriate units. This indicates that the toxicity of Cu to the FA of *A. dentata* is a second-order effect whose impact is felt only at high environmental Cu concentrations. The analysis of Eq. 3 revealed a maximum FA at the shoot C_p of $29.86 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ dry shoot, which is at the limit of the range normally tolerated by plants

Fig. 3 A plot of the foliar area (FA) of *A. dentata* with the C_p of the aerial part. The dotted line shows the fit, $R^2=0.97$, to the parabolic function of Eq. 3



(Section 1). This value corresponded to a C_s in the range of $\sim 1,000 \text{ mg Cu kg}^{-1}$. *A. dentata*'s foliage therefore possesses an appreciable degree of tolerance to elevated Cu concentrations in soil. It is conceivable that a similar pattern is also followed by other Cu-tolerant species with the relative magnitudes of a and b indicating the plant's degree of sensitivity to the beneficial and adverse effects of Cu on its FA expression. To observe both these effects, the background Cu concentration must be kept low, as for instance in this experiment where no synthetic nutrients were applied.

Since changes in growth are often the first and most obvious reactions of plants subjected to metal stress (Hagemeyer 2004), biometric changes could present the opportunity to qualify visual manifestations of Cu-induced stress. Figure 4 shows the experimental results of the plant H , MTD, and the sum of H and MTD ($H + \text{MTD}$), as they vary with C_p . All values refer to the quantities measured at harvest time. The sum $H + \text{MTD}$ approximately tracks the overall metabolic resource for shoot biomass growth. This depends, among other factors, on the quanta of photosynthetic energy collected, which in turn is proportional to the plant FA. Thus, the $H + \text{MTD}$ factor is expected to approximately follow the same trend as the FA with C_p . This is indeed the case—the $H + \text{MTD}$ also follows a parabolic trend

(Fig. 4). The linear correlation between $H + \text{MTD}$ and FA is good ($R^2=0.91$, graph not shown). Furthermore, for a given amount of energy available toward growth in the vertical and horizontal directions, Fig. 4 shows that the allocation to either H or MTD follows a mutually exclusive pattern—when more is allocated toward H correspondingly less goes toward MTD and vice versa, so that the trends of H and MTD are point-wise opposite. However, this partitioning is not exactly equal. Plant heights traverse higher amplitudes with the variation of C_p than MTD, making the trace of H determine the trace of the overall approximate aerial biomass tracking index, $H + \text{MTD}$. This seems to indicate that in the young *A. dentata*, metabolic energy in shoot growth is preferentially allocated more to plant height than to plant transverse extension.

3.4 Plant Biomass (B_p) Variation with C_p and the Mass of Metal Extracted (M_p)

Biomass is an important consideration in phytoremediation as it relates directly to the efficiency of metal extraction (Section 1). The variation of the experimentally obtained dry tissue biomass, B_p , with C_p for the roots, shoots, and the whole plant is shown in Fig. 5. The B_p of *A. dentata* in a high Cu environment is found to vary little. Relatively, the largest steady

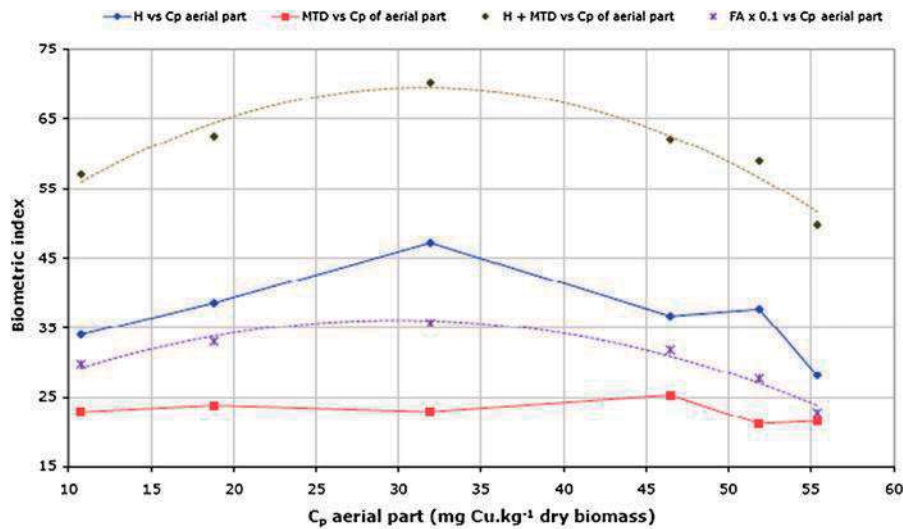


Fig. 4 Plots of the FA and the plant biometrics, viz. the plant height (H , cm), the plant's maximum transverse diameter (MTD , cm), and the sum of H and MTD ($H + \text{MTD}$, cm), with respect to C_p . The FA has been scaled down by a factor of 0.1 to allow accommodation in the same graph. The straight

lines between the points are merely linear connectors. The dotted line on the $H + \text{MTD}$ graph is the regression fitted line to a parabolic curve with the R^2 value of 0.94, while the dotted line on the FA graph is the parabolic fit of Fig. 3

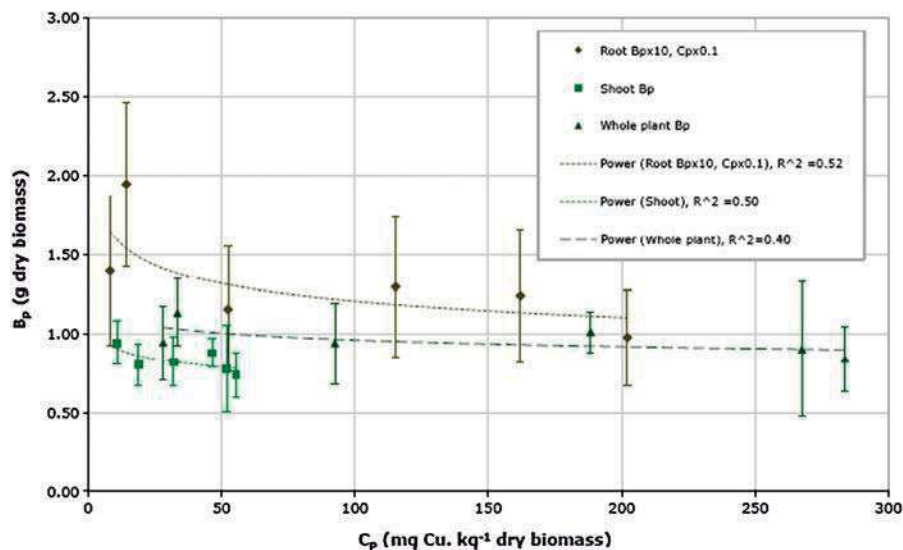


Fig. 5 The variation of the dry biomass, B_p (g) of the root, the shoot, and the whole plant with respect to the C_p in the respective plant parts. The experimental B_p for the root was scaled up by a constant factor of 10 and the C_p scaled down by

the factor of 0.1 so as to fit the data in the same graph. The dotted lines are the fits to Eq. 5, where the R^2 value for the root is for the unscaled data

reduction is in the root, which accumulates the most Cu, and the least in the shoot where the stored Cu content is very low. Uptake processes that require chemical metabolic energy (active processes) would be expected to reduce the biomass as a consequence of energy budgeting between growth and uptake under the condition of a fixed input energy represented by constant ambient growth conditions (Nobel 1999). Such conditions were met in the present experiment. On the other hand, metal uptake by metabolic energy-neutral (passive) processes such as diffusion–adsorption (Nobel 1999) would not be expected to detract from the biomass, although there could be secondary sources of diminution as a consequence of metal acquisition. Figure 5 indicates that Cu uptake in *A. dentata* involves little decrement of growth-promoting metabolic energy, indicating the relative importance of passive processes. Evidence in the literature (Allan and Jarrel 1989; Bernal et al. 2006; Komárek et al. 2010) indicates that Cu in the root is mainly fixed in the apoplasm where it attaches itself to the negatively charged components of the cell walls and does not enter the root cells.

However, for the aerial part, the finite values of C_p suggest that some xylem loading takes place, but apparently again (Fig. 5) involving only little metabolic energy expenditure. This suggests that passive

processes could be important for shoot transport (Peer et al. 2005), as well in *A. dentata*. Interestingly for all plant parts, Fig. 5 shows that there is a slight increase in B_p following the initial decrease at C_p values corresponding to the C_s between 2,000 and 3,000 mg Cu kg⁻¹. This is somewhat above the range where the FA reaches its maximum. Possibly, the initial increase of the photosynthetic energy harvest with increasing FA (Fig. 3) might help ameliorate the Cu toxicity-induced reduction of B_p in the shoot. Since the root accumulates the most Cu, the toxicity effect (elsewhere seen to be second order in C_p ; Section 3.3) could be relatively more assertive and cause the comparatively steeper decline, as observed in Fig. 5.

To represent the physiological response of the plant to the Cu burden as seen through its biomass, we take recourse to the landmark theory of West and Brown (2005) which postulates that all physiological phenomena in living organisms follow a universal allometric scaling law, given as:

$$Y = Y_0 M_b^b \tag{4}$$

where Y is some observable physiological quantity, Y_0 is a normalization constant, M_b is the biomass of the organism, and b the power-law exponent that takes on a

limited set of values, typically simple multiples of 1/4 in the case of scaling with biological sizes and rates. Turning Eq. 4 around, the biomass can be expressed as:

$$M_b = \left(\frac{1}{Y_0}\right)^{\frac{1}{\beta}} Y^{\frac{1}{\beta}} = \alpha Y^{\beta} \tag{5}$$

In the present experiment, B_p would be expected to vary in the manner of Eq. 5 with respect to the physiology-dependent observable, C_p . The results are shown by the dotted lines in Fig. 5. The values of the factors α and β for the root, whole plant, and shoot, as well as the statistical parameters of the fits, are shown in Table 2. As alluded to in Dasgupta-Schubert et al. (2007), α is an amplitude parameter that corresponds to the biomass of the plant part for the unstressed plant, i.e., the control, with its small but finite value of Cu micronutrient concentration, $C_p(0)$. The β on the other hand is the parameter that defines the degree to which the higher HM concentration ($C_p > C_p(0)$) affects the biomass.

Equation 5 only loosely fits the data. The fit is relatively the best for the root where the sensitivity of B_p to C_p is the strongest, but not so well for the shoot. This contrasts with the very good fits of Eq. 5 to the whole plant B_p in the case of *B. juncea* seedlings grown in gel substrate spiked with dissolved Ni (Dasgupta-Schubert et al. 2007) where the reduction of B_p was strong and monotonic, resulting consequently in a higher magnitude of β . The factors of the low shoot translocation that diminishes B_p 's sensitivity to C_p , of possibly the dual role of Cu, and perhaps most importantly the higher degree of precision uncertainty of the experimentally observed quantities of Cu-accumulating plants (cf. Section 3), affect the

Table 2 Values of the parameters α and β of Eq. 5 obtained from the fits of the experimental dry biomasses of the root, shoot, and whole plant of *A. dentata* to the C_p of the corresponding plant parts

Plant part	α	β
Root	0.285±0.032 <i>P</i> <0.0001	-0.125±0.023 <i>P</i> =0.0029
Shoot	1.118±0.067 <i>P</i> <0.0001	-0.088±0.021 <i>P</i> =0.0400
Whole plant	1.276±0.083 <i>P</i> <0.0001	-0.062±0.016 <i>P</i> =0.0400

fit to Eq. 5 in the present case. In sum, despite modulations, a loose general conformity to Eq. 5 is obtained, lending support to the essence of West and Brown's concept. Thus, Eq. 5 and the magnitude of factor β might allow a quantitative view of the extent to which the plant's metabolic energy is diverted from biomass production to coping with HM stress under the conditions of the specific physiological effect of the metal and its transport.

The near constancy of the shoot B_p with C_p in this plant at least lends credence to the simplified assumption of constant biomass yield irrespective of C_s in successive crop cycles, employed by some authors (Reeves and Baker 2000; McGrath and Zhao 2003). This facilitates the estimation of the HM yield, M_p , in successive harvests. The plot of the whole plant M_p with C_p is shown in Fig. 6. The slow variability of the whole plant B_p across the range of C_s of the present work essentially allows B_p to behave as a constant, leading to a near straight line dependence of M_p with C_p with the slope approximately given by B_p , as shown in the figure. In such a case, the rate of metal mass extracted from the soil with respect to the plant's HM concentration would depend very largely only on the achievable plant biomass in the given growth cycle.

3.5 Cu Uptake by *S. vulgaris* and Comparison with *A. dentata*

3.5.1 C_p Versus C_s Response Curves

Song et al. (2004) have studied the capacity of *S. vulgaris* (Moench) Garcke, a relatively well-known Cu ME (van Hoof et al. 2001), to accumulate Cu from a variety of aged Cu-contaminated soils. They constructed the C_p - C_s curves for a C_s corresponding to total soil Cu (C_s) as well as soil solution Cu (C_s^{sol}) in the form of log-log curves that were regression fitted to straight lines for subsequent interpretation. Their results are reproduced (see footnote 1) in Fig. 7a, b. The double log scale depresses the sensitivity of the underlying functional relationship, such as might exist between C_s and C_p , which could yield clues to the mechanism of metal translocation from the soil to the plant. To unearth the trend between C_s and C_p in their data, we re-plotted their data in the linear Y-axis scale, shown in Fig. 8a, b. The trends now are seen to corroborate the classic conceptualized

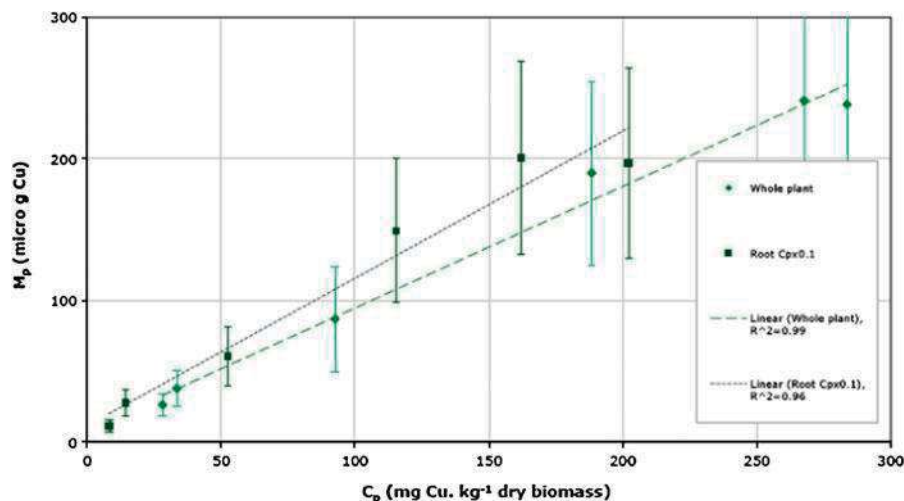


Fig. 6 The variation of the mass of metal extracted $M_p (=C_p \cdot B_p)$ by the root and whole plant with their corresponding C_p . The C_p values for the root have been multiplied by the constant 0.1 to accommodate its data in the same graph. The *dashed* and *dotted*

lines are the linear fits with R^2 values as indicated by the legend. The *error bars* are those propagated over the errors of both experimentally obtained quantities, C_p and B_p

compartment of an ME plant (Baker 1981). The question now remains as to whether the C_p-C_s model developed by us in Section 3.2 is a general one and applies to this plant as well. The dotted lines in Fig. 8a, b correspond to the fits to Eq. 2. The fits are excellent.

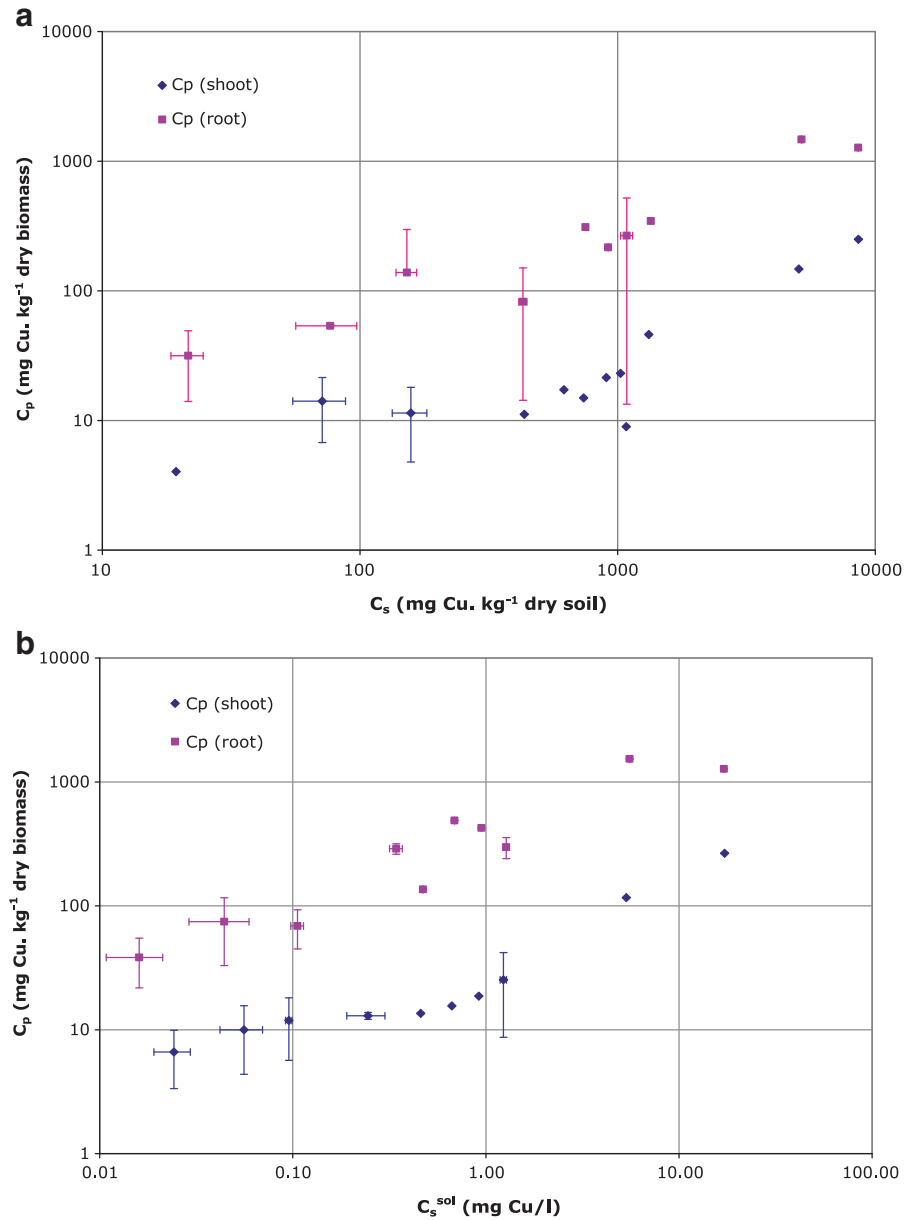
The model replicates the fundamental response of the ME plant to the dissolved metal in the environment (the $C_p-C_s^{sol}$ curve) as well as its response to the total metal (the C_p-C_s curve). However, as the plant can only absorb the dissolved metal species, the $C_p-C_s^{sol}$ is the primary response curve. It is modulated in amplitude, but not in form, by the solubility yield of the metal in the secondary response represented by the C_p-C_s curve, as discussed in the next section.

