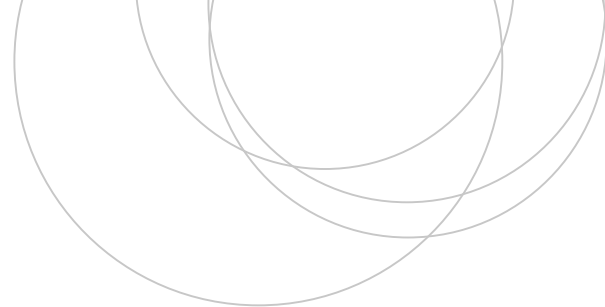




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología

Bioensayos con *Cucumis sativus* para el estudio de la toxicidad de suelos contaminados con metales

Evaluación de potenciales biomarcadores de exposición a metales

Autor/a:

Irene Ortega Sanz

Directores:

Dr. José María Becerril Soto

Dra. María Teresa Gómez Sagasti

© 2017, Irene Ortega Sanz

Leioa, 27 de junio de 2017

ÍNDICE

RESUMEN

| | |
|--|-------------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO | 4 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 5 |
| 3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL | 5 |
| 3.2. DETERMINACIÓN DE LOS ESTADÍOS DE CRECIMIENTO | 6 |
| 3.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>ASNI</i> | 7 |
| 3.4. DETERMINACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS | 9 |
| 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 9 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 9 |
| 4.1. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO FENOLÓGICO..... | 11 |
| 4.2. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA VEGETAL..... | 12 |
| 4.2.1. Análisis de la producción de biomasa total | 12 |
| 4.2.2. Análisis de la producción de biomasa radicular | 14 |
| 4.2.3. Análisis de la producción de biomasa de los cotiledones..... | 15 |
| 4.2.4. Análisis de la producción de biomasa foliar | 16 |
| 4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>ASNI</i> | 17 |
| 4.4. CONTENIDO EN α -TOCOFEROL..... | 19 |
| 5. CONCLUSIONES | 21 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 21 |
| ANEXO I. Galería de imágenes: bioensayos con <i>Cucumis sativus</i> | I.1 |
| ANEXO II. Tratamiento estadístico..... | II.1 |

RESUMEN

La contaminación de los suelos por metales supone un peligro para la supervivencia de los organismos a todos los niveles tróficos, afectando incluso a los seres humanos. En este sentido, los bioensayos con plantas son una herramienta integradora y eficaz para la detección de potenciales efectos ecotóxicos a través de biomarcadores de fitotoxicidad. Tradicionalmente, los bioensayos se realizan a corto plazo (horas) y con metales en disolución. Sin embargo, en este trabajo se apuesta por bioensayos a medio/largo plazo (días/meses) y con suelos contaminados con vistas a una evaluación del riesgo ambiental que recoja los efectos ecológicos más relevantes bajo condiciones reales. Así, en este trabajo se evaluó la toxicidad de suelos contaminados con Cu, Zn, Cd (de forma individual y combinada) a 0, 50, 100, 200 y 300 ppm tras 15 y 30 días de exposición mediante biomarcadores biométricos (desarrollo fenológico y biomasa), bioquímicos (contenido en α -tocoferol) y génicos (expresión del gen *ASNI*) utilizando la planta modelo *Cucumis sativus* (n. com. pepino). Los resultados de este estudio resaltan la importancia de las propiedades físicas (granulometría) y químicas (contenido en materia orgánica, carbonatos y pH) del suelo ya que afectan directamente sobre la biodisponibilidad de los metales, que influye, a su vez, en el potencial efecto tóxico que éstos tienen sobre las plantas. La baja biodisponibilidad de los tres metales (<1 ppm), asociada a la alta concentración de carbonatos y alto pH del suelo, no provocó un efecto tóxico notable sobre las plantas de *C. sativus*, a excepción del tratamiento polimetálico donde se observó un retraso en el desarrollo fenológico, la progresiva disminución de la biomasa y la sobreexpresión del gen *ASNI* en la raíz tanto a 15 como a 30 días. Asimismo, este estudio ha permitido establecer qué tejidos son los de mayor interés ecotoxicológico en función del tiempo de exposición. En los primeros 15 días fue la raíz el tejido que se desarrolló de forma exponencial y, por lo tanto, el más sensible y con mayor potencial diagnóstico. En cambio, a tiempos más largos (30 días) fueron las hojas las que adquirieron mayor relevancia y, en consecuencia, serán el tejido más propicio para determinar los biomarcadores de ecotoxicidad. Este tipo de bioensayos a largo plazo con suelos contaminados pueden ser una aproximación útil para la toma de decisiones en la gestión de suelos.

Palabras clave: metales, suelo, toxicidad, *Cucumis sativus*, bioensayo, largo plazo, biomarcador, *ASNI*, tocoferol.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existen aproximadamente 14 millones de compuestos químicos (Iqbal, 2016), entre ellos una gran variedad de compuestos orgánicos (p.e. hidrocarburos) e inorgánicos (p.e. metal(oid)es), fruto de diversas actividades antropogénicas como, por ejemplo, la minería, la metalurgia, el uso de insecticidas y fertilizantes y la quema de combustibles fósiles (Yadav, 2010). Desde la revolución industrial, metales e hidrocarburos se han ido liberando a los diferentes compartimentos de la ecosfera, superando sus umbrales límite y constituyendo una amenaza para la seguridad de la biota de la Tierra (Hassan *et al.*, 2016). Como resultado, se estima que en Europa hay un total de 2,5 millones de emplazamientos potencialmente contaminados (Van Liedekerke *et al.*, 2014).

Al contrario que los compuestos orgánicos, metales como el cadmio (Cd), cobre (Cu) y zinc (Zn), se caracterizan por no poder ser degradados, hecho que les confiere una alta persistencia en el medio ambiente (Chapman *et al.*, 2013). De esta forma, los metales pueden ser bioacumulados y biomagnificados a lo largo de la cadena trófica hasta llegar a los seres humanos (Zorrig *et al.*, 2010). Así pues y en combinación con sus potenciales efectos tóxicos, la contaminación por metales se ha convertido en un grave problema ambiental (Yadav, 2010).

Tanto si son esenciales para los organismos vivos (p.e. Zn y Cu) como si no tienen atribuida una función biológica (p.e. Cd), los metales resultan tóxicos para las plantas superiores por encima de una concentración crítica (Yadav, 2010). La exposición de las plantas a altos niveles de metales puede generar estrés oxidativo en ellas debido a una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que provoca daños en los diferentes componentes celulares como membranas, proteínas y ADN (Hossain *et al.*, 2012). Como resultado, las plantas desencadenan una respuesta antioxidante, activando enzimas del ciclo Halliwell-Asada y sintetizando metabolitos como el ascorbato, glutamato y tocoferoles.

La toxicidad depende en gran medida de su concentración biodisponible, tiempo y frecuencia de exposición y de la activación de mecanismos de protección, entre ellos la respuesta antioxidante (Gómez-Sagasti *et al.*, 2016). Además, diversos factores físico-químicos del suelo (p.e. tamaño de partícula, contenido de aniones, pH,

capacidad de intercambio catiónico, etc.) modifican de forma sustancial el efecto tóxico de los contaminantes (Barrutia *et al.*, 2009). Para evaluar la toxicidad de los contaminantes es preciso utilizar herramientas que reflejen la interrelación entre las propiedades físico-químicas y los potenciales efectos biológicos de los compuestos tóxicos. Es aquí donde los bioensayos ecotoxicológicos adquieren importancia.

Los bioensayos son estudios de laboratorio utilizados para cuantificar la ecotoxicidad de uno o varios contaminantes a través de la exposición de organismos modelo (Gómez-Sagasti, 2014). Los bioensayos integran los efectos biológicos de todos los compuestos a estudio, teniendo en cuenta factores como la biodisponibilidad o el efecto sinérgico o antagónico de ellos, por lo que son útiles para evaluar la toxicidad de mezclas de contaminantes (contaminación polimetálica) (Glosh *et al.*, 2017). Recientemente, los bioensayos con plantas se han convertido en una útil y eficiente herramienta para la monitorización de la toxicidad dada su sensibilidad, simplicidad y rapidez (Iqbal, 2016). Los bioensayos con plantas se caracterizan por un bajo coste de mantenimiento y la posibilidad de evaluar diferentes parámetros, como la tasa de germinación, elongación radicular, medida de la biomasa o actividad enzimática (Rizzo, 2011). Por eso, las plantas superiores constituyen excelentes modelos para estimar la salud de los suelos. Entre ellas, las especies más utilizadas son dicotiledóneas como el pepino (*Cucumis sativus*), lechuga (*Lactuca sativa*), rábano (*Raphanus sativus*) y trébol rojo (*Trifolium pratensis*); y monocotiledóneas como el trigo (*Triticum aestivum*), mijo (*Panicum miliaceum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*). De entre todas ellas, es de remarcar la especie *C. sativus*, que se caracteriza por su rápido crecimiento, fácil manipulación, mayor tamaño y biomasa que otras especies. Todo esto la convierten en una planta muy útil para realizar bioensayos ecotoxicológicos (Aydin *et al.*, 2012).

En los bioensayos se determinan biomarcadores de toxicidad relevantes para evaluar los efectos de la contaminación sobre la salud del suelo. Clásicamente, los biomarcadores se definen como cualquier cambio observable y/o cuantificable a nivel estructural, molecular, génico, fisiológico o de comportamiento asociados a la exposición de un organismo a uno o varios contaminantes (Liu *et al.*, 2009). De esta manera, los biomarcadores de toxicidad permiten identificar, evaluar y pronosticar el daño sobre los organismos expuestos a contaminantes. Junto a los biomarcadores

tradicionales de salud vegetal como biomarcadores biométricos (p.e. elongación radicular y biomasa), bioquímicos (p.e. contenido en pigmentos y antioxidantes), los análisis de expresión génica basados en microarrays de ADN y RT-qPCR permiten incorporar nuevos biomarcadores génicos en los bioensayos. La parte de la toxicología encargada del estudio de la expresión diferencial de los genes en distintas condiciones de estrés ambiental se conoce como ecotoxicogenómica (Hutchins *et al.*, 2010). Una de las ventajas de los biomarcadores génicos es su respuesta temprana, que evidencia los potenciales efectos tóxicos de los contaminantes mucho antes de que se manifiesten otros parámetros metabólicos o biométricos. Por ello, los biomarcadores génicos complementan la respuesta de las plantas al estrés causado por la contaminación, permiten analizar en profundidad los efectos tóxicos producidos por los contaminantes e inferir su mecanismo de acción. En ese sentido, Gómez-Sagasti *et al.* (2016) en un estudio de exposición a metales identificó varios genes en *A. thaliana* con potencial biomarcador de exposición temprana a metales, entre ellos el gen *ASNI* codificante de la asparagina sintetasa 1. Este gen desarrolla un papel importante en el metabolismo del nitrógeno al catalizar la transferencia del grupo amida de la glutamina (o amonio) al aspartato para dar asparagina y glutamato (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007), en una reacción dependiente de ATP. La asparagina, además de ser un aminoácido, sirve como almacén y transporte de nitrógeno. Se ha descrito que, en situaciones de estrés abiótico (alta temperatura, salinidad, exposición a metales o deficiencia nutricional), la disponibilidad de carbono disminuye como consecuencia de la menor capacidad fotosintética, y aumenta la proteólisis y la acumulación de amonio en los tejidos (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007). La sobreexpresión del gen *ASNI* indicaría una estimulación de los mecanismos de desintoxicación de amonio.

La mayor parte de los bioensayos de toxicidad se realizan en tiempos cortos de exposición (horas), siendo los de larga exposición (días o meses) más escasos por su coste, a pesar de que este tipo de ensayos permiten analizar el efecto tóxico final y la relevancia biológica de los procesos afectados. Por ello, en este trabajo se utiliza la planta de pepino (*Cucumis sativus*) como organismo modelo para los bioensayos a medio y a largo plazo con suelos contaminados, analizando su respuesta mediante biomarcadores biométricos (biomasa), bioquímicos (α -tocoferol) y génicos (expresión del gen de *ASNI*). El objetivo final es impulsar la incorporación de estos

biomarcadores a bioensayos de medio/largo plazo que permitan evaluar la ecotoxicidad de los suelos contaminados y la eficacia de los procesos de fitorremediación. La importancia de esta investigación radica en que el efecto sobre el gen *ASN1* podría suministrar información de gran valor para entender la respuesta de la planta ante el estrés por metales (impacto científico) y para la evaluación y gestión de entornos contaminados (impacto económico-social), en un momento en el que la contaminación creciente se perfila como una seria amenaza para la salud humana y la de los ecosistemas.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

La hipótesis de este trabajo es que los biomarcadores de plantas, como los biométricos, bioquímicos y particularmente los génicos, sirven para evaluar efectos tóxicos de los metales a medio/largo plazo, de forma que podrían resultar herramientas útiles para la evaluación de riesgos ambientales de suelos contaminados. Así, el objetivo principal de este estudio es determinar y evaluar el efecto de suelos contaminados con Cu, Zn y Cd, tanto de forma individual como combinada, sobre las plantas de *Cucumis sativus* tras 15 y 30 días de exposición. Este objetivo principal se ha desglosado en tres objetivos parciales:

- Objetivo 1. Evaluación de los biomarcadores biométricos a través del análisis del desarrollo fenológico y biomasa vegetal (planta entera, raíz, cotiledones y hoja).
- Objetivo 2. Evaluación de los perfiles de expresión del gen *ASN1* mediante RT-qPCR.
- Objetivo 3. Evaluación del contenido en antioxidantes lipofílicos (α -tocoferol) mediante UHPLC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de evaluar el efecto de los metales sobre los parámetros biométricos, antioxidantes y el gen *ASNI*, se diseñó un bioensayo de exposición a metales. Los suelos utilizados para este experimento se recolectaron de la periferia del área metropolitana de Vitoria-Gasteiz (42°50'N; 2°40'W) y se tamizaron *in situ* a 6 mm. La caracterización físico-química de este suelo se indica en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Caracterización físico-química del suelo del estudio.

| Composición | Suelo degradado |
|----------------------|-----------------|
| Arcilla (%) | 23,4 |
| Arena gruesa (%) | 17,9 |
| Arena fina (%) | 21,3 |
| Limo (%) | 37,5 |
| Textura (USDA) | Franco |
| pH (1:2,5) | 7,9 |
| Carbonatos (%) | 54,7 |
| Materia orgánica (%) | 1,0 |
| [Zn] Tot/Bio (ppm) | 41,4 / 0,0 |
| [Cu] Tot/Bio (ppm) | 6,9 / 0,01 |
| [Cd] Tot/Bio (ppm) | 0,3 / 0,0 |

USDA: United States Department of Agriculture
 Tot: concentración total de metal
 Bio: concentración biodisponible de metal

Se utilizaron contenedores con una capacidad de 36 g PF suelo contenedor⁻¹ para el bioensayo a medio plazo y de 230 g PF suelo contenedor⁻¹ para el bioensayo a largo plazo. El suelo fue contaminado artificialmente con Zn, Cu y Cd (de forma individual) en forma de nitrato a cada una de las siguientes concentraciones finales (ppm): 50, 100, 200 y 300. Además, se dispuso un cuarto tratamiento con la mezcla de los tres metales a cada una de las concentraciones anteriormente establecidas (mezcla polimetálica). También se utilizó un control sin metal (0 ppm). Todos los tratamientos

se suplementaron con KNO_3 para compensar el contenido en nitratos del tratamiento con mayor concentración de metales. Se realizaron por cada tratamiento 3 réplicas biológicas. Los suelos se colocaron en los contenedores y se dejaron estabilizar durante dos meses antes de la siembra de las plantas en una cámara de crecimiento.

A los dos meses de la contaminación de los suelos con metales, se sembraron dos semillas pregerminadas de pepino con una radícula emergida de ~20 mm por contenedor. La pregerminación se realizó incubando las semillas 96 horas sobre papel de filtro humedecido con agua desionizada. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 25/18 °C día/noche y un fotoperiodo de 14/10 horas día/noche con densidad de flujo de fotones de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los contenedores de menor y mayor capacidad se regaron cada 48 h con 40 mL y 30 mL aproximadamente de agua desionizada, respectivamente.

Tras 15 y 30 días, las plántulas de *C. sativus* se cosecharon, se lavaron con agua desionizada, se secaron con papel absorbente y se separaron en parte aérea y radicular. De cada plántula, se extrajeron muestras de la raíz, cotiledones y hojas y, tras obtener su peso fresco, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para la determinación de la expresión del gen *ASN1* (Objetivo 2) y el contenido en antioxidantes (Objetivo 3); mientras que, aquellas muestras destinadas a la determinación de biomasa, se dejaron secar a 80 °C durante 5 días, se pesaron para determinar su peso seco (Objetivo 1) y se conservaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

3.2. DETERMINACIÓN DE LOS ESTADÍOS DE CRECIMIENTO

Se determinaron cuatro estadios de desarrollo (cotiledón –C–, hoja primaria –H1–, hoja secundaria –H2– y hoja terciaria –H3–) para cada una de las réplicas biológicas que conforman cada concentración de metal (n=3). La presencia de estadio/tejido puntuaba (+1), mientras que la ausencia no (0). Al final, se realizó un sumatorio de la puntuación de cada réplica para cada estadio alcanzado. El promedio obtenido por las tres réplicas se utilizó para representar el estadio alcanzado en cada concentración de cada tratamiento metálico.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ASN1*

Para la extracción del ARN de las radículas se utilizó el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Antes de proceder, todo el material fue autoclavado y la zona de trabajo limpiada con agua desionizada y etanol al 96%. La concentración de ARN se midió espectrofotométricamente con el equipo NanoDrop Lite (NanoDrop Technologies). La relación entre la absorción a 260 y 280 nm se tuvo en cuenta para evaluar la calidad del ARN extraído. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su tratamiento con DNase I de Invitrogen (kit DNase I de Applied Biosystems) para eliminar el ADN genómico. A continuación, a cada muestra de ARN a ~0,2 µg/µL, se añadió 1 µL de DNase I (2 U) y se incubaron las muestras 37°C/30 minutos. Tras añadir 4,5 µL de EDTANa₂ 50 mM a cada muestra, estas se volvieron a incubar 75°C/10 minutos y se guardaron a -20°C. Una vez eliminado el ADN genómico, se realizó la retrotranscripción (RT) para obtener el ADN complementario con el kit PrimeScript RT Reagent Kit (Takara). La mezcla de reacción se incubó 37°C/15 minutos, seguido de 85°C/5 segundos. Las muestras de la RT se conservaron a -20°C.