3.5.2 r and K , C_s , and C_s^{sol}

The relevant parameter values for the fits in Fig. 8a, b are given in Table 1. The K values are nearly the same in both the C_p-C_s and the $C_p-C_s^{sol}$ curves for both the root and the shoot. The capacity factor K is related to the maximum Cu concentration that the plant can take up at the maximum of the dissolved Cu concentration range of the study ($C_s^{sol}(\max)$) and is independent of the solubility yield factor ε that translates from C_s^{sol} to C_s . This is seen from Eq. 1 where at large values of C_p approaching K , $dC_p/dC_s \rightarrow 0$, leading to a constant value for $C_p (=K)$ independent of the C_s . To obtain K , the C_s^{sol} and therefore C_s should span a range large enough to

allow the saturation of C_p to set in. K depends on the total number of MBS that the given mobile Cu species is associated with at $\geq C_s^{sol}(\max)$ and is therefore dependent on the particular HM accumulation physiology of the plant. A comparison between the results for *S. vulgaris* and *A. dentata* shows that the latter has a higher K in the root at lower maximum C_s , but a lower value for the shoot. Given the evidence that Cu is mainly adsorbed onto the cell walls of the root (Section 3.4), a large root K factor would indicate that the Cu has access to large root surface area. If the root surface area increases (finer, highly ramified root architecture), but not by an equivalent scale the root volume, the root's Cu concentration, $C_p(\text{root})$, and the factor K would increase. The surface area would increase the available MBS and therefore the total mass of metal $M_p(\text{root})$, but the slower increase in root volume would not increase root B_p equivalently, thus increasing $C_p(\text{root}) = M_p(\text{root})/B_p(\text{root})$. One goal of utilizing plants such as *A. dentata* for phytostabilization might then be to increase the root surface area, for instance possibly by mycorrhizal symbiosis where the hyphae of the fungus increase the root exploratory zone (Gaur and Adholeya 2004; Göhre and Paszkowski 2006). The K values in the root and shoot of *S. vulgaris* seem to indicate that the metal first accumulated in the root is later translocated in larger quanta to the shoot as compared to *A. dentata*, which results in its lower K (root). The strong suppression of shoot Cu translocation

Fig. 7 a The variation of the C_p in the dry shoot and root tissue of *S. vulgaris* (Song et al. (2004)) with respect to C_s , plotted in the log X -log Y scale. (N.B. y-axis error bars that resulted in negative extrema cannot be displayed in a log scale.). **b** The variation of C_p of the dry shoot and root of *S. vulgaris* with respect to the Cu concentration of the soil solution, C_s^{sol} (mg Cu/l). The rest is the same as in Fig. 7a



is a protective strategy by *A. dentata*, making it more of a typical excluder than *S. vulgaris*.

From Eq. 1, at values of C_p much lower than saturation where the value of the rate factor is non-zero and for a plant with a high K factor (which are the only plants of interest to phytoremediation), the second term in the bracket may be neglected, resulting in the rate factor

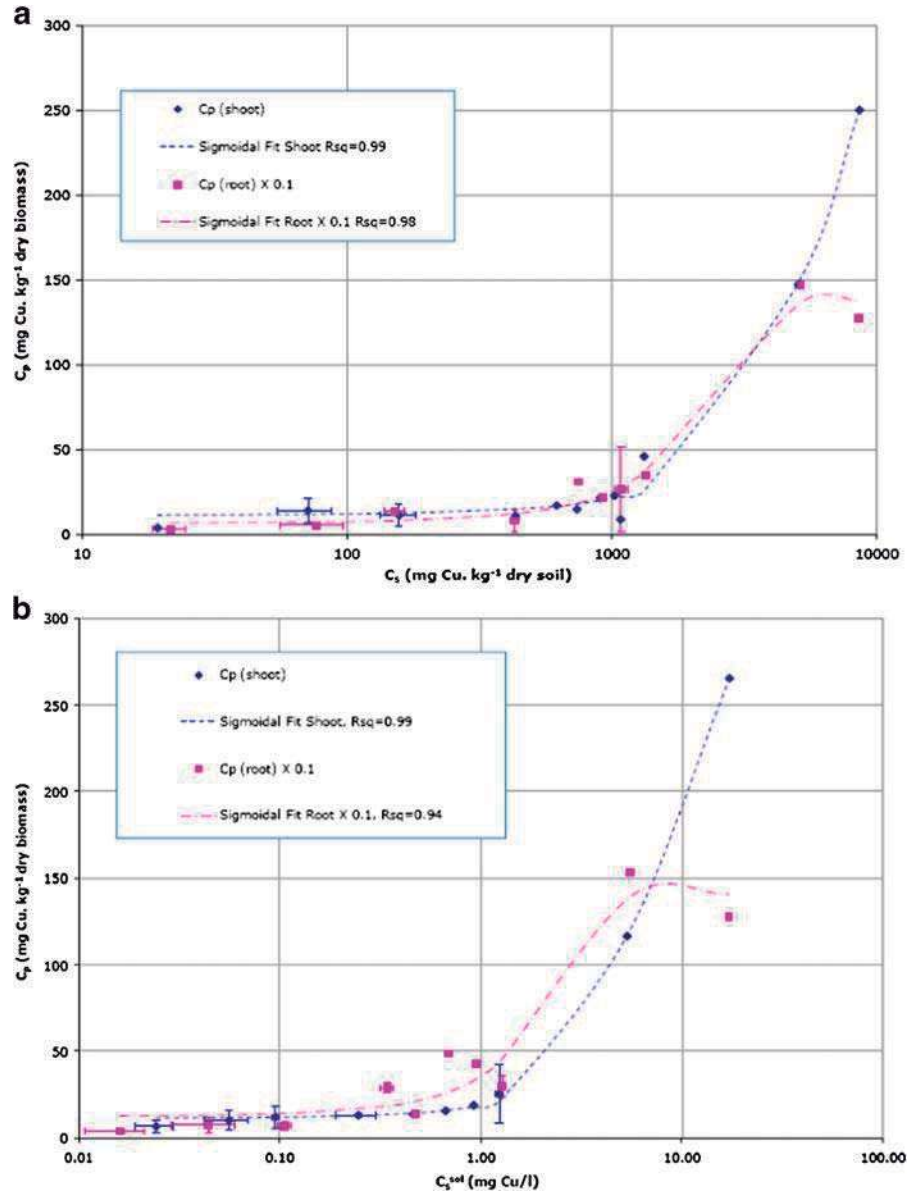
$$r \approx \left(\frac{1}{C_p}\right) \frac{dC_p}{dC_s} \approx \left(\frac{1}{C_p}\right) \frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad (6)$$

The definition of the solubility yield factor ϵ results in

$$\epsilon = \frac{\Delta C_s^{sol}}{\Delta C_s} \quad (7)$$

where ΔC_s and ΔC_s^{sol} are the incremental increases of C_s and its corresponding C_s^{sol} . The factor ϵ implicitly includes the phytoavailable fraction of the dissolved metal in the given total metal content of the soil (Krishnamurti and Naidu 2002). The conversion from the r factor determined in the C_p - C_s response curve,

Fig. 8 a The same data as in Fig. 7a for the shoot and root of *S. vulgaris* for the linear y-axis scale. Values for the root have been scaled down by a constant factor of 0.1 to allow accommodation in the same graph. The dotted lines show the fits to Eq. 2. $R^2=0.99$ for shoot and 0.98 for root (unscaled data). **b** The same as in Fig. 7b for the shoot and root of *S. vulgaris* for the linear y-axis scale. Values for the root have been scaled down by a constant factor of 0.1 to allow accommodation in the same graph. The dotted lines show the fits to Eq. 2. $R^2=0.99$ (shoot) and 0.94 (root, unscaled data)



r_{C_p, C_s} , to the r factor determined in the $C_p-C_s^{sol}$ response curve, $r_{C_p, C_{ssol}}$, is then,

$$\frac{r_{C_p, C_s}}{r_{C_p, C_{ssol}}} = \frac{(1/C_p)(\Delta C_p/\Delta C_s)}{(1/C_p)(\Delta C_p/\Delta C_s^{sol})} = \varepsilon \quad (8)$$

The $r_{C_p, C_{ssol}}$ represents the rate factor driven by the plant only, while the r_{C_p, C_s} is the same rate factor modulated by HM soil solubilization factor ε .

For a particular value of C_p much lower than saturation, the magnitude of increase of metal ingress within the plant (ΔC_p) for an incremental increase in

the soluble metal concentration in the soil (ΔC_s^{sol}) would determine the magnitude of the $r_{C_p, C_{ssol}}$ rate factor (Eq. 6). Again, the root architecture would play an important role in the magnitude of ΔC_p for adsorption-driven uptake mechanisms, while the solubility yield of the soil might be improved by the addition of suitable soil amendments, yielding an increase in the r_{C_p, C_s} rate factor (Eq. 8).

For sparingly soluble soil metals in the low range of C_s for which the r factor is applicable, the graph of C_s^{sol} versus C_s is very nearly linear passing through 0, as has been observed for *S. vulgaris* and *A. dentata*

(graph not shown), resulting in a near constant value of ε that is very low (of the order of 10^{-3}). Resultantly, the r values of the soil total metal response curves are about three orders of magnitude lower than the r values for the soil solution metal curves as seen in Table 1. Hence, for such metal-phyte–soil conditions, both types of response curves give equal information. The curve with respect to soil total metal yields a rate factor depressed in amplitude but otherwise exhibits the same sigmoidal relationship to C_p . Ideally, the analysis of C_p – C_s curve using this model might allow an indexing (via r) of how much solubilized metal is available in one soil type with a range of C_s versus another with similar C_s values, other variables remaining the same (e.g., physiology of the plant, HM species in the phytoavailable fraction), while the K factor affords an indexing of how capable the plant is in accumulating the dissolved metal. In phytoremediation, the maximal capacity of the plant to accumulate the HM, K , is of significant interest and, as seen, can be derived equally from the C_p – C_s or C_p – C_s^{sol} response curves. This and the observation in the preceding sentence might suggest potentially useful applications of the C_p – C_s curve given the fact that regulatory bodies specify limits based also on soil total metal (Peer et al. 2005).

Finally, the shoot B_p versus the C_p plots for *S. vulgaris* demonstrated the same general compliance with the power-law variation of Eq. 5 (graph not shown). Interestingly, the values of 1.14 and 0.087 for the constants α and β are very similar to the corresponding ones for *A. dentata* (Table 2), which demonstrates that the two plants possess similar metabolic–physiological responses to Cu stress.

3.6 Comparison, Scope, and Limitations of the “ r/K ”-Based Model

Robinson et al. (2003) have presented a semi-reductionist model of phytoextraction that utilizes various soil and plant factors to predict the change in soil HM content upon phytoextraction. Subsequently, they use it to construct a decision support system to aid the commercial exploitation using the known experimental results of Ni phytoextraction with the MHA, *B. codii*. The model is extensive and represents a substantial advance. However, it entails prior experimental knowledge or a reliable database of several biogeochemical parameters as functions of growth time

of the desired plant–soil–HM combination. This requires extensive experimentation. Even so, some parameters such as the “root density fraction” might be difficult to obtain accurately, especially in the field.

Such complexity is the hallmark of ecobiological organisms, to address which some workers (Noble 2006) take recourse to the paradigm of the generalized theory of systems that emphasizes “holism over reductionism, organism over mechanism” (von Bertalanffy 1968). An overarching goal of systems biology stated by its practitioners is the understanding of the organism by information flow, in analogy with an electronic circuit (Nurse 2008)—the input signal (external stimulus) is processed by the organism considered analogously as the black box, to produce the output signal (the response).

Utilizing an approach inspired by such conceptualization, the output signal (response) of the plant (*A. dentata*) constitutes its C_p , while the input signal (environmental Cu stimulus) is the C_s (or C_s^{sol}). In other words, the various processes responsible for the phytoavailability of the HM are integrated into C_s and the various plant uptake processes are integrated into C_p . Separate considerations of the individual mechanisms that govern a certain input signal (soil–plant factors that control C_s^{sol}) and its corresponding output signal (plant parameters governing C_p) are not within the model’s scope. Suffice to say that a change in the different biogeochemical factors involved will affect the input signal that in turn will be processed differently to produce the altered output signal whose combined change is analyzed mathematically to produce the idea of the plant’s response to the HM (at the whole system level). For instance, a change in the solubility of the Cu in the soil, induced for example by change in pH, will change the ε factor, i.e., rC_p, C_s will change, but not the rC_p, C_{ssol} nor the K if the rest of the variables, such as type of HM species in the phytoabsorbed fraction and the plant’s growth physiology, remain the same. Enhancing the solubilization by soil amendments might change the identity of the HM species in the phytoavailable fraction, which might likely change the C_p – C_s^{sol} and the C_p – C_s response curves and the K factor. Further work on a variety of ME plant–HM–soil combinations are necessary to test these conjectures.

The model’s chief objective is to provide a simple modus to facilitate the quantitative assessment of

phytoaccumulation efficiency (Sections 1, 3.2, 3.4), with the example of an ME plant such as *A. dentata*. It cannot provide an understanding of the fundamental soil–HM–plant interaction at the molecular level. This is a restriction inherent in its approach and limits its wider applicability. Molecular models focused on distinct and separate features of the vast environment–plant–HM landscape attempt to provide an understanding relevant to their particular domains. The biotic ligand model has been proposed as a tool to evaluate quantitatively the manner in which water chemistry affects the speciation and biological availability of metals in aquatic systems (Paquin et al. 2002). It has been implemented by the US EPA for evaluating water quality criteria for Cu (EPA no. 822R03027, US Environmental Protection Agency 2003). However, significant challenges to its implementation for plants in soil remain (see review by Antunes et al. 2006). One of these is stated to be the need for the identification of the “simplest model that can adequately predict root accumulation” (Antunes et al. 2006). It is hoped that further experimental testing and improvement of the present model might allow a contribution to this goal. In perspective, the r/K -defined Verhulst population dynamics model (Verhulst 1838)—perceived as one strand of the historical roots of systems biology (Golden et al. 2009)—is widely used for its simplicity, but does not incorporate specific mechanistic aspects. Over time, the model has been improved by the incorporation of different levels of complexity (see, e.g., Begon et al. 1998).

4 Summary and Conclusions

Aspects of the EP response of the plant *A. dentata* to high soil Cu(II) concentrations and its associated effects have been investigated in depth in this work:

1. Plant FA, biometrics and biomasses were measured with the view of investigating how Cu stress manifests in factors that affect/are the consequences of photosynthesis and energy budgets. The FA showed the dual nature of Cu as a beneficial micronutrient and as a toxin at low and high concentrations, respectively. A simple parabolic fit suggests that the toxicity is a second-order effect. The plant biometric of height + maximum transverse diameter, tracked the FA, i.e., the net photosynthetic energy harvest.
2. Using population growth mathematics as *ansatz*, an r/K -driven model is proposed that satisfactorily explains the C_p versus C_s EP response curves for all plant parts. This adaptation of the well-known macroscale ecological model to the localized “ecology” of metal ions occupying plant-binding sites represents a new mode of the quantitative analysis of metal concentration profiles. *A. dentata* was found to selectively concentrate Cu in its root while strongly suppressing translocation to the shoot—the typical response of an excluder (ME).
3. The slow decrease of the biomass (B_p) with C_p approximately conformed to the power-law variability expected from the universal allometric scaling law connecting biomass with organismic variables despite factors such as the precision variability over both experimental quantities (B_p and C_p) and the modulation produced by the dual role of Cu. This power-law variation offers a quantitative insight into the balancing of metabolic energy between growth and metal stress.
4. The general applicability of the r/K model describing the C_p – C_s response was tested by its application to the published data of the relatively well-known Cu ME, *S. vulgaris*, where the fit was found to be good. The model-based comparison of the two plants shows that *A. dentata* has a high capacity (K) factor in the root, but less than *S. vulgaris* in the shoot. The rate (r) and K factors suggest the possibility of a unified, quantitative manner of comparing soil metal availability to the plant and its concomitant metal accumulation capability.
5. The high Cu storage in the roots of *A. dentata* with almost no diminution of its whole plant B_p makes it attractive as a possible Cu phytostabilizer.

Acknowledgment The authors thank Prof. C. Schubert (UMSNH, Mexico) for his help and suggestions, M.R. Cisneros (UMSNH, Mexico) and Dr. A. Chavez-Garcia (UMSNH, Mexico) for technical assistance, Professors. F-J. Zhao (IACR-Rothamstead, UK) and A.J.M Baker (University of Melbourne, Australia) for useful discussions during the 10th ICOBTE Conference in Chihuahua, Mexico, in July 2009, and the anonymous referee for helpful recommendations. Funding for this work was provided by CONACyT of Mexico and the University of Texas (Austin) student research scholarship.