Las secuencias de los cebadores específicos para el gen de interés *ASN1* y los genes de referencia *EF1* (factor de elongación-1α), *CACS* (subunidad del complejo adaptador de la clatrina) y *TIP41* (activador de la PP2A fosfatasa) (Migocka y Papierniak, 2011) se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores específicos para los genes seleccionados por su potencial como biomarcadores de exposición temprana a metales en *Cucumis sativus*.

| Gen | Descripción | Secuencia (F/R) |
|--------------|---|--|
| <i>ASN1</i> | Aspargina sintetasa 1 | CCCACAGAACTCAGCTCGTC/ CAGCGTCCCATTTCGACAGC |
| <i>EF1</i> | Factor de elongación-1α | ACTTTATCAAGAACATGATTAC/ TTCCTTCACAATTCATCG |
| <i>CACS</i> | Subunidad del complejo adaptador de la clatrina | TGGGAAGATTCTTATGAAGTGC/ CTCGTCAAATTTACACATTGGT |
| <i>TIP41</i> | Activador de la PP2A fosfatasa | CAACAGGTGATATTGGATTATGATTATAC/ GCCAGCTCATCTCATATAAG |

La especificidad de los cebadores del gen *ASN1* se comprobó *in silico* mediante la herramienta bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Los

cebadores se diseñaron con el programa Primer3 Plus (Rozen y Skaletsky, 2000). Los criterios establecidos para el diseño de los cebadores fueron los siguientes: (i) tener una longitud entre 18-22 pb; (ii) producir un producto de amplificación entre 80 y 150 pb; y, (iii) tener una temperatura de hibridación similar entre los dos cebadores (F: forward, y R: reverse) de aproximadamente 60 °C.

Para la RT-qPCR se utilizó el kit SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara) y se utilizó el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems). Los reactivos para la mezcla Master Mix de reacción y las condiciones de cada ciclo de qPCR se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 3**).

Tabla 3. Reactivos de la mezcla Master Mix y condiciones de la qPCR.

| Master Mix | | Programa de amplificación | | |
|-------------------------|--------------|---------------------------|--------|--------------|
| Reactivo | Volumen (μL) | Temperatura (°C) | Tiempo | Nº de ciclos |
| H ₂ O MilliQ | 7,5 | 50 | 20 s | |
| SYBR | 12,5 | 95 | 10 min | |
| ROX | 0,5 | 95 | 15 s | 45 |
| Cebador F 10 μM | 1,5 | 60 | 1 min | |
| Cebador R 10 μM | 1,5 | 95 | 30 s | |
| cDNA | 1,5 | 60 | 15 s | |
| | | 95 | 15 s | |

La visualización y corrección de errores técnicos, así como la idoneidad de las curvas de disociación de los cebadores, se realizó con el programa StepOne Plus v2.3 (Applied Biosystems). Posteriormente, para la cuantificación relativa de la expresión se establecieron las muestras “control” (0 ppm de metal) como “muestras calibradoras” y los genes *EF1*, *CACS* y *TIP41* como “genes de referencia”. Los valores obtenidos en forma de “órdenes de cambio” (OC) se obtuvieron a través de la siguiente ecuación (1) (Livak y Schmittgen 2001):

$$OC = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$; $\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ *ASNI* en muestra} - Ct \text{ *EF1+CACS+TIP41* en muestra}$; $\Delta Ct \text{ calibrador} = Ct \text{ *ASNI* en muestra "control"} - Ct \text{ *EF1+CACS+TIP41* en muestra "control"}$.

3.4. DETERMINACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS

El contenido en antioxidantes lipofílicos se determinó mediante UHPLC siguiendo el método que describen García-Plazaola y Becerril (1999) con las modificaciones de García-Plazaola y Becerril (2000). La extracción de los metabolitos se realizó mediante homogeneizador eléctrico (Tissue Tearor 985370) a 5.000 rpm en 1,4 mL de acetona 100%. Los extractos se centrifugaron a 13.200 rpm a 4 °C durante 10 min, se recogió el sobrenadante que se enrasó a 1,5 mL y se pasó por un filtro de PTFE de 0,2 µm. El análisis cromatográfico se realizó usando un UPLC Waters Acquity H-Class (Milford, MA, USA) equipado con un detector de fotodiodos PDA-detector y un detector de fluorescencia FLR-detector.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en la biomasa vegetal (total, raíz, cotiledones y foliar), expresión del gen *ASN1* y contenido en α -tocoferol entre las concentraciones de cada tratamiento metálico, se comprobó la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad (prueba de Levene) de los datos. Cuando la hipótesis nula de ambas pruebas fue aceptada, la posible existencia de diferencias entre concentraciones se realizó mediante ANOVA de una vía seguida del pos-hoc Duncan ($P < 0,05$). Si los datos tenían una distribución normal no homogénea el pos-hoc utilizado fue Games-Hawell ($P < 0,05$). En caso de que los datos no tuviesen una distribución normal, se utilizó la prueba de ANOVA de 1 vía de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS© 22.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tradicionalmente, los bioensayos de ecotoxicidad con plantas se han estandarizado para determinar la potencial toxicidad de los metales a tiempos cortos (normalmente, entre 48 y 72 horas de exposición) y partiendo de medios acuosos (p.e. extractos de suelos) (Hipólito, 2015). Poco son los estudios que abordan la problemática de los suelos contaminados partiendo del propio suelo como matriz de estudio e

implementando bioensayos a medio/largo plazo que sirvan para determinar cambios a distintos niveles de organización (desde el nivel de individuo hasta el nivel molecular). Este trabajo se centró en un suelo degradado artificialmente contaminado con Cu, Zn, Cd y la mezcla de todos ellos, siendo esta última la situación más habitual en emplazamientos contaminados. Las concentraciones de metales totales establecidas para este estudio superaron los Valores Indicativos de Evaluación B (VIE-B) (Ley 4/2015 CAPV) por encima de los cuales se considera que un suelo está potencialmente contaminado y supone un riesgo ($[Zn]_{total}$ y $[Cu]_{total}$: 3 ppm; $[Cd]_{total}$: 5 ppm). Además, como se observa en la **Tabla 1**, el suelo sobre el que se ha cimentado este estudio se caracteriza por un pH básico, alta cantidad de carbonatos y partículas finas, factores que favorecen la adsorción de los metales a la matriz (Tejada-Tovar *et. al*, 2015). Consecuentemente, estos condicionantes físico-químicos resultan en una baja biodisponibilidad de cationes metálicos. De hecho, el porcentaje de biodisponibilidad de cada metal fue muy bajo (0,03%, 0,01% y 0,12% para el Zn, Cu y Cd, respectivamente) tras el periodo de estabilización de los metales en este mismo suelo (comunicación personal de Gómez-Sagasti; **Tabla 4**). Así, la conversión de la concentración total de metal a concentración biodisponible muestra valores siempre inferiores a 1 ppm para cualquiera de las concentraciones/tratamientos.

Tabla 4. Equivalencias entre la concentración total (teórica) y concentración biodisponible (calculada) de los metales del estudio.

| [Total] (ppm) | [Biodisponible] (ppm)* | | | Polimetálica |
|---------------|------------------------|-------|-------|--------------|
| | Zn | Cu | Cd | |
| 50 | 0,0131 | 0,006 | 0,061 | 0,1 |
| 100 | 0,0262 | 0,012 | 0,122 | 0,2 |
| 200 | 0,0523 | 0,023 | 0,243 | 0,3 |
| 300 | 0,0785 | 0,035 | 0,365 | 0,5 |

*La conversión se realizó teniendo en cuenta el porcentaje de biodisponibilidad de cada metal (Zn: 0,03%; Cu: 0,01% y Cd: 0,12%) en un ensayo de microcosmos realizado con el mismo suelo. La concentración biodisponible del tratamiento polimetálico es la suma de las concentraciones biodisponibles obtenidas para cada metal.

4.1. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO FENOLÓGICO

Aunque existen evidencias sobre los efectos deletéreos que producen cantidades excesivas de metales en la embriogénesis y órganos reproductivos de las plantas, pocos son los estudios que detallan la toxicidad de los metales a lo largo del desarrollo del individuo (Orroño y Lavado, 2009). En este sentido, es importante el análisis de los estados fenológicos (i.e. las etapas de crecimiento y desarrollo) de las plantas expuestas a metales ya que permite discernir tales efectos (Objetivo 1; **Figura 1**).

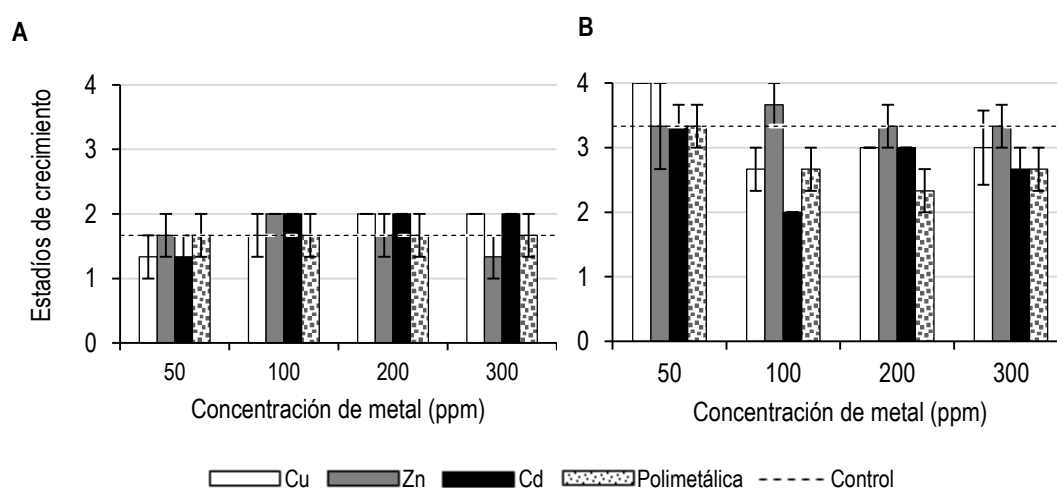


Figura 1. Análisis de los estadios de crecimiento en plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (blanco), Zn (gris), Cd (negro) y mezcla polimetálica (punteado). La etapa de desarrollo alcanzada por el tratamiento control se marca con una línea discontinua. El valor "1" supone la aparición de cotiledones (C), "2" de hoja primaria (H1), "3" de hoja secundaria (H2) y "4" de hoja terciaria (H3).

Tras 15 días de exposición, las plantas de *C. sativus* expuestas a prácticamente todos los metales y concentraciones (a excepción de aquellas expuestas a 50 ppm de Cu y Cd y 300 ppm de Zn) alcanzaron la misma etapa de desarrollo (i.e. H1) que las plantas crecidas en suelos sin metales (control) (**Figura 1A**). En comparación con las plantas expuestas a metales durante 30 días que llegaron a producir hoja secundaria (**Figura 1B**), las plantas expuestas 15 días mostraron un estadio menos avanzado. Esto fue indicativo de la falta de afección de los metales sobre el desarrollo fenológico de las plantas.

A los 30 días se observan diferencias más notables. Las plantas más afectadas y cuyo desarrollo sufrió cierto retraso fueron aquellas crecidas en suelos contaminados con la mezcla polimetálica. El retraso en el desarrollo es un síntoma de toxicidad de los contaminantes. Los resultados indican que solo la combinación de metales y tiempos largos de exposición tiene un efecto sobre el desarrollo de la planta. En cambio, a concentraciones de 50 ppm, 100 ppm de Zn y 200 y 300 ppm de Zn, las plantas de *C. sativus* presentaron el mismo estadio que las plantas control (i.e. H3) (**Figura 1B**). Esto se entendió como un síntoma de la baja afeción de esos tratamientos bajo las condiciones experimentales establecidas.

Se debe remarcar que, a pesar de superar los valores VIE-B, las concentraciones de metales biodisponibles de los suelos contaminados fueron tan bajas (**Tabla 4**) que no generaron toxicidad. Este hecho denota la necesidad de no sólo trabajar con distintos suelos reales con distintas características físico-químicas sino también de revisar la Ley 4/2015 y virar desde el uso de la concentración total hacia la utilización de las concentraciones biodisponibles a la hora de fijar el riesgo por contaminación metálica.

4.2. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA VEGETAL

Al igual que el análisis de la fenología, la evaluación de la producción de biomasa seca (Objetivo 1) permite estudiar el efecto tóxico de los metales sobre las plantas, partiendo de la base de que aquellas con una menor producción serán las más afectadas (Orroño y Lavado, 2009).

4.2.1. Análisis de la producción de biomasa total

Como era de esperar, la biomasa total de las plantas sometidas a 15 días de exposición a metales (**Figura 2A**) fue inferior a la obtenida en plantas expuestas durante 30 días a esos mismos tratamientos (**Figura 2B**). En esta línea, se observó la correlación entre los estadios de crecimiento y la biomasa total de las plantas en función del tiempo. No se observó disminución de la biomasa total de las plantas de 15 días en ninguna concentración, a excepción de la concentración de 50 ppm de cada metal que produjo una ligera reducción (significativa en el caso del Cu) (**Figura 2A; Tabla AII.1.**). Esto sugiere que los metales apenas tuvieron efecto tóxico a los 15 días.

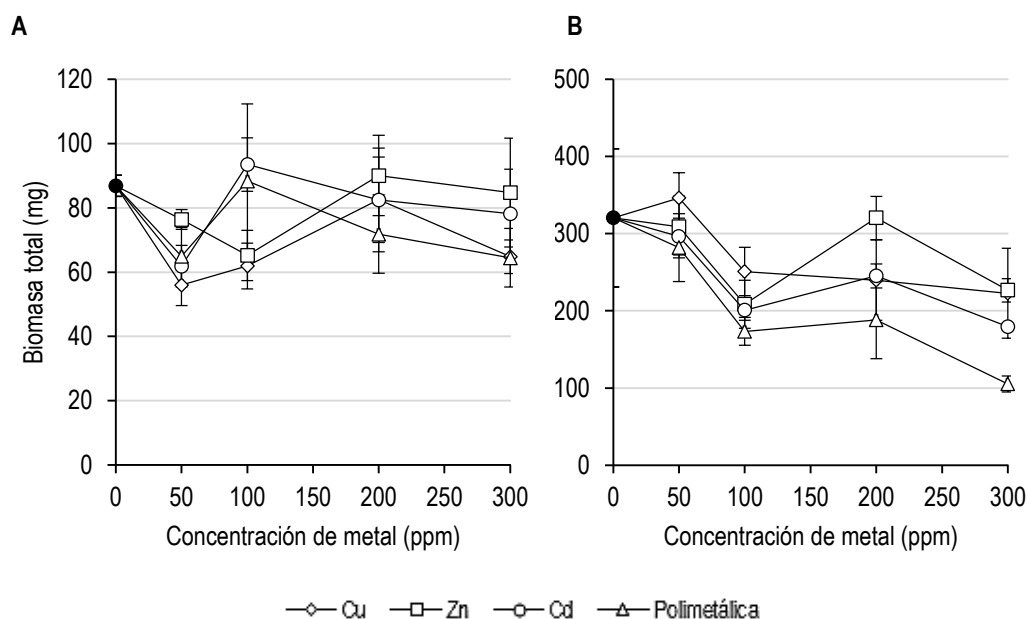


Figura 2. Contenido de biomasa total en plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo) y mezcla polimetálica (triángulo).

Sin embargo, a los 30 días y, especialmente, bajo el tratamiento de mezcla polimetálica, la biomasa total tendió a disminuir con el aumento de la concentración (**Figura 2B**). El menor desarrollo observado en este tratamiento (**Figura 1B**) contribuye a la menor biomasa encontrada en presencia de varios metales. En el resto de tratamientos, la disminución de biomasa fue menor. El perfil de la biomasa total de las plantas crecidas en suelos contaminados con Cu y Cd fue similar: la biomasa total tendió a reducirse progresivamente hasta los 100 ppm, concentración a partir de la cual se mantuvo estable. En el caso del Cd, el retraso fenológico observado a 100 ppm (**Figura 1B**) no afectó a la biomasa total. La producción de biomasa de las plantas expuestas a Zn, en cambio, fluctuó a lo largo de las concentraciones, adquiriendo a 200 ppm un valor máximo de biomasa seca similar al de las plantas control.

La baja disponibilidad de los metales en el suelo del estudio (**Tabla 4**) no ha mostrado diferencias notables en la biomasa a los 15 días. Sin embargo, se ha descrito que los metales afectan a varios procesos fisiológicos incluidos los procesos fotosintéticos (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2007), que finalmente impiden el desarrollo y crecimiento de la planta (Barrutia *et al.*, 2009), tal y como ocurre en este caso a 30 días de exposición.

4.2.2. Análisis de la producción de biomasa radicular

Bajo las condiciones experimentales establecidas, se observó que, en términos generales, las plantas de *C. sativus* expuestas a metales durante 15 días presentaron una biomasa radicular ligeramente inferior a la producida por las plantas expuestas 30 días. Asimismo, las plantas de 15 días crecidas en suelos con Zn, Cd y mezcla polimetálica produjeron menos biomasa radicular que las plantas control (**Figura 3A**). El tratamiento con Cu, a pesar de causar una caída de biomasa radicular a 50 ppm, aumentó su producción a 100 y 200 ppm.