References

- Allan, D. L., & Jarrel, W. L. (1989). Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiology*, *89*, 823–832.
- Antunes, P. M., Berkelaar, E. J., Boyle, D., Hale, B. A., Hendershot, W., & Voigt, A. (2006). The biotic ligand model for plants and metals: Technical challenges for field application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*, 875–882.
- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and excluders: Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, *3*, 643–654.
- Baker, A. J. M. (2009). Private communication at the 10th International Conference on the Bio-geochemistry of Trace Elements. Chihuahua, Chih., Mexico.
- Begon, M., Harper, J. L., & Townsend, C. R. (1998). *Ecology: Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science.
- Bernal, M., Sánchez-Testillano, P., del Carmen Risueño, M., & Yruela, I. (2006). Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells. *Functional Plant Biology*, *33*, 1001–1012.
- Calabrese, E. J., & Blain, R. B. (2009). Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, *157*, 42–48.
- Chaney, R. L. (2009). Private communication at the 10th International Conference on the Bio-geochemistry of Trace Elements. Chihuahua, Chih., Mexico.
- Chaney, R. L., Scott Angle, J., Leigh Broadhurst, C., Peters, C. A., Tappero, R. V., & Sparks, D. L. (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields, commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality*, *36*, 1429–1443.
- Dasgupta-Schubert, N., Whelan, T., Reyes, M. A., Lloren, C., Brandt, T. T., & Persans, M. W. (2007). Light quanta modulated characteristics of Ni uptake by *Brassica juncea* seedlings: The interdependence of plant metal concentration and biomass. *International Journal of Phytoremediation*, *9*, 207–225.
- Ducic, T., & Polle, A. (2005). Transport and detoxification of Mn and Cu in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*, 103–112.
- Duncan, K. E., Ferguson, N., & Istock, C. A. (1995). Fitness of a conjugative plasmid and its host bacteria in soil microcosms. *Molecular Biology and Evolution*, *12*, 1012–1021.
- Ernst, W. H. O. (2005). Phytoextraction of mine wastes—Options and impossibilities. *Chemie der Erde—Geochemistry*, *65*, 29–42.
- Gaur, Atimanav, & Adholeya, Alok. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Current Science*, *86*, 528–534.
- Ginocchio, R., & Baker, A. J. M. (2004). Metallophytes in Latin America: A remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Revista Chilena de Historia Natural*, *77*, 185–194.
- Göhre, V., & Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, *223*, 1115–1122.
- Golden, A., Sneider, C., Farmer, E., & Gould, A. (2009). Population growth. Global Systems Science, Lawrence Hall of Science, University of California, Berkeley. <http://www.lawrencehallofscience.org/gss/sb/populationgrowth.html>.
- Greger, M. (2004). Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In M. N. V. Prasad (Ed.), *Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*, 2nd ed. (pp. 1–27). Berlin: Springer.
- Hagemeyer, J. (2004). Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. In M. N. V. Prasad (Ed.), *Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems*, 2nd ed. (pp. 201–222). Berlin: Springer.
- Komárek, M., Cadková, E., Chrástný, V., Bordas, F., & Bolliger, J.-C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, *36*, 138–151.
- Koopmans, G., Ramkens, P., Song, J., Temminghoff, E., & Japenga, J. (2007). Predicting the phytoextraction duration to remediate heavy metal contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution*, *181*, 355–371.
- Krishnamurti, G. S. R., & Naidu, R. (2002). Solid-solution speciation and phytoavailability of copper and zinc in soils. *Environmental Science & Technology*, *36*, 2645–2651.
- Landsberger, S., Cizek, W. D., & Domagala, P. (1992). NADA: A versatile PC based program for neutron activation data analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *160*, 277–287.
- Liang, H.-M., Lin, T.-H., Chiou, J.-M., & Yeh, K.-C. (2009). Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. *Environmental Pollution*, *157*, 1945–1952.
- Maksymiec, W. (1997). Effect of Cu on cellular processes of higher plants. *Photosynthetica*, *34*, 321–342.
- Mandel, J. (1984). *The statistical analysis of experimental data, Chapter 4*. New York: Dover.
- McGrath, S. P., & Zhao, F.-J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinions in Biotechnology*, *14*, 277–282.
- McGrath, S. P., Dunham, S. J., & Correll, R. L. (1999). In N. Terry & G. S. Bañuelos (Eds.), *Phytoremediation of contaminated soil and water* (pp. 109–128). Boca Raton: Lewis.
- Nobel, P. S. (1999). *Physicochemical and environmental plant physiology*. San Diego: Academic.
- Nobis, M., & Hunziker, U. (2005). Automatic thresholding for hemispherical canopy-photographs based on edge detection. *Agricultural and Forest Meteorology*, *128*, 243–250.
- Noble, D. (2006). *The music of life: Biology beyond the genome*. Oxford: Oxford University Press.
- Nurse, P. (2008). Life, logic and information: Focussing on information flow will help us to understand better how cells and organisms work. *Nature*, *454*, 424–426.
- O'Neal, M., Landis, D. A., & Isaacs, R. (2002). An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *Journal of Economic Entomology*, *95*, 1190–1194.
- Páez-Osuna, F., Guerrero-Galván, S. R., & Ruiz-Fernández, A. C. (1998). The environmental impact of shrimp aquacul-

- ture and coastal pollution in Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 65–75.
- Paquin, P. R., Gorsuch, J. W., Apte, S., Batley, G. E., Bowles, K. C., Campbell, P. G., et al. (2002). The biotic ligand model: A historical overview. *Comparative Biochemistry & Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, 133, 3–35.
- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., & Murphy, A. S. (2005). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In Tamás, M.J., Martinoia E. (Eds.) *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. Topics in Current Genetics*, 14, 299–340.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15–39.
- Pittenger, D. R. (1986). Potting soil label information is inadequate, key properties are not listed. *California Agriculture*, 40, 6–8.
- Reeves, R. D., & Baker, A. J. M. (2000). In I. Raskin & B. D. Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment* (pp. 193–231). New York: Wiley.
- Rehm, G., & Schmitt, M. (2002). Copper for crop production. University of Minnesota Extension. <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/DC6790.html>.
- Reynolds, B. (1984). A simple method for the extraction of soil solution by high speed centrifugation. *Plant and Soil*, 78, 437–440.
- Robinson, B., Fernández, J.-E., Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J. M., Green, S., et al. (2003). Phytoextraction: An assessment of biogeochemical and economic viability. *Plant and Soil*, 249, 117–125.
- Robinson, B. H., Schulin, R., Nowack, B., Roullet, S., Menon, M., Clothier, B., et al. (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *Forest Snow and Landscape Research*, 80, 221–234.
- Rothamstead Research Laboratory Methods version 896/019 (2004). Rothamstead Research, Harpenden, Hertfordshire, UK. <http://www.rothamsted.ac.uk/aen/smbweb1/methods.php?id=896>.
- Ruelas-Inzunza, J., Páez-Osuna, F., & García-Flores, D. (2010). Essential (Cu) and non-essential (Cd and Pb) metals in ichthyofauna from the coasts of Sinaloa state (SE Gulf of California). *Environmental monitoring and assessment*, 162, 251–263.
- Rzedowski, G. C., & Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México, 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/aldama-dentata/fichas/ficha.htm>.
- Song, J., Zhao, F.-J., Luo, Y.-M., McGrath, S. P., & Zhang, H. (2004). Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 128, 307–315.
- Systat Software Inc. (2008). SigmaPlot® v.10 for Windows. Systat Software Inc., San Jose, CA, USA.
- US Environmental Protection Agency (1996). Method 3050b Rev. 2, December. Acid digestion of sediments, sludges and soils. <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>.
- US Environmental Protection Agency (2003). The biotic ligand model: Technical support document for its application to the evaluation of water quality criteria for copper. EPA No. 822R03027 <http://yosemite.epa.gov/water/owrcatalog.nsf/0/e693bcf79893c3e085256e23005fcd3b?OpenDocument>.
- van Hoof, N., Hassinen, V. H., Hakvoort, H. W. J., Ballintijn, K. F., Schat, H., Verkleij, J. A. C., et al. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, 126, 1519–1526.
- van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., & Verheyen, K. (2007). Phytoextraction of metals from soil: How far from practice? *Environmental Pollution*, 150, 34–40.
- Verhulst, P. F. (1838). Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Correspondence Mathématique et Physique*, 10, 113–121.
- von Bertalanffy, L. (1968). *General systems theory: Foundations, Development, Applications*. George Braziller, New York, USA.
- Weissstein, Eric W. “Logistic equation” (2010). From MathWorld—A Wolfram web resource. <http://mathworld.wolfram.com/LogisticEquation.html>.
- West, G. B., & Brown, J. H. (2005). The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: Towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 1575–1592.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145–156.
- Zhao, F.-J., Lombi, E., & McGrath, S. P. (2003). Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, 249, 37–43.

CAPÍTULO 5

Modelo de Respuesta ecofisiológica r/K aplicado a *T. erecta* micorrizada y no micorrizada con *G. intraradices*

MODELO DE RESPUESTA ECOFISIOLÓGICA r/K APLICADO A *Tagetes erecta* L. MICORRIZADA CON *Glomus intraradices*.

RESUMEN

El modelo de respuesta ecofisiológica r/K , desarrollado y corroborado previamente en plantas no micorrizadas excluidoras de Cu, *Aldama dentata* y *Silene vulgaris*, se empleó para modelar y analizar cuantitativamente el aporte de *Glomus intraradices* en la fitoacumulación y la capacidad de acumulación de Cu en la planta excluidora *Tagetes erecta*. Los valores numéricos del factor de capacidad (K) mostraron que la micorrización de *T. erecta* con *G. intraradices* (TeM) representa un beneficio para la planta ya que le brinda protección contra la toxicidad de Cu. Los valores del factor de proporcionalidad (r) indicaron que la raíz de TeM tiene mayor afinidad por el Cu que su contraparte no micorrizada (TeNM), debido a que presentan una mayor cantidad de estructuras (micelio interno, vesículas, arbusculos) que incrementan la capacidad de fijar Cu. El modelo r/K así como los valores numéricos de K y r brindan información significativa sobre los procesos fisiológicos involucrados en la absorción de metales pesados en plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Palabras clave: modelo r/K , *Tagetes erecta*, *Glomus intraradices*, Cu.

ABSTRACT

The ecophysiological response r/K -driven model, was developed and corroborated on non-mycorrhizal Cu excluders, *Aldama dentata* and *Silene vulgaris*. This model is now used to model the contribution of *Glomus intraradices* in the phytoaccumulation of Cu and the accumulation capability of the excluder *Tagetes erecta*. The numerical values of the capacity factor (K) showed that the mycorrhiza provides protection to *T. erecta* against the toxicity of Cu. The values of the rate factor (r) displayed that the mycorrhized root of *T. erecta* have higher affinity for Cu than non mycorrhized, because they present a larger number of structures (internal mycelium, vesicles, arbuscules) that increase the ability to fix Cu. The r/K -driven model and the numerical values of K and r provide useful information about the physiological processes involved in heavy metals uptake by mycorrhizal and non-mycorrhizal plants.

Keywords: *r/K*-driven model, *Tagetes erecta*, *Glomus intraradices*, Cu.

INTRODUCCIÓN.

Los mecanismos moleculares que rigen la homeostasis de metales pesados (MP) en vegetales, como respuesta a la concentración de MP en el suelo (C_s), son complejos. La respuesta eco-fisiológica de la planta, (o de sus tejidos específicos raíz o parte aérea) al estrés por MP se cuantifica con índices claves como: la concentración de MP en la planta (C_p), la producción de biomasa (B_p) y la masa de MP acumulado por la planta (M_p) ($M_p = C_p \cdot B_p$). Cuantificar M_p por ciclo de cosecha es importante para determinar la eficiencia de la fitorremediación (FR), ya que el objetivo de la FR es una conseguir una concentración de MP en el suelo aceptable, de acuerdo a las regulaciones ambientales, en un mínimo de tiempo (t), definido en términos de números de ciclos de cosecha (Peer *et al.* 2005). Cada ciclo remueve cierta cantidad de MP del volumen del suelo (V , m^3), de densidad d ($kg \cdot m^{-3}$), lo que reduce C_s proporcionalmente (van Nevel *et al.* 2007). Por lo tanto, en cada cosecha las variables son: C_s , C_p y B_p , mientras que V y d son constantes. El factor de bioconcentración (FBC) es la relación C_p/C_s y está involucrado en el cálculo de t .

De manera convencional, t se calcula asumiendo: 1) que B_p y C_p son constantes en cada cosecha e independientes de C_s , o 2) que FBC es constante ($C_p/C_s = \text{constante}$). Ambos casos implican perfiles lineales de concentración C_p-C_s . Sin embargo, éstas simplificaciones resultan en una subestimación de t (Zhao *et al.* 2003, van Nevel *et al.* 2007, Koopmans *et al.* 2007). Los perfiles vegetes no lineales C_p-C_s usualmente se ajustan a formas aproximadamente lineales mediante regresión estadística lineal, cuando ambas variables son transformadas logarítmicamente (Zhao *et al.* 2003, Koopmans *et al.* 2007, Liang *et al.* 2009). Al usar perfiles linealizados, se ha mostrado que el valor de t se incrementa considerablemente. Esto es, porque existen dos desventajas principales en este enfoque: 1) La transformación logarítmica de una gráfica no lineal reduce la sensibilidad de la cuantificación gráfica de tal manera que las ligeras variaciones no lineales del perfil C_p-C_s , se ocultan. 2) Si bien los modelos de regresión estadística lineal son útiles, son empíricos y no ayudan a esclarecer las fuerzas que rigen la respuesta eco-fisiológica de la planta.

Idealmente, el perfil no lineal C_p - C_s debe ser modelado a partir de los mecanismos fundamentales que rigen la respuesta de la planta. Esto se logra usando una función matemática que relacione C_p con respecto a C_s , y que incorpore los factores claves de los mecanismos reguladores. El enfoque tradicional para desarrollar un modelo es el denominado “reduccionista”, en donde se construye el modelo a partir de los procesos a nivel molecular hasta el organismo completo. Es difícil que este enfoque se aplique a sistemas planta-suelo-MP debido a la cantidad de variables y parámetros y sobre todo la dificultad de integrar los procesos biogeoquímicos a nivel molecular, muchos de los cuales no son conocidos. Se han empleado simplificaciones empíricas para desarrollar modelos *cuasi* mecanísticos, el más notable es el Sistema de Soporte de Decisión o “*Decision Support System*” (DSS por sus siglas en inglés) (Robinson *et al.* 2003). Sin embargo, la aplicación del DSS requiere *a priori* un amplio conocimiento de las propiedades físico-químicas del suelo, de las condiciones ambientales y de las características particulares del crecimiento de la planta en dicho suelo. Esto supone una extensa y compleja experimentación en campo. Hasta ahora el modelo DSS sólo ha sido validado para la hiperacumuladora *Berkheya codii* (Robinson *et al.* 2006).

Desde la mitad de la década de los ochentas, los biólogos teóricos se han inclinado por adoptar un enfoque a nivel de sistemas, conocido como “biología de sistemas” (Noble 2006). En este enfoque, se definen las fuerzas que impulsan los mecanismos a nivel de sistemas en todo el organismo. Las interacciones a nivel molecular se supone que están implícitamente integradas en el mecanismo a nivel de sistemas. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un modelo a nivel de sistemas para describir el perfil C_p - C_s de la planta o de sus órganos, el denominado modelo de respuesta ecofisiológica r/K (ecuación 1), elaborado por analogía con el modelo de dinámica de población de Verhulst (1838) que históricamente se ha considerado como el primer modelo con enfoque en biología de sistemas (Dasgupta-Schubert *et al.* 2011).

$$C_p = \frac{C_p(0)Ke^{rC_s}}{K + C_p(0)\{e^{rC_s} - 1\}} \quad (1)$$

Donde

r : es el factor de proporción “rate factor”, e indica la tasa de adquisición de metal a un valor dado de C_p .

K : Capacidad de almacenamiento de la planta.

$C_p(0)$: es la concentración basal de metal en la planta.

El modelo r/K fue simulado con datos experimentales de absorción de Cu obtenidos en el laboratorio con la planta *Aldama dentata* y corroborado con datos de absorción de Cu obtenidos de la literatura con *Silene vulgaris* (Dasgupta-Schubert *et al.* 2011, Song *et al.* 2004). Los factores r y K del modelo representan una nueva forma de analizar cuantitativamente la capacidad de acumulación de metales en plantas exclusoras (Dasgupta-Schubert *et al.* 2011). En el caso de *A. dentata* así como el de *S. vulgaris*, son especies vegetales exclusoras de Cu, además, es importante resaltar que eran plantas no micorrizadas. De acuerdo con la literatura revisada, no existen reportes sobre la implementación de modelos que simulen la respuesta eco-fisiológica al estrés metálico, de especies vegetales en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Debido a que la mayoría de las plantas terrestres forman simbiosis con HMA (más del 80%), resulta de gran importancia dilucidar el aporte de los HMA en la acumulación de MP, mediante la simulación de modelos de respuesta eco-fisiológica al estrés metálico.

Castillo *et al.* (2011) concluyen que de acuerdo a los valores obtenidos del factor de translocación (FT o *TF* por sus siglas en inglés) y del FBC o *BCF* (por sus siglas en inglés), *Tagetes erecta* es una especie exclusiva de Cu y que la simbiosis *T. erecta-Glomus intraradices* tiene un uso potencial para fitoestabilizar suelos contaminados con Cu. Con el objetivo de analizar cuantitativamente el aporte del HMA en la fitoacumulación de Cu en la simbiosis *T. erecta-G. intraradices*, en esta investigación se simularon los perfiles de concentración de Cu (C_p-C_s) de *T. erecta* micorrizada (TeM) y no micorrizada (TeNM) con *G. intraradices* obtenidos por Castillo *et al.* (2011), con el modelo de respuesta eco-fisiológica r/K .

METODOLOGÍA.

Los valores de concentración de Cu en raíces y parte aérea de *T. erecta* usados para la simulación del modelo r/K fueron los obtenidos por Castillo *et al.* (2011). La medición de la concentración de Cu en los tejidos de TeM y TeNM se realizó por espectroscopía de absorción atómica de flama (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de concentración de Cu en raíz, parte aérea y planta completa (C_p) de *T. erecta* no micorrizada y micorrizada con *G. intraradices*, a diferentes concentraciones de Cu en el sustrato (C_s), obtenidos de Castillo *et al.* 2011.

Tratamientos no micorrizados (TeNM)			
C_s (mg de Cu·kg ⁻¹ de sustrato seco)	C_p (mg de Cu·kg ⁻¹ de tejido seco)		
	Raíz	Parte aérea	Planta completa
0 (Control)	98.08 ± 22.62	ND	20.80 ± 12.13
500	202.16 ± 49.11	4.38 ± 1.41	35.44 ± 10.65
1000	352.64 ± 41.76	5.65 ± 0.73	62.82 ± 3.49
1500	528.98 ± 70.78	10.29 ± 5.90	113.25 ± 43.50
2000	780.10 ± 61.23	19.25 ± 0.48	208.63 ± 87.68
2500	1284.58 ± 238.23	283.95 ± 2.91	275.36 ± 1.49
Tratamientos micorrizados (TeM)			
C_s (mg de Cu·kg ⁻¹ de sustrato seco)	C_p (mg de Cu·kg ⁻¹ de tejido seco)		
	Raíz	Parte aérea	Planta completa
0 (Control)	5.61 ± 2.69	15.66 ± 1.14	0.88 ± 0.26
500	315.13 ± 24.24	23.57 ± 11.00	76.33 ± 8.71
1000	605.03 ± 10.66	36.18 ± 1.90	153.22 ± 28.41
1500	674.87 ± 42.32	34.05 ± 2.17	166.40 ± 17.77
2000	1113.82 ± 258.87	26.31 ± 1.41	252.01 ± 44.01
2500	1475.19 ± 12.45	18.47 ± 1.79	313.77 ± 72.40

ND: No determinada, valor por debajo del límite de detección de FAAS
Los valores corresponden al promedio de 5 replicados.