A los 30 días de exposición (**Figura 3B**), el tratamiento de Zn (independientemente de la concentración) no produjo una variación en la producción de biomasa radicular, mientras que la de aquellas plantas crecidas en suelos contaminados con Cd fluctuó, obteniendo valores mínimos de 14 mg PS a 100 ppm. Los tratamientos de Cu y mezcla polimetálica produjeron un aumento de la biomasa radicular a 50 ppm. Sin embargo, a mayores concentraciones, el tratamiento con Cu redujo progresivamente la biomasa radicular, mientras que la mezcla polimetálica causó una reducción acusada y significativa (**Figura 3B; Tabla AII.2.**).

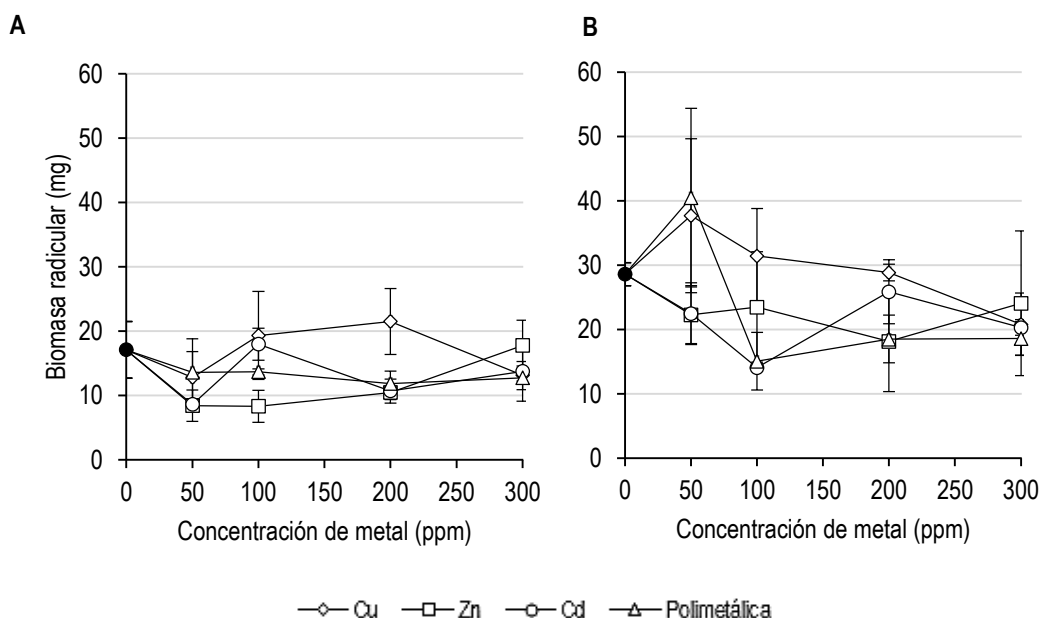


Figura 3. Contenido de biomasa radicular en plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo) y mezcla polimetálica (triángulo).

A tiempos largos de exposición analizados (30 días), el efecto de los tratamientos metálicos en la raíz no fue muy acusado debido a la baja disponibilidad de los metales. Además, se observó un menor crecimiento en la biomasa de la raíz en comparación con otros órganos de la planta (p.e. hojas) (Orroño y Lavado, 2009), los cuales, al tener un crecimiento más activo podrían resultar más sensibles a los tratamientos.

4.2.3. Análisis de la producción de biomasa de los cotiledones

Al igual que se observó en la producción de biomasa radicular, las plantas expuestas a metales durante 15 días (**Figura 4A**) presentaron, en conjunto, una biomasa de los cotiledones inferior a la producida por las plantas expuestas 30 días (**Figura 4B**). Al final de los 15 días de exposición, las plantas de *C. sativus* expuestas a las diferentes concentraciones y a los diferentes tratamientos metálicos produjeron una biomasa de cotiledones similar a las plantas control (**Figura 4A**). El Cu fue el tratamiento más tóxico, causando una reducción significativa del parámetro a 50, 100 y 300 ppm (**Figura 4A; Tabla AII.1.**).

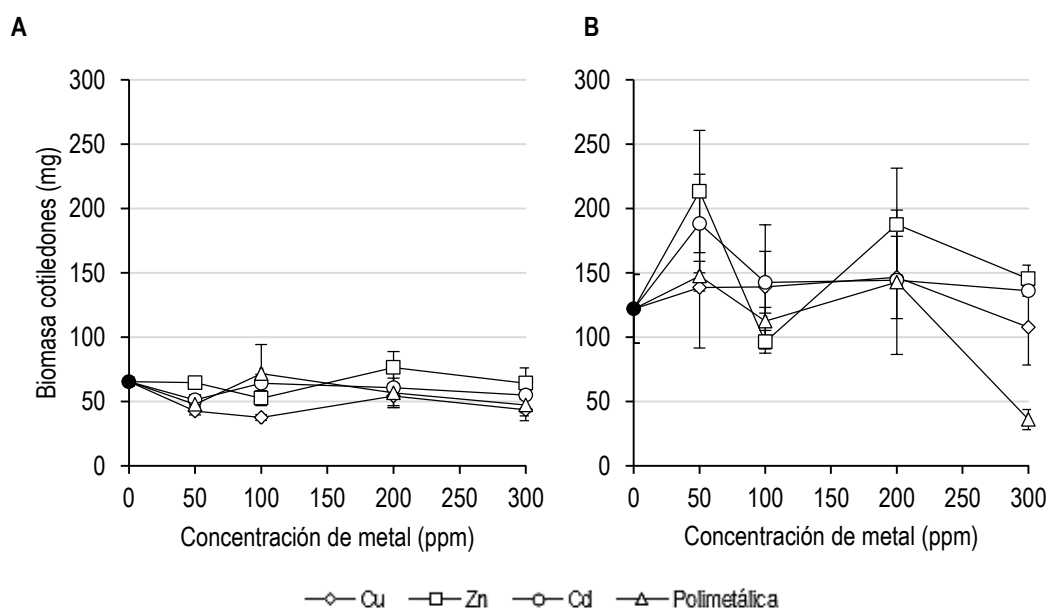


Figura 4. Contenido de biomasa de los cotiledones en plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo) y mezcla polimetálica (triángulo).

Las plantas de *C. sativus* expuestas durante 30 días a metales, mostraron una producción de biomasa de los cotiledones similar a la obtenida en plantas control (**Figura 4B**). Tan solo los tratamientos de Zn y mezcla polimetálica produjeron reducciones significativas en la biomasa de los cotiledones a 100 y 300 ppm, respectivamente (**Figura 4B; Tabla AII.2.**).

Al igual que lo observado en la raíz, el bajo crecimiento de los cotiledones de 15 a 30 días justifica la baja incidencia de los metales en este parámetro. Esto indica que la disminución en biomasa total a los 30 días (**Figura 2B**) no se justifica por una afectación ni de la biomasa radicular ni de los cotiledones.

4.2.4. Análisis de la producción de biomasa foliar

Durante los primeros 15 días, el peso de las hojas de las plantas control fue solo de 4 mg (**Figura 5A**). Sin embargo, en los siguientes 15 días, el crecimiento de este órgano fue muy rápido, alcanzando los 80 mg (**Figura 5B**). Este crecimiento fue mucho mayor y más rápido que el observado para raíz (**Figura 3**) y cotiledones (**Figura 4**).

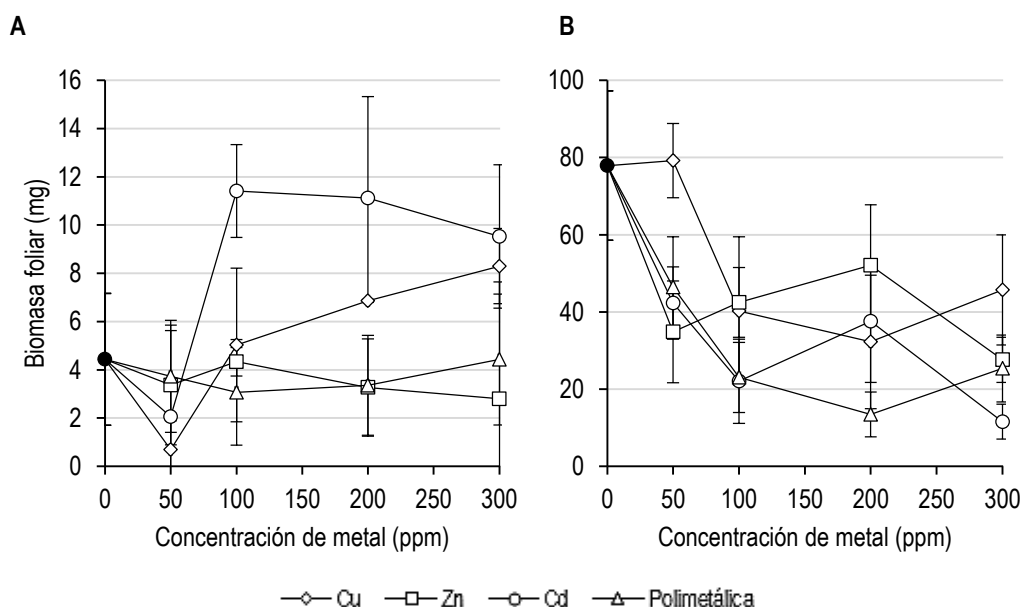


Figura 5. Contenido de biomasa foliar en plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo) y mezcla polimetálica (triángulo). La biomasa foliar se ha calculado teniendo en cuenta la presencia/ausencia de hoja primaria para las plantas expuestas 15 días y de hoja primaria y secundaria para las plantas expuestas 30 días. La ausencia de hoja en una planta se ha considerado como "0 mg" a la hora de hacer el promedio de cada tratamiento.