La simulación matemática de la ecuación (1) con los valores de concentración de Cu en raíces y parte aérea de TeM y TeNM (Cuadro 1), se realizó con el programa de análisis matemático y estadístico SigmaPlot V10® (Systat Software Inc.). Para simular el modelo r/K se programó la secuencia que se muestra en la

figura 1. Los resultados de la simulación con SigmaPlot fueron: los valores de los parámetros del modelo r/K (r y K), los valores tabulados de C_s y C_p del ajuste no lineal, el análisis estadístico y el coeficiente de correlación.

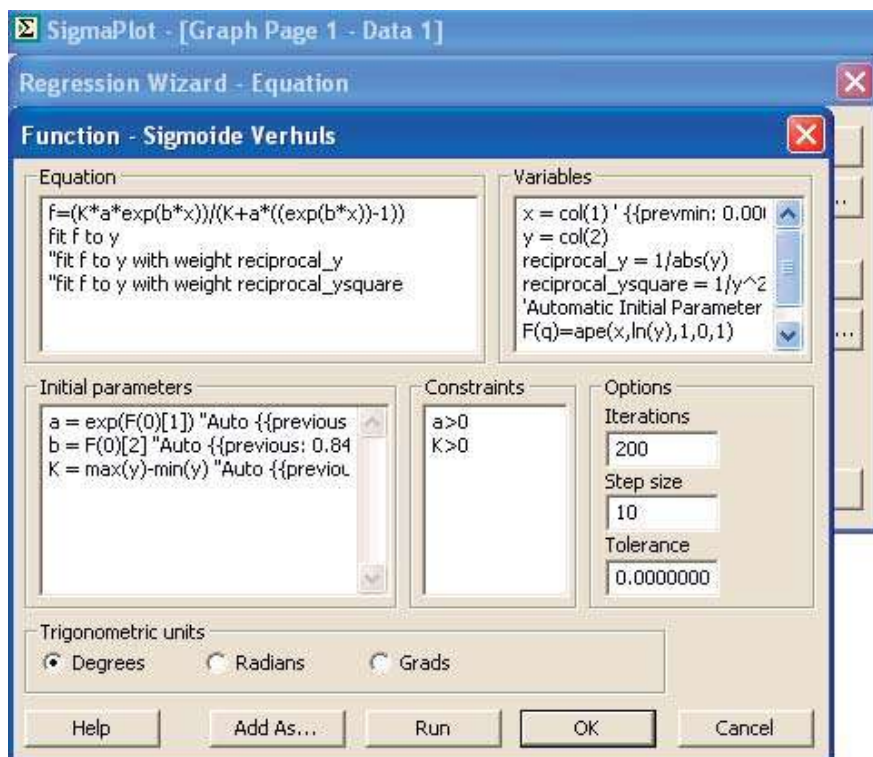


Figura 1. Secuencia programada en SigmaPlot® versión 10 para la simulación matemática de los valores de concentración de Cu en *T. erecta* micorrizada y no micorrizada con el modelo r/K .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En TeM a baja concentración ($C_s \leq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) se observa una mayor capacidad de absorción y transporte de Cu (Figura 2A, zona 1) que TeNM, debido al incremento en la biodisponibilidad y absorción del Cu por *G. intraradices* y al aumento en el transporte del Cu en el simplasto de la raíz, lo que en consecuencia mejora el transporte de Cu a los tejidos aéreos (Figura 3A) (Göhre y Paskowski, 2006). Sin embargo, también se observó que la pendiente de la curva cambió a medida que aumenta la concentración de Cu en el sustrato ($C_s \leq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Figura 2A, zona 1), con tendencia a una posible saturación en los sitios de unión al metal en las raíces y en las estructuras del HMA (K).

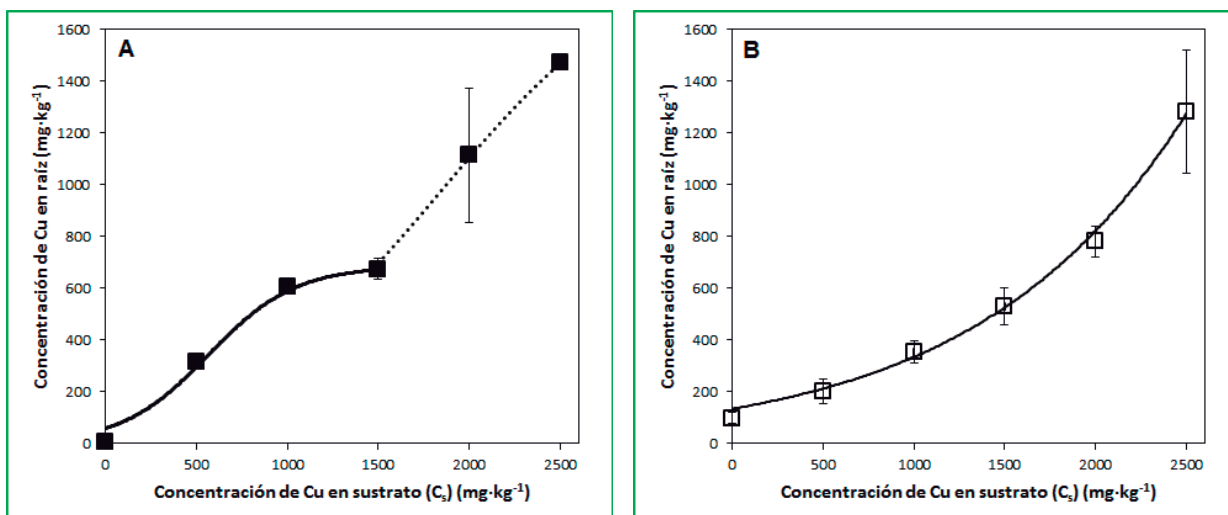


Figura 2. Ajuste de datos experimentales de concentración de Cu en raíces, al modelo r/K . (A): TeM ■ C_p en raíz, — ajuste al modelo r/K zona1, ••• ajuste al modelo r/K zona 2; (B) TeNM □ C_p en raíz, — ajuste al modelo r/K .

Las imágenes microscópicas de las secciones de raíz teñida que describe Castillo *et al.* (2011), muestran que en TeM a $C_s < 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ la principal estructura del HMA es el micelio. A $C_s \geq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ son vesículas las que proliferan progresivamente con el incremento en C_s (Castillo *et al.* 2011 y Apéndice B). La diferencia en los perfiles C_p-C_s de raíz de TeM (zona 1, figura 2A) y TeNM (figura 2B), se debe posiblemente a la contribución del micelio del HMA en la retención del Cu disuelto. Sin embargo, a valores de C_s cercanos a $1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ los sitios de unión al metal disponibles en el micelio se saturan.

En TeM a $C_s \geq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Figura 2A, zona 2), el HMA, ante el estrés metálico, genera una mayor cantidad de vesículas lo que le permite almacenar lípidos, como mecanismo que asegure su supervivencia y posiblemente de manera indirecta, reduce la entrega del Cu al retenerlo en las vesículas, por el aumento en los sitios de unión al metal que suponen éstas (K) (Castillo *et al.* 2011). Se ha sugerido que las vesículas de los HMA, que almacenan principalmente lípidos, también sirven como zona de depósito de metales (Turnau 1998, Weiersbye *et al.* 1999). Donde las vesículas tienen una función similar a las vacuolas de las células vegetales y por lo tanto posiblemente tienen transportadores específicos en su membrana que faciliten el ingreso de Cu.

En la parte aérea de TeM (figura 3A) se evidencia que los datos no se ajustan al modelo r/K , el desajuste es debido al comportamiento parabólico de los datos, que no corresponde al planteamiento conceptual del modelo. Este comportamiento fue reflejo de dos mecanismos de captura antagónicos: a valores de $C_s < 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ el acceso del Cu a los tejidos aéreos se debe al aporte del HMA en la entrega del metal en el simplasto de las células corticales, mientras a $C_s \geq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ existe una restricción al transporte de Cu debido a por los mecanismos de supervivencia, e indirectamente de detoxificación, desarrollados por el HMA mencionados anteriormente.

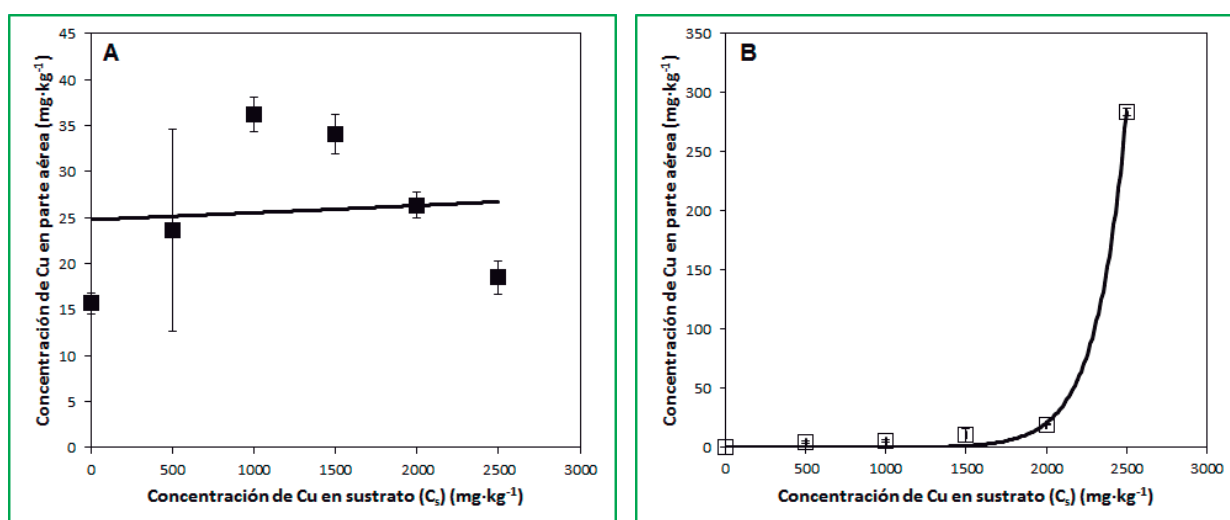


Figura 3. Ajuste de datos experimentales de concentración de Cu en parte aérea, al modelo r/K . (A): TeM ■ C_p en raíz, — ajuste al modelo r/K ; (B) TeNM □ C_p en raíz, — ajuste al modelo r/K .

En TeNM se observó que la mayor cantidad de Cu absorbido fue retenido en las raíces a concentraciones de Cu en el sustrato $< 2500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Figuras 2B y 3B). Posiblemente porque, la mayor parte de la fracción del Cu soluble que se absorbe en las raíces es retenida en el apoplasto adsorbido en las paredes de las células corticales o en las vacuolas de estas células y solo una parte atraviesa el simplasto y es transportado hacia los tejidos aéreos (Dučić y Polle 2005). Sin embargo a la mayor concentración de Cu en el sustrato analizada ($2500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), la concentración de Cu en los tejidos aéreos se incrementó (Figura 3B), según el perfil esperado en plantas exclusoras de metal, conceptualizado por Baker (1981). El aumento en la

concentración de Cu se debe a que los mecanismos que regulan la homeostasis de Cu son rebasados por el estrés metálico (Callahan *et al.* 2006). Cabe señalar que en ese tratamiento (C_s 2500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), el Cu absorbido indujo evidentes signos de estrés por Cu en *T. erecta*, tal como la necrosis en hojas y falta de vigor en tallos. En términos del modelo r/K , el Cuadro 2 muestra que el valor de K (parte aérea de TeNM) es extremadamente grande, 5.38×10^7 , es decir C_p en *T. erecta* alcanza niveles letales lo que causa la muerte de la planta.

En la figura 4 (A y B), se observa que los perfiles de concentración de Cu en planta entera en TeM y TeNM son similares a los de las raíces (figura 2, A y B), aunque en una magnitud menor. Esto porque la mayor concentración de Cu se ubica en las raíces y por lo tanto rige el perfil de concentración total en la planta, y la disminución en la magnitud de C_p fue porque el peso de los tejidos aéreos fue mayor que el de las raíces.

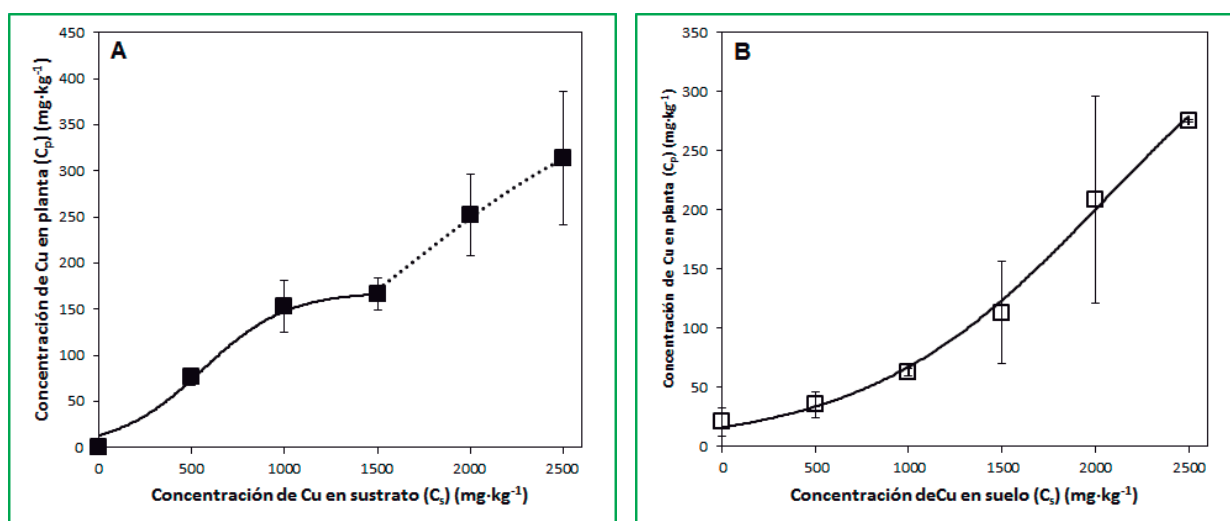


Figura 4. Ajuste de datos experimentales de concentración de Cu en planta entera, al modelo r/K . A): TeM ■ C_p en planta entera, — ajuste al modelo r/K zona1, ••• ajuste al modelo r/K zona 2; (B) TeNM □ C_p en planta entera, — ajuste al modelo r/K .

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de los parámetros del modelo r/K en *T. erecta* de cada ajuste. Se observa que en todos los casos, los datos se ajustan al modelo propuesto ($R^2 > 0.99$), con excepción de la parte aérea de TeM, por las razones expuestas. Es importante notar que, a nivel de planta completa, TeM tuvo un

incremento del 35% en la capacidad total de almacenamiento de Cu, K (suma de K en zonas 1 y 2) en comparación con TeNM. Por lo tanto, esto permite reafirmar lo expresado por Castillo *et al.* (2011), que señala que *G. intraradices* protege a *T. erecta* de la toxicidad inducida por Cu al mismo tiempo que mejora su índice de fitoacumulación, lo que sugiere que este sistema tiene uso potencial para fitoestabilizar suelos contaminados con Cu.

Cuadro 2. Parámetros obtenidos del ajuste de datos experimentales de *T. erecta* micorrizada y no micorrizada con *G. intraradices*, con el modelo de respuesta al estrés metálico r/K .

Parte de la planta	Coeficientes de Modelo r/K			R^2
	r (kg·mg ⁻¹)	K (mg·kg ⁻¹)	$C_p(0)$ (mg·kg ⁻¹)	
Micorrizada				
Raíz Zona 1	0.0042±0.00004 P<0.0002	684.72±19.76 P<0.0001	58.60±5.676 P=0.0002	0.9904
Raíz Zona 2	0.0017±0.0001 P<0.0001	1937.68±109.58 P<0.0001	79.46±14.96 P=0.0018	0.9980
Parte aérea	-1.8E-8±0.0018	0.016±1513.448	24.76±7.426	0.0116
Completa Zona 1	0.0042±0.0004 P<0.0001	168.885±4.463 P<0.0001	13.45±2.383 P=0.0003	0.9919
Completa Zona 2	0.0016±0.0001 P<0.0001	397.16±20.135 P<0.0001	25.852±4.723 P=0.0006	0.9974
No Micorrizada				
Raíz	0.0009±5.72E-5 P<0.0001	20729.4±36061.4 P=0.5734	134.22±7.103 P<0.0001	0.9973
Parte aérea	0.0052±0.0094 P=0.6151	5.38E7±5.20E3 P=1.0000	0.0006±0.0106 P=0.9600	0.998
Completa	0.0016±6.98E-5 P<0.0001	419.25±26.691 P<0.0001	16.155±1.291 P<0.0001	0.9974

Relevancia de los factores r y K para la fisiología de la planta bajo estrés por MP.

a) El factor de capacidad (K). La ecuación diferencial de la cual se deriva la ecuación (1) es recapitulada aquí en la ecuación (2) (Dasgupta-Schubert *et al.* 2011).

$$\frac{dC_p}{dC_s} = rC_p \left(1 - \frac{C_p}{K} \right) \quad (2)$$

La absorción del metal por el sistema (TeM o TeNM), se rige por el primer término y su resistencia a la absorción del metal por el segundo (para más detalles consultar Dasgupta-Schubert *et al.* 2011). La combinación de ambos determina la

regulación de la concentración final de metal dentro del sistema. Esta respuesta, a nivel de sistema, es el resultado de la acumulación de metal por los mecanismos homeostáticos a nivel molecular. La concentración máxima de metal retenido está definida por el máximo permitido por los procesos reguladores que dependen de la fisiología del sistema en particular. Cuando todos los sitios de unión a metal en el sistema se saturan, C_p alcanza el valor máximo K . El número total de sitios de unión al metal depende del número total de células del sistema, éstas a la vez dependen de la biomasa de la planta o de la biomasa de la simbiosis planta-HMA. La biomasa generada está en función de la respuesta fisiológica del sistema bajo las condiciones ambientales dadas. Ya que el objetivo de las técnicas de FR es capturar la mayor cantidad de metal, así el valor de K se convierte en un indicador importante del beneficio del sistema biótico en la FR de suelos contaminados con MP. Los valores numéricos de K en los sistemas analizados se discutirán más adelante.

Cuando los mecanismos que regulan la homeóstasis de metal en vegetales colapsan el segundo término de la ecuación (2) tendrá poco efecto. Esto es común que suceda a concentraciones elevadas de metal, en las que la integridad de la membrana plasmática se pierde, y permite la “inundación” del metal en la célula vegetal, llegado este punto la planta está por morir (Hall 2002). La evidencia del estrés extremo en TeNM se mostró a una C_s de 2500 mg de $\text{Cu}\cdot\text{kg}^{-1}$, como se observó previamente. En términos del modelo r/K , el segundo término en la ecuación (2) es pequeño en comparación al primero y puede ser despreciado, lo que resulta en (ecuación 3):

$$\frac{dC_p}{dC_s} = rC_p \quad (3)$$

Cuya integración resulta en:

$$C_p = e^{(rC_s + a)} \quad (4)$$

Donde a es una constante arbitraria. Entonces a C_s elevada, $C_p \rightarrow$ infinito.

Por lo tanto el inicio de la ruptura del proceso de regulación se muestra como un fuerte incremento en el perfil C_p - C_s , sin lograr la saturación. Este es el perfil típico de las plantas excloras de metal, mismo que también mostró TeNM a C_s elevada de Cu en el sustrato (Baker 1981, Castillo *et al.* 2011). Un aspecto importante es que en el modelo r/K , el proceso de ruptura en la regulación del acceso del metal se manifiesta naturalmente en el valor de K , que como se observó en el Cuadro 2, fue extremadamente grande. Éste valor no indica saturación, sino que, como se indica en la ecuación 4, a C_s elevada C_p tiende al infinito. El perfil de C_p - C_s en la parte aérea de TeM no mostró esa tendencia, lo que representa un beneficio del HMA en la protección de *T. erecta* a la toxicidad de Cu.

b) El factor de proporción r (“rate factor”). En la ecuación (2) se observa que cuando C_p se aproxima a K , el factor dentro del paréntesis tiende a cero, por lo tanto dC_p/dC_s , es decir la pendiente del perfil C_p - C_s también tiende a cero. Entonces el factor r no puede definirse en esta región. Sin embargo, cuando $C_p \ll K$, el factor dentro del paréntesis se aproxima a 1 y r se puede expresar como:

$$r \approx \left(\frac{1}{C_p} \right) \left(\frac{dC_p}{dC_s} \right) \quad (5)$$

Esto significa que el factor de proporción depende de la pendiente del perfil C_p - C_s . Si se consideran dos perfiles C_p - C_s (figura 5), a un valor fijo de C_p , el perfil con una pendiente superior $[(dC_p/dC_s)_1 > (dC_p/dC_s)_2]$, mostrará un factor de proporción mayor ($r_1 > r_2$). En $(dC_p/dC_s)_1$ el incremento de C_p (ΔC_p) por unidad de incremento en C_s (ΔC_s) es mayor que en $(dC_p/dC_s)_2$, lo que implica que las células de la planta [en $(dC_p/dC_s)_1$] muestran una mayor afinidad para la toma del metal.

En el cuadro 2, se observa que el factor r en la raíz del sistema TeM, zonas 1 y 2 son superiores comparados con su contraparte no micorrizada, en 4.6 y 1.8 veces, respectivamente. Esto significa que las células de la raíz de TeM tienen mayor afinidad por el Cu en el mismo orden de magnitud. Esto corrobora datos que muestran que las estructuras intraradicales de los HMA, tienen de 2 a 4 veces más afinidad por los MP que las células de la raíz, ya que la adsorción es la forma

dominante de fijación del metal en hifas y vesículas, y debido a que el micelio tiene un área superficial mayor que las vesículas, el micelio mostraría una capacidad relativamente mayor de fijar Cu (Göhre y Paszkowski 2006, Joner *et al.* 2000). Esto se vería reflejado en un valor mayor del factor r en la zona 1 de raíz de TeM. En el Cuadro 2 se observa que el factor r de la raíz micorrizada en la zona 1 es mayor que en la zona 2. Por otra parte la proliferación de vesículas se observó a valores de C_s de $1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y superiores, que corresponde con el inicio de la zona 2 (Castillo *et al.* 2011) (figura 2).

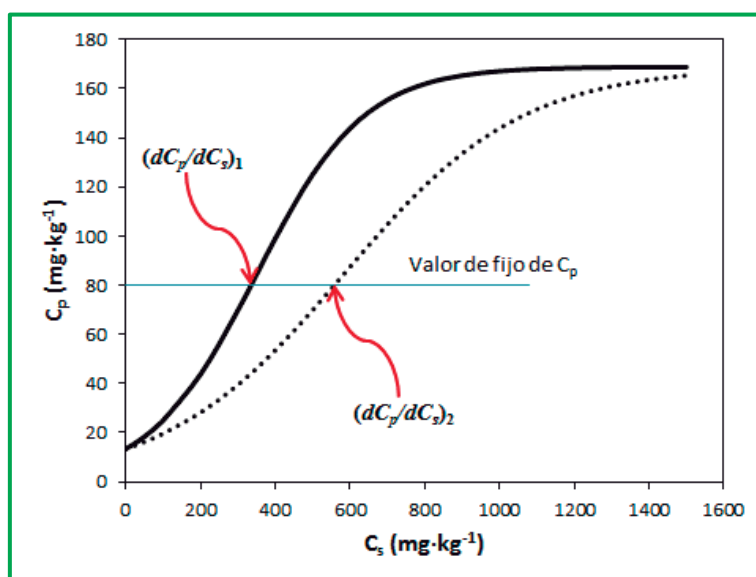


Figura 5. Perfiles de concentración C_p - C_s ficticios empleados para ilustrar la importancia del factor de proporción (r) del modelo r/K .

Estas observaciones sugieren que la estructura responsable de fijar el Cu en la simbiosis *T. erecta*-*G. intraradices* es el micelio hasta concentraciones moderadamente altas de Cu en el sustrato ($C_s < 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Mientras que a concentraciones altas ($C_s \geq 1500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) las vesículas dominan en la retención de Cu.

CONCLUSIÓN

El análisis anterior demuestra que del modelo r/K , así como de los factores de proporción (r) y capacidad (K) se puede obtener información significativa sobre los procesos fisiológicos involucrados en la toma de MP de plantas con y sin micorriza.

El presente trabajo representa el primero sobre la modelación matemática de la respuesta ecofisiológica (C_p - C_s) al estrés metálico en plantas micorrizadas con HMA.

REFERENCIAS

- Baker A. J. M. 1981. **Accumulators and excluders: Strategies in the response of plants to heavy metals.** *Journal of Plant Nutrition* 3:643–654.
- Callahan D.L., A. J. M. Baker, S. D. Kolev y A. G. Wedd. 2006. **Metal ion ligands in hyperaccumulating plants.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 2–12.
- Castillo O. S., N. Dasgupta-Schubert, C. J. Alvarado, E. M. Zaragoza y H. J. Villegas. 2011. **The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of copper (II) and its implications for phytoremediation.** *New Biotechnology*, DOI:10.1016/j.nbt.2011.05.009.
- Dasgupta-Schubert N., M. G. Barrera, C. J. Alvarado, O. S. Castillo, E. M. Zaragoza, S. Alexander, S. Landsberger y S. Robinson. 2011. **The uptake of copper by *Aldama dentata*: Ecophysiological response, its modeling, and implication for phytoremediation.** *Water, Air and Soil Pollution*, 220:37-55.
- Dučić T. y A. Polle. 2005. **Transport and detoxification of manganese and copper in plants.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17:103-112.
- Göhre V. y U. Paszkowski. 2006. **Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation.** *Planta* 223:1115-1122.
- Hall J. L. 2002. **Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.** *Journal of Experimental Botany* 53:1-11.
- Joner E., R. Briones y C. Leyval. 2000. **Metal binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium.** *Plant and Soil* 226:227-234.

- Koopmans G., P. Ramkens, J. Song, E. Temminghoff y J. Japenga. 2007. **Predicting the phytoextraction duration to remediate heavy metal contaminated soils.** *Water, Air and Soil Pollution* 181:355–371.
- Liang H. M., T. H. Lin, J. M. Chiou y K. C. Yeh. 2009. **Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators.** *Environmental Pollution* 157:1945–1952.
- Noble D. 2006. **The music of life: Biology beyond the genome.** Oxford University Press, UK.
- Peer W. A., I. R. Baxter, E. L. Richards, J. L. Freeman y A. S. Murphy. 2005. **Phytoremediation and hyperaccumulator plants.** En: Tamás M. J. y E. Martinoia (Eds.) **Topics in Current Genetics, Vol. 14: Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Robinson B., J. E. Fernández, P. Madejón, T. Marañón, J. M. Murillo, S. Green, *et al.* 2003. **Phytoextraction: An assessment of biogeochemical and economic viability.** *Plant and Soil* 249:117–125.
- Robinson B. H., R. Schulin, B. Nowack, S. Roulier, M. Menon, B. Clothier, *et al.* 2006. **Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites.** *Forest Snow and Landscape Research* 80:221–234.
- Song J., F. J. Zhao, Y. M. Luo, S. P. McGrath y H. Zhang. 2004. **Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils.** *Environmental Pollution* 128:307–315.
- Turnau K. 1998. **Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes of Southern Poland.** *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67:105–108.

van Nevel L., J. Mertens. K. Oorts y K. Verheyen. 2007. **Phytoextraction of metals from soil: How far from practice?** *Environmental Pollution* 150:34–40.

Verhulst P. F. 1838. **Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement**, *Correspondence Mathematique et Physique* 10:113-121.

Weiersbye I. M., C. J. Straker y W. J. Przybylowicz. 1999. **Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings.** *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 158:335-343.

Zhao F. J, E. Lombi y S. P. McGrath. 2003. **Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*.** *Plant and Soil* 249:37–43.

CAPÍTULO 6
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS

6.1 DISCUSIÓN GENERAL.

Trabajos anteriores clasifican a *T. erecta* como una planta acumuladora de Cd con concentraciones máximas de hasta 1200 mg de Cd·kg⁻¹ de tejido seco de raíz y 330 mg de Cd·kg⁻¹ de tejido seco de parte aérea (Uraguchi *et al.* 2006, Bosiacki 2008, Liu *et al.* 2011). Sin embargo, cuando se encuentra micorrizada con *G. intraradices*, *G. constrictum* o *G. mosseae*, su capacidad de acumulación de Cd disminuye de 10 a 40% en raíz y de 40 a 50% en parte aérea (Liu *et al.* 2011). El Cd es un elemento tóxico no esencial para plantas, por lo que los HMA limitan la toma y entrega de este a su hospedera, posiblemente debido a la falta de transportadores de membrana específicos para el Cd (Liu *et al.* 2011). Por el contrario, en los resultados obtenidos de esta investigación se observó que la simbiosis *T. erecta*-*G. intraradices* (TeM) incrementó consistentemente la acumulación de Cu en raíces y parte aérea (Castillo *et al.* 2011, Capítulo 3). Ya que el Cu es un micronutriente esencial, el HMA tiene la capacidad de movilizarlo, tomarlo y transportarlo hacia su hospedera, lo que al final incrementa C_p, en comparación con *T. erecta* no micorrizada (TeNM) (Castillo *et al.* 2011, Capítulo 3). Khan (2005) establece que la capacidad de acumulación de MP en plantas micorrizadas con HMA no es homogénea, para algunos MP esta capacidad se incrementa mientras que para otros disminuye. Por lo tanto, la acumulación de MP en una planta micorrizada depende del HMA y el MP en cuestión. Este hecho también queda de manifiesto en esta investigación.

Joner *et al.* (2000), establecen que las estructuras intraradicales de los HMA, tienen de dos a cuatro veces más afinidad por los MP que las células de la raíz, ya que la adsorción es la forma dominante de fijación del metal en hifas y vesículas. En TeM se observó la presencia de micelio (principalmente a C_s < 1500 mg·kg⁻¹) y vesículas (a C_s ≥ 1500 mg·kg⁻¹) (Castillo *et al.* 2011, Apéndice B). De acuerdo al factor de proporción (*r*) o “rate factor”, del modelo *r/K* las raíces de TeM mostraron de 1.8 a 4.6 veces mayor afinidad por el Cu que TeNM, lo cual concuerda con lo establecido por Joner *et al.* (2000) (Capítulo 5). La proliferación de vesículas observada en TeM al aumentar la concentración de Cu en el sustrato (C_s ≥ 1500

mg·kg⁻¹), puede ser un mecanismo de supervivencia desarrollado por el HMA y al mismo tiempo de detoxificación de MP (Göhre y Paszkowski 2006, Chen *et al.* 2005). Ya que se ha observado que las vesículas de HMA pueden estar involucradas en el almacenamiento de MP (Chen *et al.* 2005, Weiersbye *et al.* 1999). Esta proliferación de vesículas benefició a *T. erecta* al limitar el transporte de Cu a sus tejidos aéreos. En TeNM se observó un repentino incremento en C_p de parte aérea a C_s de 2500 mg·kg⁻¹ lo que corresponde al comportamiento típico de una planta exclutora de MP (Baker 1981) (Castillo *et al.* 2011, Capítulo 3). Tomando en cuenta este comportamiento y los FT y FBC obtenidos para TeM y TeNM se concluye que *T. erecta* es una planta exclutora de Cu (Castillo *et al.* 2011, Capítulo 3). Sin embargo, cuando está micorrizada con *G. intraradices* incrementa su capacidad de acumulación de Cu lo que la hace una especie atractiva para fitoestabilizar Cu en suelos contaminados.

Los modelos de respuesta ecofisiológica de plantas, ante estrés metálico, desarrollados de acuerdo a enfoques reduccionistas, son complejos ya que involucran una gran cantidad de variables ambientales y el conocimiento *a priori*, de los mecanismos involucrados en la toma y transporte de los iones metálicos. Lo que supone una extensa experimentación y por consiguiente tienen una aplicación limitada (Robinson 2003, Trapp 2004). Uno de estos modelos es el DSS (“*Decision Support System*”) que hasta ahora solo ha sido validado para la planta hiperacumuladora de Ni *Berkheya codii* (Robinson 2003).

El modelo de respuesta ecofisiológica r/K desarrollado y evaluado en esta investigación fue establecido de acuerdo a un enfoque de biología de sistemas, haciendo analogía al modelo de crecimiento poblacional de Verhulst (1838). El modelo r/K , a diferencia de modelos con enfoque reduccionista, es simple, no involucra variables ambientales, ni un conocimiento *a priori* de los mecanismos de toma y transporte de iones metálicos y por otro lado, define parámetros importantes en FR. Como el factor de capacidad K , que establece la capacidad máxima de almacenamiento de metal en una planta, el cual puede ser útil en modelos predictivos de FR. Y el factor de proporción r , que define la afinidad de una planta

para acumular iones metálicos. En esta investigación, el modelo r/K fue validado en plantas exclusoras de Cu, micorrizadas y no micorrizadas y se corroboró su aplicabilidad en ambos casos (Dasgupta-Schubert *et al.* 2011, Capítulos 4 y 5).

6.2 CONCLUSIONES.

❖ *Tagetes erecta* L. es una planta exclusora de Cu, que en simbiosis con *G. intraradices* aumenta su fitoacumulación. Además de que de manera indirecta protege a *T. erecta* de los efectos tóxicos del metal al limitar su transporte a los tejidos aéreos. La simbiosis *T. erecta-G. intraradices* tiene un uso potencial para fitoestabilizar suelos contaminados con Cu.

❖ El modelo de respuesta ecofisiológica r/K , basado en el de crecimiento poblacional de Verhulst explica satisfactoriamente los perfiles de concentración en plantas exclusoras de Cu, incluso en aquellas que se ubican en simbiosis micorrízicas, por lo que representa una nueva manera de analizar cuantitativamente los perfiles de concentración de metal en plantas.

❖ Los factores de proporción (r) y capacidad (K) del modelo r/K , dan información importante sobre los procesos fisiológicos involucrados en la absorción de MP de plantas con y sin micorriza. Al mismo tiempo representan una nueva forma de comparar cuantitativamente la capacidad de acumulación de metal en una planta.

❖ Esta investigación es la primera que detalla el papel de la simbiosis *G. intraradices-T. erecta* en la fitoacumulación de Cu insoluble, y a su vez es la primera sobre la modelación matemática de la respuesta ecofisiológica (C_p-C_s) al estrés metálico en plantas micorrizadas con HMA.

6.3 PERSPECTIVAS.

La presente investigación fue desarrollada para analizar la respuesta fisiológica de *T. erecta* en simbiosis con el HMA *G. intraradices* a diferentes concentraciones de Cu(II) insoluble en un sustrato artificial. *T. erecta* mostró un comportamiento típico de una planta exclusora de metal cuando no estaba micorrizada. Sin embargo, cuando estaba micorrizada no presentó el crecimiento exponencial de C_p (en los tejidos aéreos), característico de las plantas exclusoras. Por lo tanto, será importante explorar, en la simbiosis *T. erecta-G. intraradices*, si a $C_s > 2500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ los procesos que regulan la homeostasis del metal en la planta, colapsan. Y así dilucidar cuantitativamente el incremento en la tolerancia de *T. erecta* al Cu(II) cuando está micorrizada con *G. intraradices*.

Como otra perspectiva adicional en esta investigación queda el analizar si la simbiosis *T. erecta-G. intraradices* fitoestabiliza el Cu en suelos contaminados, en condiciones de invernadero y campo, como ya se observó en cámara de crecimiento y bajo condiciones ambientales controladas.

El modelo de respuesta ecofisiológica r/K ha corroborado su aplicabilidad en el análisis de los perfiles de concentración de plantas exclusoras de Cu, incluso aquellas que se encuentran en simbiosis micorrízicas con HMA. Sin embargo, será de relevancia que a futuro este modelo sea estudiado en plantas exclusoras de otros metales, así como en plantas acumuladoras e hiperacumuladoras. De esta manera se conocerá y delimitará su aplicabilidad en fitoestabilización y fitoextracción de metales.

APÉNDICES

APENDICE A. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

La metodología experimental que se siguió en este proyecto para analizar el efecto del incremento de la concentración de Cu sobre la simbiosis *T. erecta*-*G. intraradices* se esquematiza en el diagrama de la figura A1.