Las plantas expuestas a metales durante 30 días mostraron una biomasa foliar inferior al control, especialmente a partir de 100 ppm de metal. Además, se observaron dos patrones: uno para el Zn y el Cd y otro para el Cu y la mezcla polimetálica. En el primero, el Zn (100 y 200 ppm) y Cd (200 ppm) produjeron un aumento de la biomasa, que en ningún caso superó los valores control. El segundo patrón se definió por un descenso a lo largo de todas las concentraciones de Cu y mezcla polimetálica, a excepción de la concentración 300 ppm, bajo la cual se produjo un aumento de la biomasa foliar. Teniendo en cuenta las diferentes biombras (radicular, cotiledones y foliar), a los 30 días, el efecto sobre la disminución de biomasa de la planta (**Figura 2**) se debe a una disminución del crecimiento de las hojas.

El análisis de la producción de biomasa en cada órgano de la planta indicó que la biomasa de la raíz se incrementó más a tiempos cortos (15 días) y que la biomasa foliar se incrementó más a tiempos largos (30 días). Por ello, la producción de biomasa en la raíz sería un indicador recomendable a determinar en bioensayos con *C. sativus* de 15 días de exposición, mientras que para 30 días de exposición sería la producción de biomasa foliar el indicador más sensible.

4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL GEN *ASNI*

Los metales producen efectos genotóxicos y, en consecuencia, inducen cambios en la expresión génica. Por ello, la utilización de marcadores génicos en bioensayos es indispensable para analizar el potencial genotóxico del suelo y supone una gran ventaja ya que facilita la detección, cuantificación y diagnóstico precoz de los efectos de la exposición a los contaminantes (Liu *et al.*, 2009).

En un estudio anterior de expresión génica realizado con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* expuesta a un tratamiento polimetálico (Zn, Cd, Pb, Co, Ni, Cu, Hg y Mn) y a cada uno de los 8 metales del tratamiento por separado, se observó la sobreexpresión estable del gen *ASNI* (asparagina sintetasa 1) (Gómez-Sagasti *et al.*, 2016). Por tanto, la sobreexpresión del gen *ASNI* sería el resultado de la estimulación de los mecanismos de desintoxicación de amonio, que se acumula en los tejidos cuando las plantas se exponen a metales.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, los perfiles de expresión del gen *ASN1* en el sistema radicular (Objetivo 2) tendieron a la sobreexpresión tanto a 15 (Figura 6A) como a 30 días (Figura 6B). A los 15 días, las plantas de *C. sativus* crecidas en suelos contaminados con Cu, Zn y mezcla polimetálica tendieron a aumentar la expresión del *ASN1* (Figura 6A). Se registró un aumento significativo a 200 ppm de Zn y a 100 y 200 ppm de mezcla polimetálica (Figura 6A; Tabla AII.1.). No se observó un efecto sinérgico de los metales en la expresión del gen, llegando a un nivel de expresión máximo de 2,5 órdenes de expresión para 200 ppm de Zn. Las plantas expuestas durante 15 días a Cd, por el contrario, no mostraron cambios significativos en la expresión del gen. En un estudio anterior con plantas de pepino expuestas a una disolución de 100 ppm de Cd (Hipólito, 2015), este metal produjo una gran sobreexpresión (x 6,2 órdenes de cambio respecto al control) en la radícula. En este trabajo, el bajo efecto del Cd a los 15 días está estrechamente relacionada con la baja biodisponibilidad de los metales en el suelo de estudio.

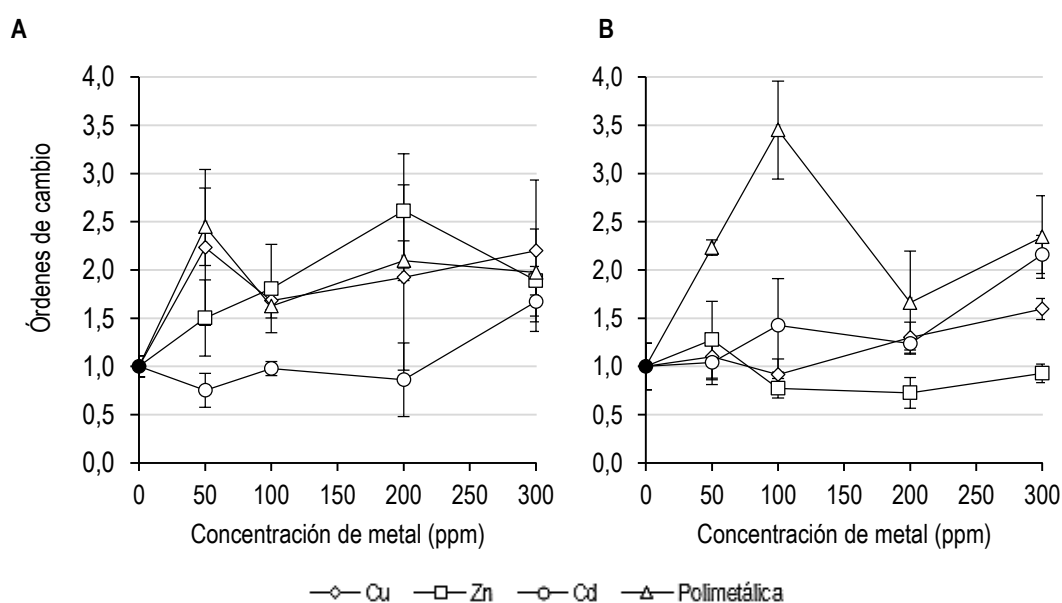


Figura 6. Análisis de los órdenes de cambio en la expresión del *ASN1* en raíz de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo), mezcla polimetálica (triángulo).

En cambio, a los 30 días, fue el Zn el metal que menos respuesta generó en términos de órdenes de expresión del *ASN1* (independientemente de la concentración), menor

incluso que la obtenida a los 15 días (**Figura 6B**). Las plantas de *C. sativus* expuestas a Cu y Cd mostraron una tendencia a la sobreexpresión con el aumento de la concentración, aunque ese aumento tan solo fue significativo a 300 ppm para ambos metales (**Figura 6B; Tabla AII.2.**). En cuanto al tratamiento polimetálico, este fue el que más cambios produjo en el patrón de expresión del *ASNI*, destacando significativamente los aumentos producidos en las plantas sometidas a 100 y 300 ppm (**Figura 6B; Tabla AII.2.**).

De nuevo, la variabilidad en los resultados de expresión se puede atribuir al tipo de suelo (**Tabla 1**) y, en concreto, a la concentración biodisponible de cada metal (**Tabla 4**), que es bastante inferior a la concentración total teórica. Esto confirma que la composición del suelo, las propiedades físicas de la materia orgánica y el pH determinan en gran medida la toxicidad de los metales (Galende *et al.*, 2014). Considerando los resultados de este estudio y, aunque se ha demostrado que la expresión del gen *ASNI* es un buen biomarcador de exposición a metales en disolución (Hipólito, 2015), será necesario realizar estudios a largo plazo y en suelos reales con distintas características y biodisponibilidad de metales para determinar la relevancia real de este biomarcador génico.

4.4. CONTENIDO EN α -TOCOFEROL

La exposición de las plantas a metales provoca estrés oxidativo en ellas que genera una respuesta antioxidante como mecanismo de defensa. Esta respuesta puede ser enzimática (glutación peroxidasa) o a través de metabolitos antioxidantes, bien lipofílicos (p.e., α -tocoferol) o hidrofílicos (p.e., ácido ascórbico y glutación). Artetxe *et al.* (2002) primero y Hasanuzzaman *et al.* (2014) después evidenciaron la acumulación de tocoferoles en plantas expuestas a metales, por lo que el contenido en tocoferoles podría ser un buen biomarcador bioquímico ante el estrés por metales.

A pesar de la desigual distribución de los isómeros de los tocoferoles (α - β - δ - γ) entre especies y en los distintos órganos de la planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2014), en este trabajo solo se ha determinado el contenido de tocoferoles en las radículas, en concreto, del α -tocoferol, por ser este el antioxidante lipofílico más abundante en raíz (Abbasi *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 7**.