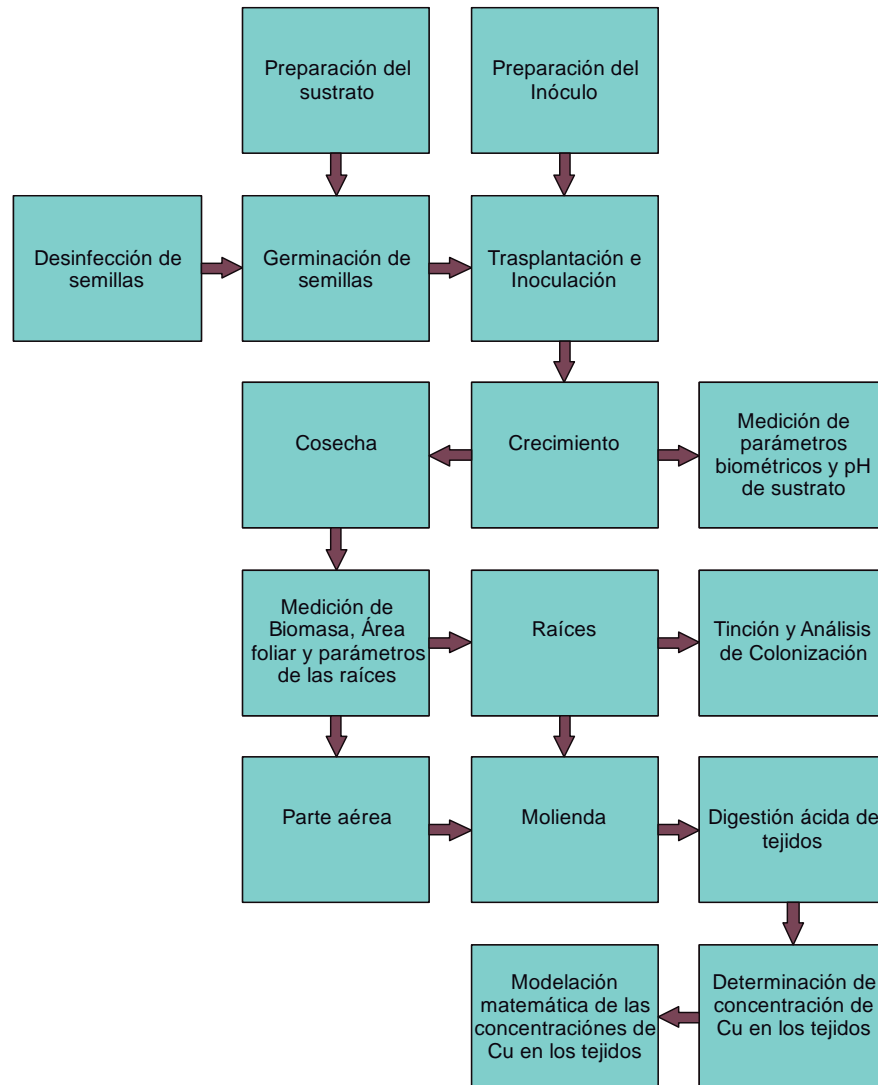


Figura A1. Diagrama de flujo de la metodología experimental seguida para cumplir los objetivos de la investigación.

A continuación se muestra una descripción paso a paso de lo realizado en la metodología experimental.

A.1 Desinfección de semillas. El origen de las semillas de *T. erecta* fue de la marca comercial “Rancho Los Molinos” S.A. de C.V., México, de la cosecha de 2008. Las

semillas de *T. erecta* fueron desinfectadas superficialmente antes de su germinación por agitación con una solución de NaClO al 1% (v/v) durante 10 min y posteriormente enjuagadas cuatro veces con agua destilada durante 20 min.

A.2 Preparación del sustrato. El sustrato empleado fue una mezcla de perlita-turba en una relación 2:1 en volumen, ya que se observó que este sustrato permitió una buena retención de agua. La perlita expandida fue de Hortiperl® (Termolita S.A. de C.V. México) y la turba de Premier® (Premier Horticulture Inc. Quakertown, PA USA). La perlita fue tamizada y dividida en dos tamaños mayor de 2000 µm y mayor de 1000 µm pero menor a 2000 µm. La turba fue secada durante 48 h a 50°C con una fuente de luz infrarroja (Osram®) de 250 W. La mezcla de sustrato fue esterilizada dos veces en autoclave a 121°C y 103.42 kPa durante 20 min, antes de ser empleada para el semillero de germinación y en las macetas. El cuadro A1 muestra los valores de densidad de los componentes del sustrato.

Cuadro A1. Densidad del sustrato empleado en el semillero y en las macetas para el crecimiento de *T. erecta*.

Sustrato	Densidad (kg·m ⁻³)	Masa por kg de sustrato (g)
Agrolita > 2000 µm	102.46	255.64
Agrolita > 1000 µm < 2000 µm	187.30	467.32
Turba	111.03	277.03

El Cu fue agregado al sustrato previo a su esterilización en forma de CuO (J.T. Baker 1814-50) para simular los enlaces Cu-O que existen de manera natural en el suelo. Mediante los siguientes cálculos se determinó la cantidad de CuO que se agregó al sustrato para la concentración requerida de Cu en cada tratamiento:

Masa Molar de CuO	MM CuO	79.54 g·mol ⁻¹
Masa Molar de Cu	MM Cu	63.54 g·mol ⁻¹
Fracción masa de Cu en CuO		$x = \frac{63.54}{79.54} = 0.7997$

Masa de CuO en 1 kg de sustrato (mg·kg ⁻¹)		$y = \frac{[Cu]}{x}$
--------------------------------------------------------	--	----------------------

Donde [Cu] es la concentración de Cu requerida en el sustrato (mg·kg⁻¹)

A.3 Preparación del inóculo. Éste se preparó con esporas de *G. intraradices* (BioSyneterra Solutions Inc., Quebec, Canada) cultivadas en medio líquido con 3.5×10^6 esporas·L⁻¹, y un 90% de viabilidad, que se diluyó con en agua destilada y esterilizada, para obtener una concentración final de 50 esporas viables·mL⁻¹. La viabilidad de las esporas fue determinada de acuerdo al método descrito por An y Hendrix (1988). El análisis de viabilidad de esporas se realizó con una alícuota de 1mL de la solución de esporas de concentración conocida, a la que se le agregó un volumen igual de una solución de 0.5 mg·mL⁻¹ de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro], por quintuplicado. La mezcla se agita 1 min e incuba 24 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se toma una alícuota de 200 µL por triplicado, de la solución y se observa en el microscopio de campo oscuro, se contabilizaban esporas viables y no viables y se calcula el porcentaje de viabilidad de la solución patrón. Las esporas viables tienen un color rojo intenso, negro o rosa mientras que las no viables fueron traslúcidas, ver Figura A2.

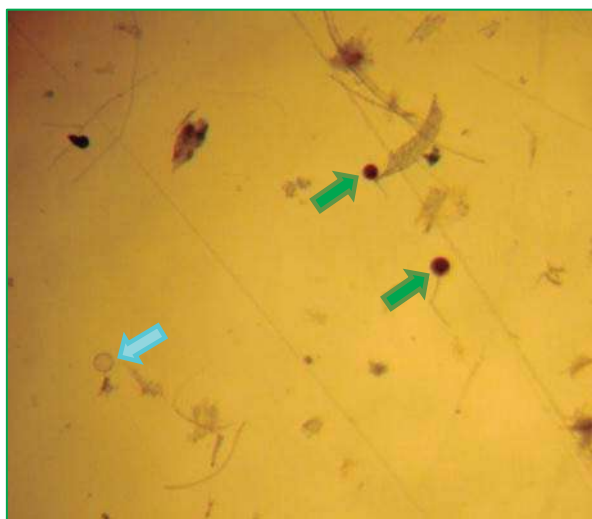


Figura A2. Análisis de viabilidad de esporas de *Glomus intraradices*. Esporas marcadas con flechas verdes son viables, la marcada con flecha azul no viable.

A.4 Germinación de semillas. *T. erecta* fue germinada en sustrato perlita-turba humedecido, esterilizado en semillero bajo oscuridad hasta la aparición de los primeros brotes al día dos y posteriormente durante 15 días a 25°C, con una humedad relativa de 60% y un foto periodo de 16 h de luz por 8 h oscuridad (Figura A3, A).

A.5 Trasplatación e inoculación. Previo al trasplante se adecuaron macetas cónicas tipo columna, con un diámetro interno superior de 5 cm y el interno inferior de 4 cm, 20 cm de altura, y un volumen aproximado de 330 mL. En la parte inferior de cada maceta se le colocó una malla de algodón sujeta con cinta adhesiva a manera de filtro para que en los lixiviados no hubiese sustrato. Posteriormente las macetas fueron desinfectadas superficialmente con solución de NaClO. Después de este periodo las plántulas fueron trasplantadas a macetas (una por maceta) preparadas con el sustrato esterilizado hasta un volumen de 300 mL, que correspondía aproximadamente a 50 g, a la concentración de Cu requerida para cada caso. Posteriormente fueron colocadas para quedar suspendidas sobre camas de madera (Figura A3, B). Debajo de cada maceta se colocó un vaso de plástico graduado para la colecta de lixiviados que derivaban y formaban parte del riego diario.

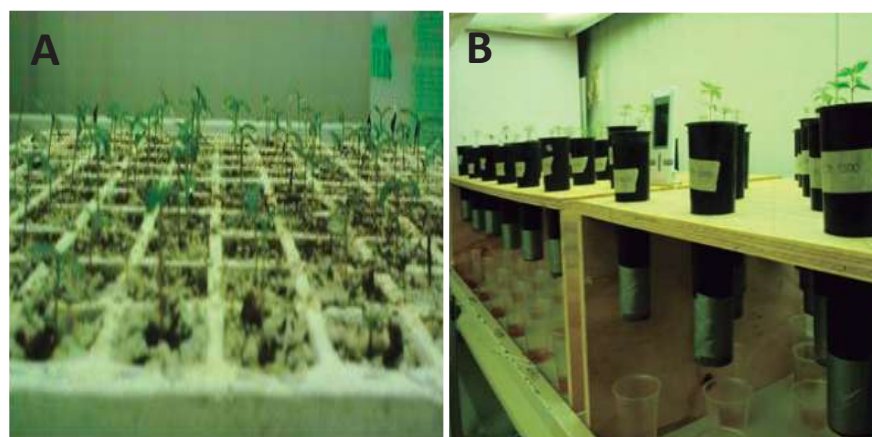


Figura A3. Imágenes del semillero de germinación (A) y de macetas montadas en camas de madera (B) donde se trasplantó y creció *Tagetes erecta*.

Durante el trasplante se seleccionaron aquellas plántulas que tenían un tamaño promedio de 3.0 cm de altura. La inoculación de *T. erecta* con *G. intraradices* se realizó al momento del trasplante, con 1 mL de una suspensión aséptica de esporas de *G. intraradices* de aproximadamente 50 esporas·mL⁻¹ obtenidas de un cultivo in vitro (ver sección A.3).

El experimento constó de plantas inoculadas y no inoculadas, con y sin Cu en el sustrato. El cuadro A2 muestra el diseño del experimento.

Cuadro A2. Diseño Experimental empleado para el análisis de fitoacumulación de Cu en *T. erecta* micorrizada y no micorrizada con *G. intraradices*.

Tratamiento	<i>T. erecta</i>	<i>G. intraradices</i>	Cobre	Repeticiones
Te	+	-	-	5
TeCu	+	-	+	5
TeGi	+	+	-	5
TeGiCu	+	+	+	5

Te: *Tagetes erecta*; Gi: *Glomus intraradices*; Cu: Cobre; +: Presencia -: Ausencia

Las concentraciones de Cu en el sustrato fueron desde 0 hasta 2500 mg·kg⁻¹ con intervalos cada 500 mg·kg⁻¹. El cuadro A3 muestra el total de tratamientos del experimento.

Cuadro A3. Tratamientos del experimento empleado para el análisis de fitoacumulación de Cu en *T. erecta* micorrizada y no micorrizada con *G. intraradices*.

Tratamiento	Concentración de Cu (mg·kg ⁻¹)	Repeticiones	Tratamiento	Concentración de Cu (mg·kg ⁻¹)	Repeticiones
Te0Cu	0	5	Te500Cu	500	5
TeGi0Cu		5	TeGi500Cu		5
Te1000Cu	1000	5	Te1500Cu	1500	5
TeGi1000Cu		5	TeGi1500Cu		5
Te2000Cu	2000	5	Te2500Cu	2200	5
TeGi2000Cu		5	TeGi2500Cu		5

Te: *Tagetes erecta*; Gi: *Glomus intraradices*; Cu: Cobre.

Los tratamientos **Te0Cu** y **TeGi0Cu** corresponden a los controles no micorrizados y micorrizados respectivamente.

A.6 Crecimiento. El cempasúchil se dejó durante 9 semanas en cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: temperatura 25°C, humedad relativa 60%, un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de 5000 lm proporcionada por lámparas de luz fría de 250 W.

El riego de las plantas durante el crecimiento se realizó de la siguiente manera: El día del trasplante se agregó poco a poco agua destilada con jeringa en intervalos de tiempo de 30 min hasta la aparición de la primera gota de lixiviado. Este volumen de agua se considera el de saturación. Posteriormente se agregó agua hasta que el volumen de lixiviado alcanzó los 20 mL. Al día siguiente el lixiviado se aforó a 20 mL y se agregó como riego, a continuación se regó con agua destilada

hasta alcanzar el volumen de 20 mL de lixiviado, lo que se repitió diariamente hasta la conclusión del experimento de 9 semanas, así se aseguró mantener a capacidad total de campo en las macetas^[4]. Semanalmente las plantas fueron fertilizadas con 15 mL de una solución nutritiva Long-Ashton en donde el Nitrógeno se agregó como nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2mM) (Smith *et al.*, 1983) (Cuadro A4). Los lixiviados fueron colectados semanalmente para medición de pH y concentración de Cu.

Cuadro A4. Concentración de los componentes de la Solución Nutritiva Long-Ashton usada para fertilizar *T. erecta* durante el experimento.

Componente	Concentración (mM)
KH_2PO_3	0.1
K_2SO_4	1.45
CaSO_4	1.5
MgSO_4	1.5
EDTA	0.045
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2
MnSO_4	0.00038
CuSO_4	0.000001
ZnSO_4	0.000075
H_3BO_4	0.00036
$(\text{Na})_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.00001

A.7 Medición de parámetros biométricos y pH durante el crecimiento de *T. erecta*. Durante el crecimiento de *T. erecta* se realizaron mediciones semanales de parámetros biométricos para tener registro de su crecimiento. Éstos fueron:

- × Altura.
- × Número de tallos, así como número de hojas (sanas y necróticas o cloróticas)
- × Ancho máximo (diámetro de roseta)
- × Altura de ancho máximo.

El registro de los valores de pH del lixiviado semanal fue acumulativo. En la semana 1 se midió el pH sobre los primeros 20 mL de lixiviado colectados por maceta, en la semana 2 sobre 40 mL y así sucesivamente. La medición de pH se realizó con un equipo Accumet® AB15.

A.8 Cosecha. Las plantas fueron cosechadas y limpiadas a la semana nueve después del trasplante. Durante la cosecha las raíces inicialmente se limpiaron manualmente para retirar todo el sustrato y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada para remover los restos.

A.9 Medición de área foliar y biomasa. Las masas de los tejidos limpios y frescos y el área foliar fueron medidos al momento de la cosecha. Las plantas se pesaron completas y por separado, raíces, tallos y hojas. De las plantas inoculadas con el HMA se tomaron muestras de raíces y se almacenaron durante 7 días a 3°C en una solución de etanol al 50 % (v/v) para luego analizar su colonización. Para determinar las masas secas las raíces y las partes aéreas se colocaron en bolsas de papel y se secaron a 60°C, 72 h o hasta peso constante en un horno Shel Lab CE5F.

La determinación del área foliar se realizó mediante el análisis de imágenes digitales, del total de las hojas de cada planta, con el software SIDELOOK® con el protocolo de Nobis y Hunziker en 2005, y los resultados fueron corroborados con el software ImajeJ® de acuerdo al método sugerido por sus diseñadores^[5]. Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara Sony® CyberShot DSC-W90 con una resolución ISO400, a una distancia de 30 cm. Las hojas fueron colocadas sobre un fondo azul graduado por especificación de los programadores del software utilizado. El software empleado está diseñado para realizar el contraste entre el color verde de las hojas y el color del fondo, que puede ser azul o blanco, de manera que transforma la imagen a color de alta resolución, a otra en blanco y negro. Posteriormente el programa hace conteo de pixeles, mediante una operación matemática se transforma la cantidad de pixeles negros, que corresponden a las zonas de color verde en la imagen original, a unidades de superficie (cm²).

A.10. Molienda. Las plantas secas y pesadas fueron molidas en un molino Thomas Scientific® 3383L10, tamizadas en una malla 40 (425 mm) y almacenadas en bolsas de papel encerado para evitar la humedad.

A.11 Tinción y análisis de colonización de plantas micorrizadas. La tinción y el análisis de colonización de las raíces de *T. erecta* inoculadas se realizó con los protocolos descritos por Vierheilig *et al.* (1998) y Giovannetti y Mosse (1980) respectivamente. Las muestras de raíces seleccionadas se montan en casetes para inclusión y se clarifican con una solución de KOH al 10%(m/v) a temperatura de ebullición por 6 min. Posteriormente los casetes, con las raíces ya clarificadas, se sumergen durante 10 min en una solución al 5% de tinta Skrip® de Sheaffer® negra

(#94231) en vinagre doméstico blanco, aproximadamente 5% de ácido acético, a temperatura de ebullición. Para determinar el porcentaje de colonización se montaron en un portaobjetos aleatoriamente 10 segmentos de raíz teñida por planta, cada uno de aproximadamente 10 mm. Se observaron en un microscopio óptico Leica® DM750 con el objetivo de 40x. Cada segmento fue observado en intervalos de 2 mm, se registra la presencia o ausencia de estructuras del HMA: arbusculos, micelio, vesículas o esporas. De tal manera que se obtuvo el registro de 50 observaciones por raíz, se calcula el porcentaje de colonización por planta y por tratamiento. También se analizaron aleatoriamente raíces de *T. erecta* no inoculadas para corroborar que no existiera contaminación por algún hongo.

A.12 Digestión ácida. Las muestras secas y molidas de tejidos de la parte aérea y raíz fueron digeridas de acuerdo al protocolo USEPA SW-846 Method 3050B^[6]. Las muestras se pesaron y se colocaron en vasos de precipitados en donde se les agregó 10 mL de una solución 1:1 de HNO₃. Después de esto los vasos se taparon con vidrios de reloj, para el reflujo de los vapores y se colocaban en parrillas de calentamiento a una temperatura de 95°C (evitando la ebullición de la mezcla) y con agitación frecuente por 15 min. Posteriormente se les agregó 5 mL de HNO₃ concentrado, a la misma temperatura y con agitación durante 30 min. Al término de este tiempo se les agregó 5 mL de HNO₃ concentrado a las mismas condiciones por dos horas. Este último paso se repitió varias veces hasta que la solución no emitía humos marrones, lo que indica el término de la reacción. Después las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionó 2 mL de agua destilada y 2 mL de solución de H₂O₂ al 30%. Se cubrieron los vasos y se calentaron evitando que la solución efervesciera vigorosamente. Pasados 10 min se agregó 1 mL de la solución de H₂O₂. Este último paso se repitió hasta que la efervescencia desapareciera.