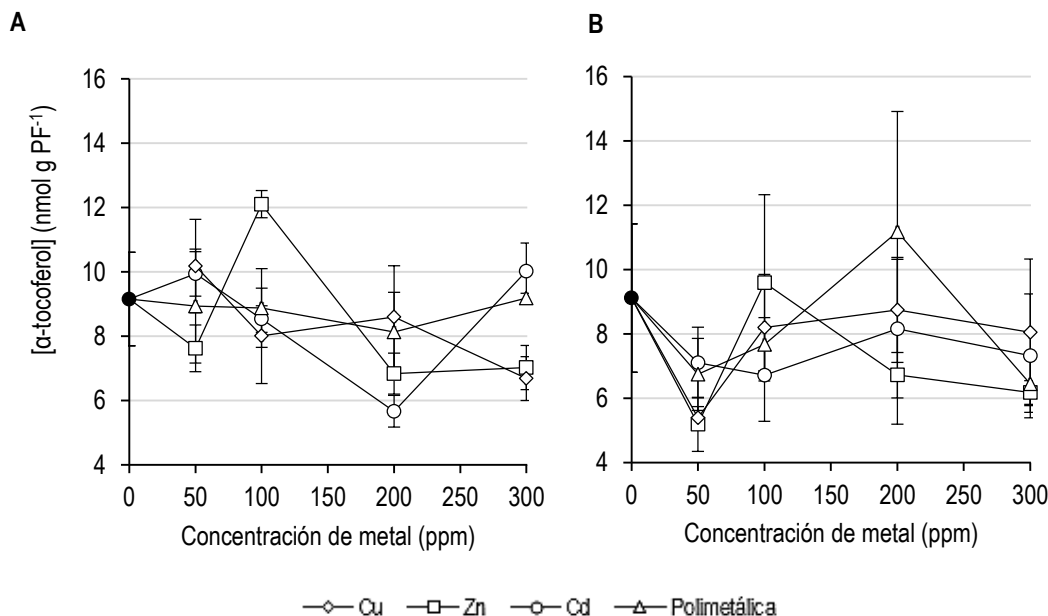


Figura 7. Contenido de α -tocoferol en las radículas de plantas de *Cucumis sativus* a los 15 (A) y 30 (B) días de exposición a Cu (rombo), Zn (cuadrado), Cd (círculo) y mezcla polimetálica (triángulo).

Tras la exposición a metales no se observó una respuesta coherente en función del metal, de su concentración y del tiempo de exposición. Cabría esperar un aumento en el contenido en α -tocoferol en el sistema radicular con el aumento de la concentración de cada metal presente en el suelo (Yusuf *et al.*, 2010) y con el tiempo (Sanità di Toppi *et al.*, 2012). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de este estudio, no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas para ningún metal/concentración (Figura 7; Tabla AII.1. y AII.2.). Esa falta de incremento en el contenido en α -tocoferol puede deberse a que los propios componentes del suelo (composición de aniones y pH) limitan la biodisponibilidad y, por tanto, la toxicidad de los metales como ya se ha comentado con otros biomarcadores.

En este estudio, el nivel de α -tocoferol se ha determinado en radícula, pero como se observa en la Figura 5, fueron las hojas el órgano más afectado. Es posible que el efecto sobre este biomarcador se manifieste mejor en tejido fotosintético, como ya indicó Artetxe *et al.* (2002) en las plantas de *Lemna* expuestas a Zn y Cd. Este estudio proseguirá analizando los biomarcadores de *ASNI* y α -tocoferol en tejidos foliares.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de este trabajo son las siguientes:

- Solo el tratamiento polimetálico a tiempos largos (30 días) tiene un efecto sobre el crecimiento de *C. sativus* y reduce su desarrollo fenológico.
- La determinación de biomasa radicular es un potencial biomarcador de estrés tras 15 días de exposición a metales, mientras que a los 30 días de exposición será recomendable la medida de biomasa de la parte aérea.
- Los tratamientos con Cu, Zn y mezcla polimetálica provocan la sobreexpresión del gen *ASNI* sin superar el valor máximo de 2,5 veces la expresión del control.
- La caracterización física (granulometría) y química (composición mineral y pH) del suelo de este estudio influye fuertemente sobre la biodisponibilidad de los metales y, por tanto, sobre el efecto tóxico de estos sobre la biomasa, la expresión del gen *ASNI* y el contenido en α -tocoferol. Por ello, para próximos estudios deberá considerarse aumentar la concentración y/o biodisponibilidad de metales en el suelo y realizar la determinación de biomarcadores, además de en el sistema radicular, en otros órganos de la planta (p.e. hojas) para observar los potenciales efectos tóxicos de los metales.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi, A.R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U., Voll, L.M. 2007. Specific Roles of α - and γ -Tocopherol in Abiotic Stress Responses of Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* 143: 1720-1738.

Artetxe, U., García-Plazaola, J.I., Hernández, A., Becerril, J. M. 2002. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 859-863.

Aydin, S.S., Gökçe, E., Büyük, I., Aras, S. 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat. Res.* 746: 49-55.

Barrutia, O., Epelde, L., García-Plazaola, J.I., Garbisu, C., Becerril, J.M. 2009. Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites: effect of fertilization. *Chemosphere*. 74: 259-264.

Chapman, E.E., Dave, G., Murimboh, J.D. 2013. A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils. *Environ. Pollut.* 179: 326-342.

Galende, M.A., Becerril, J.M., Gómez-Sagasti, M.T., Barrutia, O., Epelde, L., Garbisu, C., Hernández, A. 2014. Chemical Stabilization of Metal-Contaminated Mine Soil: Early Short-Term Soil-Amendment Interactions and Their Effects on Biological and Chemical Parameters. *Water Air Soil Pollut.* 225: 1863-1876.

García-Plazaola, J.I., Becerril, J.M. 1999. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.* 10: 307-313.

García-Plazaola, J.I., Becerril, J.M. 2000. Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees*. 14: 339-343.

Glosh, P., Thakur, I.S., Kaushik, A. 2017. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141: 259-270.

Gómez-Sagasti, M.T. 2014. Identificación y selección de biomarcadores de exposición temprana a metales en *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens* mediante técnicas de expresión génica. Tesis Doctoral. Dirigida por José María Becerril y Carlos Garbisu. Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea, Facultad de Ciencia y Tecnología.

Gómez-Sagasti, M.T., Barrutia, O., Ribas, G., Garbisu, C., Becerril, J.M. 2016. Early transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to polymetallic contamination: implications for the identification of potential biomarkers of metal exposure. *Metallomics*. 8: 518-531.

Hassan, S.H., Van Ginkel, S.W., Hussein, M.A., Abskharon, R., Oh, S.E. 2016. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environ. Int.*

92-93: 106-118.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. 2014. Role of Tocopherol (Vitamin E) in Plants: Abiotic Stress Tolerance and Beyond, en: Ahmad, P., Rasool, S., (Eds). Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Volumen 2: A Sustainable Approach, pp. 267-289.

Herrera-Rodríguez, M.B., Pérez-Vicente, R., Maldonado, J.M. 2007. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses. Plant Physiol. Biochem. 45: 33-38.

Hipólito, P. 2015. Estandarización de un bioensayo con *Cucumis sativus* para la determinación de la fitotoxicidad de metales en suelos y aguas. Trabajo Fin de Grado. Dirigido por José María Becerril y María Teresa Gómez. Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea, Facultad de Ciencia y Tecnología.

Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., Fujita, M. 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. J. Bot. 2012: 1-37.

Hutchins, C.M., Simon, D.F., Zerges, W., Wilkinson, K.J. 2010. Transcriptomic signatures in *Chlamydomonas reinhardtii* as Cd biomarkers in metal mixtures. Aquat. Toxicol. 100: 120-127.

Iqbal, M. 2016. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. Chemosphere. 144: 785-802.

Liu, W., Zhou, Q., Li, P., Gao, H., Han, Y.P., Li, X.J., Yang, Y.S., Li, Y. 2009. DNA mismatch repair related gene expression as potential biomarkers to assess cadmium exposure in Arabidopsis seedlings. J. Hazard. Mater. 167: 1007-1013.

Ley 4/2015, de 25 de junio, para la prevención y corrección de la contaminación del suelo de la Comunidad Autónoma del País Vasco.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods. 25: 402-408.

Migocka, M., Papierniak, A. 2011. Identification of suitable reference genes for

studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol. Breed.* 28: 343-357.

Orroño, D.I., Lavado, R.S. 2009. Heavy metal accumulation in *Pelargonium hortorum*: Effects on growth and development. *Phyton.* 78: 75-82.

Rizzo, L. 2011. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res.* 45: 4311-4340.

Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.

Sanità di Toppi, L., Vurro, E., De Benedictis, M., Falasca, G., Zanella, L., Musetti, R., Lenucci, M.S., Dalessandro, G., Altamura, M.M. 2012. A bifasic response to cadmium stress in carrot: Early acclimatory mechanisms give way to root collapse further to prolonged metal exposure. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 269-279.

Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, A., Garcés-Jaraba, L. 2015. Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno. Lógicas.* 18: 109-123.

Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G. 2014. *Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe.* Publications Office of the European Union.

Yadav, S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S. Afr. J. Bot.* 76: 167-179.

Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, N.B. 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797: 1428-1438.

Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.C., Berthomieu, P. 2010. Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *J. Plant Physiol.* 167: 1239-1247.