Además de la digestión de los tejidos se prepararon muestras:

- × Blanco. Esta muestra fue solo agua y el procedimiento de digestión descrito.
- × Método blanco *spike*. 10 mL de una solución acuosa en concentración de 10 mg·kg⁻¹ de Cu, sobre la que se realiza la digestión.

- ✱ *Matrix spike.* A la muestra de tejido de planta control (sin Cu en el sustrato) se le agrega 10 mL de una solución de Cu ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y se hace la digestión.

Terminada la digestión las soluciones se filtraron con papel Watman® número 41 y se aforaron a 50 mL con agua destilada.

A.13 Determinación de la concentración de Cu en tejidos vegetales y lixiviados.

Las concentraciones de Cu en raíces, brotes y lixiviados se midieron por Espectrometría de Absorción Atómica de Flama (FAAS) en un equipo PerkinElmer® 3100.

La espectrometría de absorción atómica consiste en la medición de la concentración de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La separación a nivel de especies atómicas se logra por atomización de la muestra, que es la más usada para Absorción Atómica de Flama, que nebuliza la muestra y luego la disemina en forma de aerosol en una flama de aire-acetileno.

De forma general, los análisis cuantitativos requieren de una curva de calibración, realizada con anterioridad con estándares de concentración conocida. Los estándares de Cu usados para la curva de calibración fueron de 2, 4, 6, 8 y 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Los estándares de calibración se prepararon a partir de un estándar patrón de $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Cu PerkinElmer®. La concentración de Cu en los lixiviados también se midió por FAAS, con la misma curva de calibración usada en las raíces y partes aéreas. Los lixiviados fueron colectados en una centrífuga Damon IEC HN.SII a 4000 rpm, 45 min y filtrados con papel filtro Whatman™ número 41, para hacer las mediciones de FAAS.

A.14 Modelación matemática de las concentraciones de Cu en los tejidos.

La modelación matemática de los resultados de concentración de Cu en los tejidos de raíces y parte aérea se realizó con el programa de análisis matemático y estadístico SigmaPlot V10® (Systat Software Inc.). Para esto se programó la secuencia que se muestra en la figura A4. SigmaPlot arroja la simulación de datos experimentales: los

parámetros independientes de la ecuación simulada, datos tabulados del resultado de la simulación, el análisis estadístico y el valor del coeficiente de correlación.

A.15 Análisis estadístico. Todos los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y la determinación de diferencias significativas (T-test) de los resultados se realizaron con el paquete estadístico ASSISTAT® Statistical Program, versión 7.5.

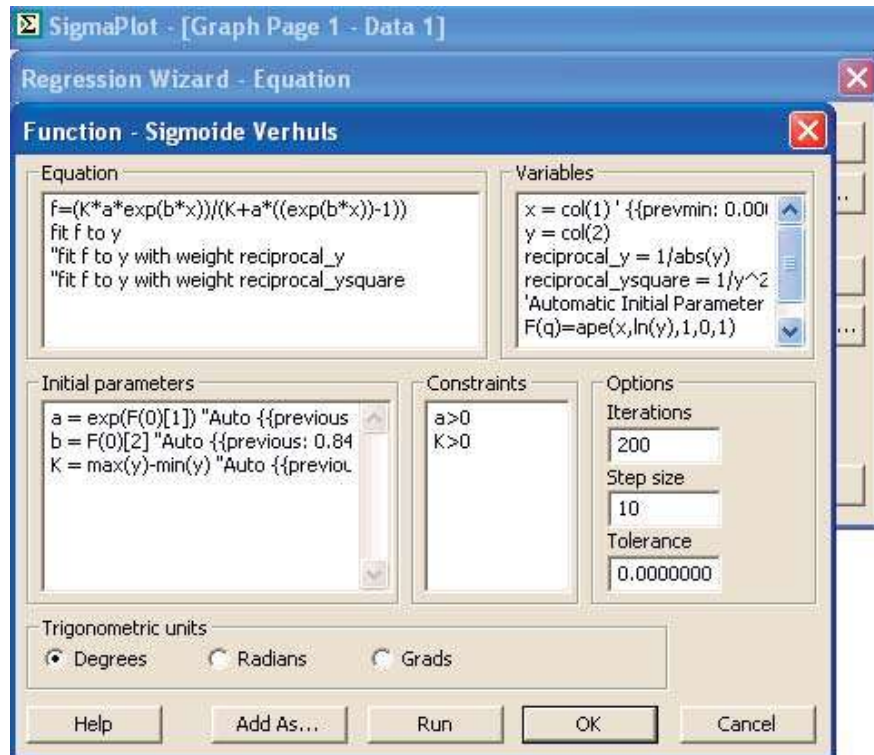


Figura A4. Secuencia programada en SigmaPlot® para la modelación matemática de datos experimentales.

APENDICE B

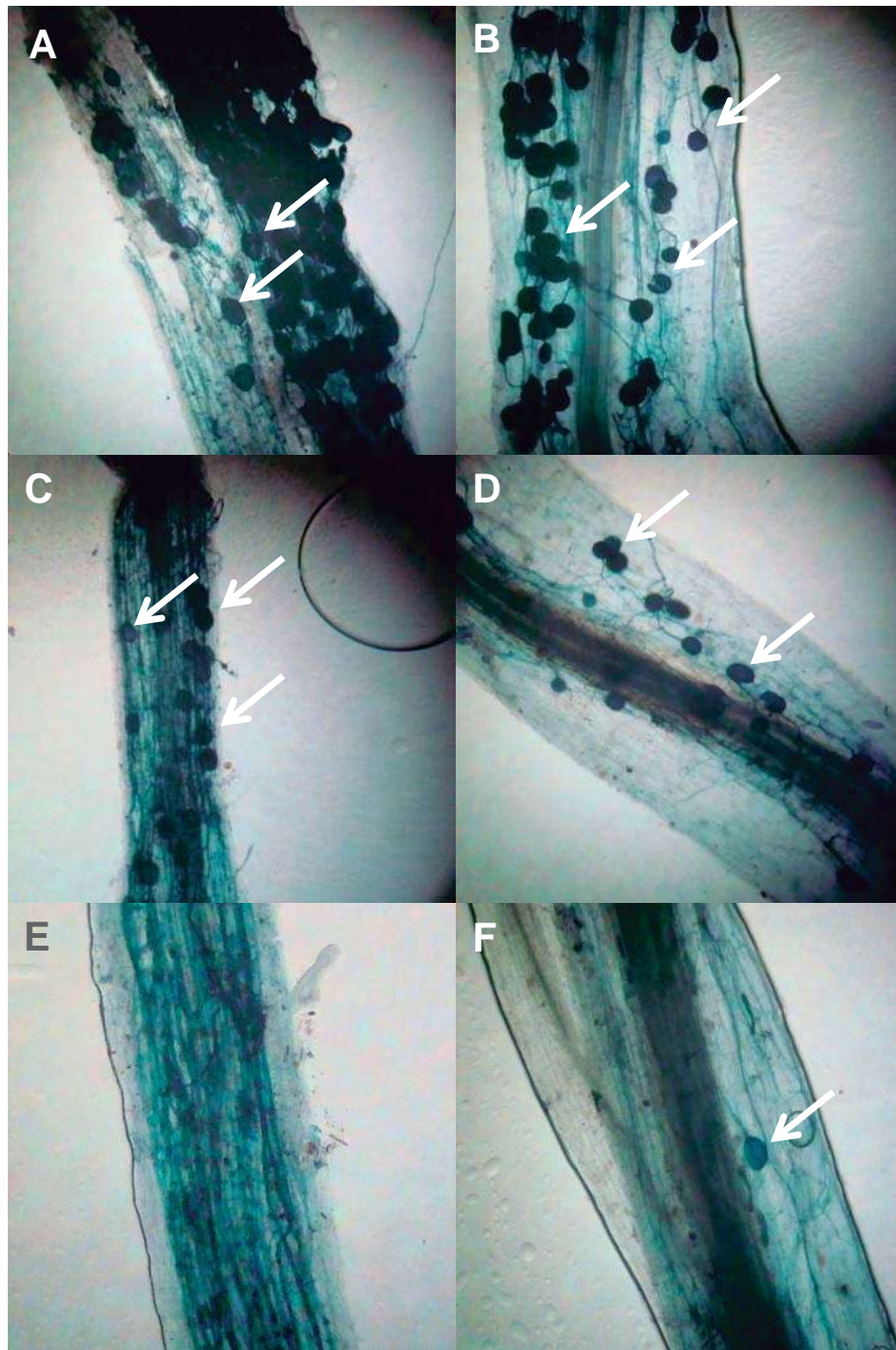


Figura B1. Imágenes de raíces de TeM crecida a concentraciones de Cu en el sustrato (C_s) de 2500 (A), 2000 (B), 1500 (C), 1000 (D), 500 (E) y 0 (F) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Las flechas blancas indican las vesículas.

REFERENCIAS

- Alloway B. J. 1995. **Soil processes and the behavior of metals**. En: Alloway, B. J. (Ed.) **Heavy metals in soils**. London, England. pp: 38–57.
- An Z. Q. y J. W. Hendrix. 1988. **Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain**. *Mycologia* 80:259–261.
- Asrar A. W. A. y K. M. Elhindi. 2011. **Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi**. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18:93-98.
- Assunção A., P. Martins, S. De Folter, R. Vooijs, H. Schat y M. G. M. Aarts. 2001. **Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens***. *Plant, Cell and Environment* 24:217-226.
- Auge R. M. 2001. **Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis**. *Mycorrhiza* 11:3–42.
- Azcón-Aguilar C., M. C. Jaizme-Vega y C. Calvet. 2002. **The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In Mycorrhizal technology in agriculture**. Birkhäuser Verlag, Germany. pp. 187-197.
- Baker A. J. M. 1981. **Accumulators and excluders: Strategies in the response of plants to heavy metals**. *Journal of Plant Nutrition* 3:643–654.
- Baker A. J. M. y R. R. Brooks. 1989. **Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements- a review of their distribution, ecology and phytochemistry**. *Biorecovery* 1:81-126.
- Baker A. J. M. y S. N. Whiting. 2002. **In search of the Holy Grail- a further step in understanding metal hyperaccumulation?** *New Phytologist* 155:1-4.

- Bakker J., F. J. Gommers, I. Niewenhuis y H. Wynberg. 1979. **Photoactivation of the nematicidal compound alpha-terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species): A possible singlet oxygen role.** *Journal of Biological Chemistry* 254:1841-1844.
- Barea J. M. y C. Azcon-Aguilar. 1983. **Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants.** *Advances in Agronomy* 36:1-54.
- Barea J. M. y P. J. Jeffries. 1995. **Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plants systems.** En Varma A. y B. Hock (Eds.) **Mycorrhiza.** Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp: 521-560.
- Baudouin C., M. Charveron, R. Tarrouse e Y. Gall. 2002. **Environmental pollutants and skin cancer.** *Cell Biology and Toxicology* 18:341–348.
- Baszynski T., A. Tukendorf, M. Ruszkowska, E. Shórzynska y W. Maksymiec. 1988. **Characterisitics of the photosyntetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper.** *Journal of Plant Physiology* 132:708-713.
- Bert V., P. Meerts, P. Saumitou-Laprade, P. Salis, W. Gruber y N. Verbruggen. 2003. **Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*.** *Plant and Soil* 249:9- 18.
- Berti W. R. y S. D. Cunningham. 2000. **Phytostabilization of metals.** En: Raskin I. y B. Ensley (Eds.) **Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment.** Wiley Interscience, New York, USA. pp: 71-88.
- Blaylock M., D. Salt, S. Dushenkov, O. Zakharova, C. Gussman, Y. Kapulnik, B. Ensley e I. Raskin. 1997. **Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents.** *Environmental Science and Technology* 31:860-865.
- Bonfante P. y A. Genre. 2010. **Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal simbiosis.** *Nature Communications* 1:48, DOI:10.1038/ncomms1046. Julio 2010.

- Bosiacki M. 2008. **Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 7:21-31.
- Bosiacki M. 2009a. **Phytoextracion of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part I. Effect of Cd and Pb on yielding.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 8:3-13.
- Bosiacki M. 2009b. **Phytoextracion of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta* L. Part II. Contents of Cd and Pb in plants.** *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 8:15-26.
- Brooks R. R., R. D. Reeves, R. S. Morrison y F. Malaisse. 1980. **Hyperaccumulation of copper and cobalt-a review.** *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 113:166-172.
- Brooks R. R., S. M. Naidu, F. Malaisse y J. Lee. 1987. **The elemental content of metallophytes from the copper/cobalt deposits of Central Africa.** *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 119:179-191.
- Brooks R. R., J. Lee, R. D. Reeves y T. Jaffré. 1977. **Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants.** *Journal of Geochemical Exploation* 7:49-77.
- Brun L.A., J. Maillet, P. Hinsinger y M. Pepin. 2001. **Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils.** *Environmental Pollution* 111:293-302.
- Brundrett M, N. Bougher, B. Dell, T. Grove y N. Malajczuk. 1996. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.** Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Castillo O. S., N. Dasgupta-Schubert, C. J. Alvarado, E. M. Zaragoza y H. J. Villegas. 2011. **The effect of the simbiosis between *Tagetes erecta* L. (marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of copper (II) and its implications for phytoremediation.** *New Biotechnology* DOI:10.1016/j.nbt.2011.05.009.

- Chen X., C. Wu, J. Tang y S. Hu. 2005. **Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment.** *Chemosphere*, 60:665-671.
- Chi Manzanero B. H., P. Flores y R. Rivera. 2002. **Cempasúchil: fuente importante de carotenoides,** *Revista Ciencia y Desarrollo XXVIII*, 165:20-25
- Ciscato M., R. Valcke, K. Van Loven, H. Clijsters y F. Navari-Izzo. 1997. **Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity.** *Physiologia Plantarum* 100:901-908.
- Clemens S., M. G. Palmgren y U. Krämer. 2002. **A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation.** *Trends in Plant Science* 7:309-315.
- Csuros M. y C. Csuros. 2002. **Environmental sampling and analysis for metals.** Lewis Publisher USA. p. 408.
- Cunningham S. 1995. **What plants can and cannot do.** En Proceedings/Abstracts of the Fourteenth Annual Symposium, Current Topics in Plant Biochemistry, Physiology and Molecular Biology Columbia - Will Plants Have a Role in Bioremediation? Columbia, MO, USA. pp: 47-48.
- Cuypers A., J. Vangronsveld y H. Clijsters. 2000. **Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation.** *Physiologia Plantarum* 110:512-517.
- Dasgupta-Schubert N., M. G. Barrera, C. J. Alvarado, O. S. Castillo, E. M. Zaragoza, S. Alexander, S. Landsberger y S. Robinson. 2011. **The uptake of copper by *Aldama dentata*: Ecophysiological response, its modeling, and implication for phytoremediation.** *Water, Air and Soil Pollution* 220:37-55.

- Davis L. C., S. Vanderhoof, J. Dana, K. Selk, K. Smith, B. Goplen y L. E. Erickson. 1998. **Movement of chlorinated solvents and other volatile organics through plants monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry.** *Journal of Hazardous Substance Research* 1:4-26.
- De Rienzo F., R. R. Gabdoulline, M. C. Menziani y R. C. Wade, 2000. **Blue copper proteins: a comparative analysis of their molecular interaction properties.** *Protein Science* 9:1439-1454.
- De Vos C. H. R., W. M. T. Bookum, R. Vooijs, H. Schat y L. J. De Kok. 1993. **Effect of copper on fatty acid composition and peroxidation of lipids in the roots of copper tolerant and sensitive *Silene cucubalus*.** *Plant Physiology and Biochemistry* 31:151-158.
- DiDonato R. J., L. A. Roberts, T. Sanderson, R. B. Eisley y E. L. Walker. 2004. ***Arabidopsis* yellow stripe-like2 (YSL2): a metal regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes.** *The Plant Journal* 39:403-414.
- Evanco C. R. y D. A. Dzombak. 1997. **Remediation of metals contaminated soils and groundwater.** Groundwater remediation technologies analysis center (GWRAC) "E" Series Report. p: 53.
- Falconi M. y A. Desideri. 2002. **Molecular modeling and dynamics of copper proteins.** En: Masaro E. J. (Ed.). **Handbook of copper pharmacology and toxicology.** Humana Press, Totowa, N.J., USA. pp: 81-101.
- Frías-Espericueta M. G., J. L. Osuna-López, F. J. Estrada-Toledo, G. López-López G y G. Izaguirre-Fierro. 2005. **Heavy metals in the edible muscle of shrimp from coastal lagoons located in the Northwest Mexico.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74:1098-1104.
- Frías-Espericueta M. G., J. L. Osuna-López, P. J. López-Sáenz, G. López-López G y G. Izaguirre-Fierro. 2004. **Heavy metals in surface sediments from Huizache-**

-
- Caimanero lagoon, NW coast of Mexico.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73:749-755.
- Gaur A. y A. Adholeya. 2004. **Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils.** *Current Science* 86:528–534.
- Gaur A. y A. Adholeya. 2005. **Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular mycorrhizal inocula in marginal soil attended with organic matter.** *Journal of Plant Nutrition* 28:707-723.
- Gaymard F., G. Pilot, B. Lacombe, D. Bouchez, D. Bruneau, J. Boucherez, *et al.*, 1998. **Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap.** *Cell* 94:647–655.
- Ghosh M. y S. P. Singh. 2005. **A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products.** *Applied Ecology and Environmental Research* 3:1–18.
- Giovannetti M. y B. Mosse. 1980. **An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots.** *New Phytologist* 84:489–500.
- Gocht W. R., H. Zantop y R. G. Eggert. 1988. **International mineral economics.** Springer-Verlag, Berlin, Germany. p 271.
- Gonzalez-Chavez M. C., R. Carrillo-Gonzalez, S. F. Wright y K. A. Nichols. 2004. **The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements.** *Environmental Pollution* 130:317–323.
- Göhre V. y U. Paszkowski. 2006. **Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation.** *Planta* 223:1115-1122.

- Gregory G. K., T. Shan Chen y T. Philip. 1986. **Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by High Performance Liquid Chromatography.** *Journal of Food Science* 51:1093-1094.
- Halcrow M. A., P. F. Knowles y S. E. Phillips. 2001. **Copper proteins in the transport and activation of dioxygen, and the reduction of inorganic molecules.** En: Bertini I., A. Sigel y H. Sigel (Eds.). **Handbook of Metalloproteins.** CRC Press, Basel, Switzerland. pp. 709-762.
- Hall J. L. 2002. **Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance.** *Journal of Experimental Botany* 53:1-11.
- Halliwell B. y J. M. C. Gutteridge. 1989. **Free radicals in biology and medicine.** Clarendon Press, Oxford, UK.
- Harper F. A., S. Smith y M. R. Macnair. 1998. **Can an increased copper requirement in copper-tolerant *Mimulus guttatus* explain the cost of tolerance? II. Reproductive phase.** *New Phytologist* 140:637-654.
- Hasan A. 1992. **Allelopathy in the management of root knot nematodes.** En: Rizvi S. J. H. y V. Rizvi (Eds.). **Allelopathy: Basic and applied aspects.** Chapman and Hall, London, UK. pp. 413-441.
- He Z. L., X. E. Yang y P. J. Stoffella. 2005. **Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19:125-140.
- Huang J., J. Chen, W. Berti y S. Cunningham. 1997. **Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction.** *Environmental Science and Technology* 31:800- 805.
- Jamal A., N. Ayub, M. Usman y A. G. Khan. 2002. **Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil.** *International Journal of Phytoremediation* 4:205–221.

- Jiang L. Y., X. E. Yang y Z. L. He. 2004. **Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens***. *Chemosphere* 55:1179-1187.
- Jiang W., D. Liu y X. Liu. 2001. **Effect of copper on root growth, cell division and nucleolus of *Zea mays***. *Biologia Plantarum* 44:105-109.
- Joner E., R. Briones y C. Leyval. 2000. **Metal binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium**. *Plant and Soil* 226:227-234.
- Kabata-Pendias A. 2000. **Trace elements in soils and plants**. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton, USA. pp: 365, 413.
- Kabir Z. y R. T. Koide. 2000. **The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize**. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78:167–174.
- Karley A. J., R. A. Leigh y D. Sanders. 2000. **Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells**. *Trends in Plant Science* 5:465–470.
- Khan A.G. 2005. **Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation**. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18:355–364.
- Kiminski J., W. J. Arsenault, C. E. Gallant y J. B. Sanderson. 2000. **The effect of marigolds (*Tagetes* spp.) and other cover crops on *Pratylenchus penetrans* and on following potato crops**. *J Nematology* 32:531-536.
- Knasmuller S., E. Gottmann, H. Steinkellner, A. Fomin, C. Pickl, A. Paschke, et al. 1998. **Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays**. *Mutation Research* 420:37–48.
- Koch K. A., M. M. Peña y D. J. Thiele. 1997. **Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling**. *Chemistry and Biology* 4:549-560.

- Kopittke P. M. y N. W. Menzies. 2006. **Effect of Cu on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*).** *Plant and Soil* 279:287-296.
- Lasat M. M. 2002. **Phytoextraction of toxic metals – A review of biological mechanisms.** *Journal of Environmental Quality* 31:109–120.
- Lidon F. C. y F. S. Henriques. 1991. **Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels.** *Journal of Plant Physiology* 138:115-118.
- Lidon F. C. y F. S. Henriques. 1993. **Changes in the thylakoid membrane polypeptide patterns triggered by excess Cu in rice.** *Photosynthetica* 28:109-117.
- Linderman R. G. y E. A. Davis. 2004. **Varied response of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi.** *Scientia Horticulturae* 99:67–78.
- Lindley P. F. 2001a. **Multi-copper oxidases.** En: Bertini I., A. Sigel y H. Sigel (Eds.). **Handbook of Metalloproteins.** CRC Press, Basel, Switzerland. pp: 763-812.
- Lindley P. F. 2001b. **Proteins of various functions containing copper.** En: Bertini I., A. Sigel y H. Sigel (Eds.) **Handbook of Metalloproteins.** CRC Press, Basel, Switzerland. pp: 857-880.
- Liu L. Z., Z. Q. Gong, Y. L. Zhang y P. J. Li. 2011. **Growth, cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi.** *Pedosphere* 21:319–327.
- Lombi E., F. Zhao, S. McGrath, S. Young y G. Sacchi. 2001a. **Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype.** *New Phytologist* 149:53-60.
- Lombi E., F. J. Zhao, S. J. Dunham y S. P. McGrath. 2001b. **Phytoremediation of heavy metal- contaminated soils: natural hyperaccumulation versus**

- chemically enhanced phytoextraction.** *Journal of Environmental Quality* 30:1919-1926.
- Macnair M., V. Bert, S. B. Huitson, P. Saumitou-Laprade y D. Petit. 1999. **Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 266:2175-2179.
- Maksymiec W. 1997. **Effect of copper on cellular processes in higher plants.** *Photosynthetica* 34:321-341.
- Malaisse F., J. Grégoire, R. S. Morrison, R. R. Brooks y R. D. Reeves. 1979. **Copper and cobalt in vegetation of Fungurume, Shaba Province, Zaïre.** *Oikos* 33:472-478.
- Malaisse F., R. R. Brooks y A. M. J. Baker. 1994. **Diversity of vegetation communities in relation to soil heavy metal content at the Shinkolobwe copper/cobalt/uranium mineralization, Upper Shaba, Zaïre.** *Belgian Journal of Botany* 127:3-16.
- Malarkodi M., R. Krishnasamy y T. Chitdeshwari. 2008. **Phytoextraction of nickel contaminated soil using castor phytoextractor.** *Journal of Plant Nutrition* 31:219–229.
- Marschner H. 1995. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, Academic Press, N.Y. USA.
- McCutcheon y Schnoor 2003, **Phytoremediation**. New Jersey, John Wiley & Sons, USA. p. 898.
- McIntyre T. 2003. **Phytoremediation of heavy metals from soils.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 78:97-123.
- Meharg A. y M. Macnair. 1992a. **Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of influx of arsenate and phosphate in *Holcus lanatus* L.** *Heredity* 69:336-341.

- Meharg A. y M. Macnair. 1992b. **Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system - a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L.** *Journal of Experimental Botany* 43:519-524.
- Mirlean N., A. Roisenberg y J. O. Chies. 2007. **Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil).** *Environmental Pollution* 149:10-17.
- Mithöfer A., B. Schulze y W. Boland. 2004. **Biotic and heavy metal stress response in plants.** *FEBS Letters* 566:1-5.
- Morrison R. S. 1980. **Aspects of the accumulation of cobalt, copper, and nickel by plants.** Ph.D. Thesis, Massey Univ., New Zealand.
- Morrison R. S., R. R. Brooks, R. D. Reeves y F. Malaisse. 1979. **Copper and cobalt uptake by metallophytes from Zaïre.** *Plant and Soil* 53:535-539.
- Mukherjee I., N. H. Campbell, J. S. Ash y E. L. Connolly. 2006. **Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper.** *Planta* 223:1-13.
- Murphy A., W. R. Eisenger, J. E. Shaff, L. V Kochian y L. Taiz. 1999. **Early-copper induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux.** *Plant Physiology* 121:1375-1382.
- Navari-Izzo F., M. F. Quartacci, C. Pinzino, V. F. Dalla y C. L. M. Sgherri. 1998. **Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper.** *Physiologia Plantarum* 104:630-638.
- Neumann P. M., M. P. De Souza, I. J. Pickering y N. Terry. 2003. **Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide.** *Plant, Cell and Environment* 26:897-905.
- Newman L., S. Strand, N. Choe, J. Duffy, G. Ekuan, M. Ruszaj, B. Shurtleff, J. Wilmoth, P. Heilman y M. Gordon. 1997. **Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars.** *Environmental Science and Technology* 31:1062-1067.

- Nobis M. y U. Hunziker. 2005. **Automatic thresholding for hemispherical canopy-photographs based on edge detection.** *Agricultural and Forest Meteorology* 128:243–250.
- Ouariti O., N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif y M. H. Ghorbal. 1997. **Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids.** *Phytochemistry* 45:1343-1350.
- Páez-Osuna F., S. R. Guerrero-Galván y A. C. Ruiz-Fernández. 1998. **The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in Mexico.** *Marine Pollution Bulletin* 36:65-75.
- Panou-Filotheou H. y A. M. Bosabalidis. 2004. **Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*).** *Plant Science* 166:1497-1504.
- Paton A. y R. R. Brooks. 1995. **A re-evaluation of *Haumaniastrum* species as geobotanical indicators of copper and cobalt.** *Journal of Geochemical Exploration* 56:37-45.
- Pätsikkä E., E. M. Aro y E. Tyystjarvi. 1998. **Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo.** *Plant Physiology* 117:619-627.
- Pätsikkä E., E. M. Aro y E. Tyystjarvi. 2001. **Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes.** *Physiologia Plantarum* 113:142-150.
- Peer W. A., I. R. Baxter, E. L. Richards, J. L. Freeman y A. S. Murphy. 2005. **Phytoremediation and hyperaccumulator plants.** En: Tamás M. J. y E. Martinoia (Eds.) **Topics in Current Genetics, Vol. 14: Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Pilon-Smits E. 2005. **Phytoremediation.** *Annual Review of Plant Biology* 56:15–39.

- Ploeg A. T. 1999. **Greenhouse studies on the effect of marigolds (*Tagetes* spp.) on four *Meloidogyne* species.** *Journal of Nematology* 31:62-69.
- Pollard J. A., K. D. Powell, F. A. Harper y J. A. C. Smith. 2002. **The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants.** *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 21:539-566.
- Quartacci M. F., E. Cosi y F. Navari-Izzo. 2001. **Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess.** *Journal of Experimental Botany* 52:77-84.
- Quartacci M. F., C. Pinzino, C. L. M. Sgherri, F. D. Vecchia y F. Navari-Izzo. 2000. **Growth in excess of copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat.** *Physiologia Plantarum* 108:87-93.
- Raman N., N. Nagarajan, S. Gopinathan y K. Sambandan. 1993. **Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India.** *Biology and Fertility of Soils* 16:76-78.
- Redecker D., R. Kodner y L. E. Graham. 2000. **Glomalean fungi from the Ordovician,** *Science* 289:1920-1921.
- Reeves R. D. 1992. **The Hyperaccumulation of Ni by serpentine plants.** En: Baker A. J. M., *et al.* (Eds) **The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils.** Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK. pp: 253-277.
- Reeves R. D., A. J. M. Baker, A. Borhidi y R. Berazaín. 1999. **Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba.** *Annals of Botany* 83:29-38.
- Reeves R. D. y A. J. M. Baker. 2000. **Metal-accumulating plants.** En: Raskin I. y B. D. Ensley (Eds.) **Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment.** John Wiley & Sons, Inc, New York, USA. pp: 193-229.

- Robinson B., J. E. Fernández, P. Madejón, T. Marañón, J. M. Murillo, S. Green, *et al.* 2003. **Phytoextraction: An assessment of biogeochemical and economic viability.** *Plant and Soil* 249:117–125.
- Rugh C. L., J. F. Senecoff, R. B. Meagher y S. A. Merkle. 1998. **Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation.** *Nature Biotechnology* 16:925-928.
- Rugh C. L., H. D. Wilde, N. M. Stack, D. M. Thompson, A. O. Summers y R. B. Meagher. 1996. **Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:3182-3187.
- Ruíz-Lozano J. M. 2003. **Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies.** *Mycorrhiza* 13:309-317.
- Rzedowski G. C. y J. Rzedowski. 2001. **Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.** Pátzcuaro, Michoacán, México. p 922. Edición digital http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Indice_Flora_del_Valle_de_Mx.pdf
- Salt D. E., R. D. Smith y I. Raskin. 1998. **Phytoremediation.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:643-668.
- Salt D. E. y U. Kramer. 2000. **Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants.** En: Raskin I. y B. Ensley (Eds.) **Phytoremediation of Toxic Metals.** John Wiley and Sons Inc., New York, USA. pp: 231-246.
- Sambandan K., K. Kannan y N. Raman. 1992. **Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in heavy metal polluted soils of Tamil Nadu, India.** *Journal of Environmental Biology* 13:159–167.

- Sancenón V., S. Puig, I. Mateu-Andrés, E. Dorcey, D. J. Thiele y L. Peñarrubia. 2004. **The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development.** *Journal of Biological Chemistry* 279:15348-15355.
- Schaaf G., A. Schikora, J. Haberle, G. Vert, U. Ludewig, J. Briat, C. Curie y N. von Wieren. 2005. **A putative function for the *Arabidopsis* Fe-Phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis.** *Plant and Cell Physiology* 46:762-774.
- Schnoor J. 1997. **Phytoremediation: ground water remediation technologies analysis center evaluation report TE-98-01**, 37, Edición digital: http://www.clu-in.org/download/toolkit/phyto_e.pdf
- Schnoor J., L. Licht, S. Mccutcheon, N. Wolfe y L. Carreira. 1995. **Phytoremediation of organic and nutrient contaminants.** *Environmental Science and Technology* 29:A318-A323.
- Schüßler A., D. Schwarzott y C. Walker. 2001. **A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution.** *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Serrato-Cruz M. A. 2004. **Cempoalxóchitl diversidad biológica y usos.** *Revista Ciencia y Desarrollo en Internet*, pp. 1-6. Acceso digital: <http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/181/articulos/pdf/Cempoalxochit.pdf>
- Simon L., J. Bousquet, R. C. Lévesque y M. Lalonde. 1993. **Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants.** *Nature* 363:67-69.
- Singh O. V., S. Labana, G. Pandey, R. Budhiraja y R. K. Jain. 2003. **Phytoremediation: an overview of metallicion decontamination from soil.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:405–412.

- Sipes B. S. y A. S. Arakaki. 1997. **Root-knot nematode management in dryland taro with tropical cover crops.** *Journal of Nematology* 29:721-724.
- Smith G. S., G. S. Johnston y I. S. Cornfoth. 1983. **Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture.** *New Phytologist* 94:537–548.
- Smith S. y D. Read. 1997. **Mycorrhizal symbiosis.** Academic Press, London.
- Song J., F. J. Zhao, Y. M. Luo, S. P. McGrath y H. Zhang. 2004. **Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils.** *Environmental Pollution* 128:307-315.
- Stoltz E. y M. Greger. 2002. **Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings.** *Environmental and Experimental Botany* 47:271-280.
- Suresh B. y G. Ravishankar. 2004. **Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up.** *Critical Reviews in Biotechnology* 24:97-124.
- Taylor J. y L. A. Harrier. 2001. **A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. *Elvira* (strawberry) when colonized by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi.** *Applied Soil Ecology* 18:205–215.
- Tester M. y R. A. Leigh. 2001. **Partitioning of nutrient transport processes in roots.** *Journal of Experimental Botany* 52:445–457.
- Tollsten L. y P. Muller. 1996. **Volatile organic compounds emitted from beech leaves.** *Phytochemistry* 43:759-762.
- Trapp S. 2004. **Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals.** *Environmental Science and Pollution Research*, 11:33-39.

- Turgut C., K. M. Pepe y T. J. Cutright. 2004. **The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*.** *Environmental Pollution* 131:147-154.
- Turnau K. 1998. **Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes of Southern Poland.** *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67:105–108.
- Uraguchi S., I. Watanabe, A. Yoshitomi, M. Kiyono y K. Kuno. 2006. **Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*.** *Journal of Experimental Botany* 57:2955–2965.
- Van Tichelen K. K., J. V. Colpaert y J. Vangrosveld. 2001. **Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity.** *New Phytologist* 150:203-213.
- Verhulst P. F. 1838. **Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement,** *Correspondence Mathématique et Physique* 10:113-121.
- Vierheilig H., A. P. Coughlan, U. Wyss y Y. Piché. 1998. **Ink and vinegar, a simple staining technique for Arbuscular–Mycorrhizal fungi.** *Applied and Environmental Microbiology* 64:5004–5007
- Vila A. J. y C. O. Fernández. 2001. **Copper in electron-transfer proteins.** En: Bertini I., A. Sigel y H. Sigel (Eds.). **Handbook of Metalloproteins.** CRC Press, Basel, Switzerland. pp. 813-856.
- Wang J. y V. P. Evangelou. 1994. **Metal tolerance aspects of plant cell walls and vacuoles.** En: Pessaraki M. (Ed.) **Handbook of Plant and Crop Physiology.** Marcel Dekker, Inc, New York, USA. pp. 695-717.
- Weiersbye I. M., C. J. Straker y W. J. Przybylowicz. 1999. **Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots or the grassm**

- Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings.** *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 158:335-343.
- Wintz H., T. Fox, Y. Y. Wu, V. Feng, W. Chen, H. S. Chang, T. Zhu y C. Vulpe. 2003. **Expression profiles of *A. thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis.** *Journal of Biological Chemistry* 278:47644-47653.
- Wu J., F. Hsu y S. Cunningham. 1999. **Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints.** *Environmental Science and Technology* 33:1898-1904.
- Yang H., J. W. Wong, Z. M. Yang y L. X. Zhou. 2001. **Ability of *Arogyrom elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel, and lead and root exudation of organic acids.** *Journal of Environmental Sciences* 13:368-375.
- Yen M. R., Y. H. Tseng y M. H. Saier. 2001. **Maize yellow stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) transporter.** *Microbiology* 147:2881-2883.
- Yruela I. 2005. **Copper in plants.** *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:145–156.
- Zepeda-Guzmán S., E. Ambriz-Parra, N. Dasgupta-Schubert y H. J. Villegas-Moreno. 2010. **Efecto de la interacción *Glomus intraradices*-Nitrógeno sobre el pH, acumulación de fósforo y desarrollo de *Tagetes erecta* L. bajo condiciones de agobio hídrico.** *Biológicas* 12:52-56.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

- [1][http://www.ipni.net/ppiweb/ltamn.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/e2970c70a1a2818405256fff0052993e/\\$FILE/Manejo%20de%20la%20fertilizaci%C3%B3n%20del%20aguacate%20%20%28Segunda%20Parte%29.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/ltamn.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/e2970c70a1a2818405256fff0052993e/$FILE/Manejo%20de%20la%20fertilizaci%C3%B3n%20del%20aguacate%20%20%28Segunda%20Parte%29.pdf). Último Acceso Junio de 2011.
- [2] <http://www.flickr.com/photos/51599422@N00/275165142/> Último Acceso Julio 2011.

[3] http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tagetes_erecta_Blanco2.404b.png Último acceso Julio 2011.

[4] Rothamstead Research Laboratory Methods version 896/019. Rothamstead Research. <http://www.rothamsted.ac.uk/aen/smbweb1/methods.php?id=896> Último acceso Enero 2011.

[5] <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/guide/index.html> Último acceso Junio 2011.

[6] US Environmental Protection Agency, 1996. Acid digestion of sediments, sludges and soils. En Method 3050b Último acceso Junio 2011. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>