ANEXO I

Galería de imágenes: bioensayos con *Cucumis sativus*

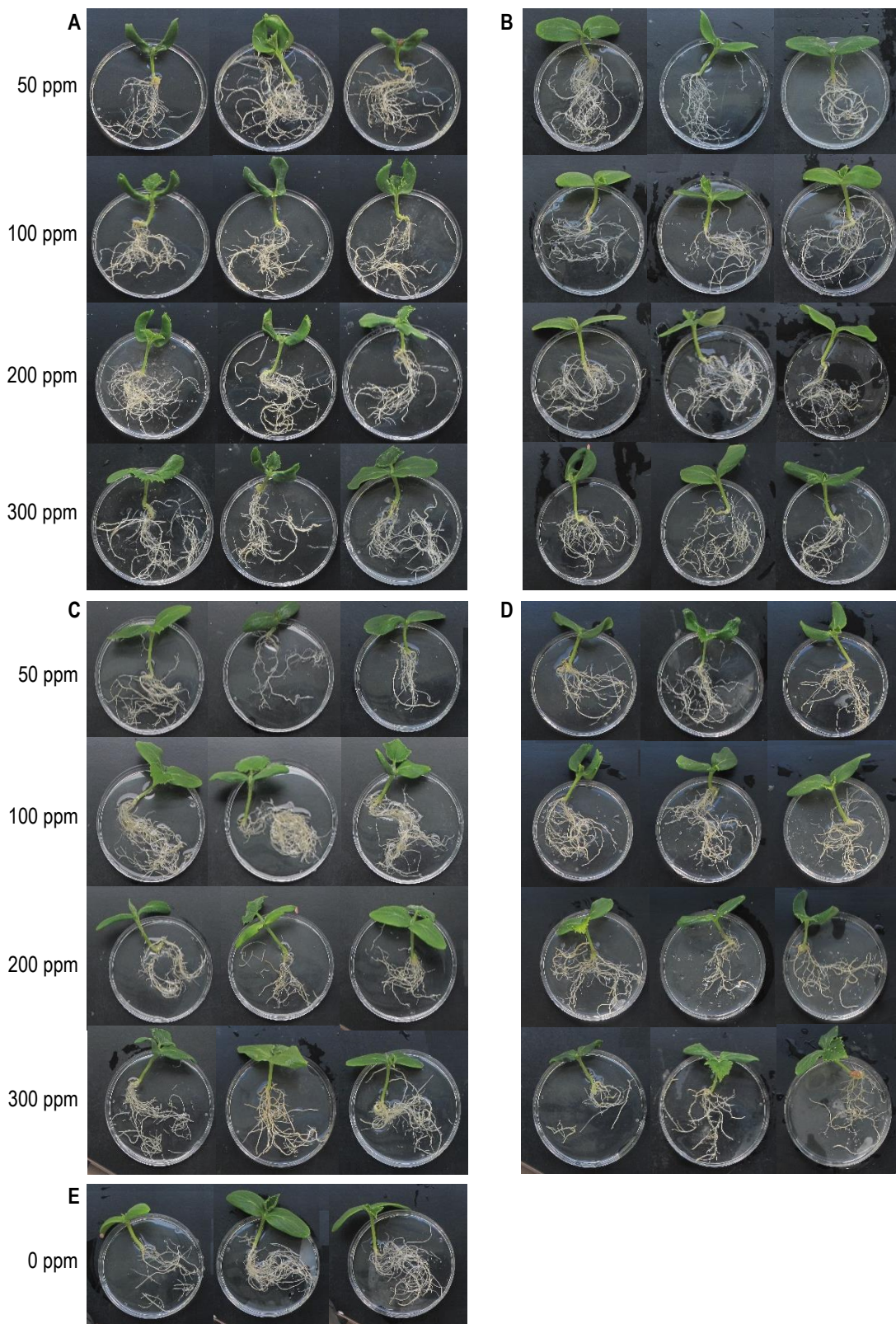


Figura I.1. Bioensayo a medio plazo con plántulas de *C. sativus* con suelos contaminados con metales a distintas concentraciones. Las letras A, B, C y D representan los metales Cu, Zn, Cd, mezcla polimetálica y control, respectivamente.

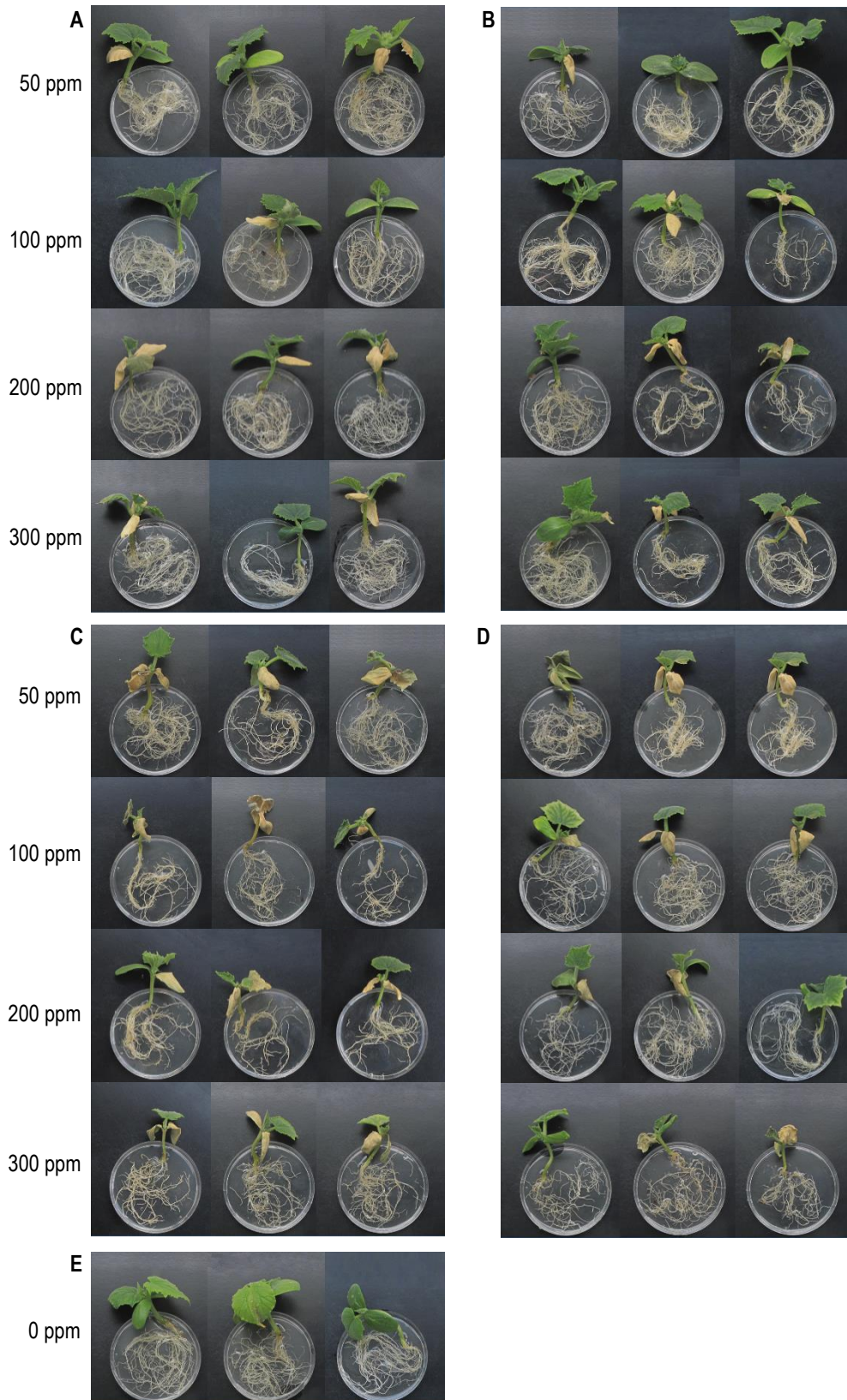


Figura I.2. Bioensayo a largo plazo con plántulas de *C. sativus* con suelos contaminados con metales a distintas concentraciones. Las letras A, B, C y D representan los metales Cu, Zn, Cd, mezcla polimetálica y control, respectivamente.

ANEXO II

Tratamiento estadístico

Tabla AII.1. Análisis estadístico para (i) biomasa total (mg PS); (ii) biomasa de raíz (mg PS); (iii) biomasa de cotiledones (mg PS); (iv) biomasa foliar (mg PS); (v) expresión del gen *ASN1* en raíz (órdenes de cambio); (vi) contenido en α -tocoferol (nmol g PF⁻¹) en raíz de plantas de *Cucumis sativus* expuestas a Cu, Zn, Cd y mezcla polimetálica durante 15 días.

| BIOMASA TOTAL | | | | | | |
|--------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|---------|
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | b | b | ab | b | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (1) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (1) |
| BIOMASA RAÍZ | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | ab | b | a | ab | ab | (1) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (1) |
| BIOMASA COTILEDONES | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | b | b | ab | b | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (2) |
| Cd | a | a | a | a | a | (1) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (2) |
| BIOMASA FOLIAR | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | - | - | - | - | - | - (n=2) |
| Zn | - | - | - | - | - | - (...) |
| Cd | - | - | - | - | - | - (...) |
| Polimetálica | - | - | - | - | - | - (...) |
| EXPRESIÓN GEN <i>ASN1</i> | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | b | ab | ab | a | ab | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (2) |
| Polimetálica | b | ab | a | a | ab | (2) |
| α-TOCOFEROL | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | b | a | (1) |
| Zn | b | b | a | b | b | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (1) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (1) |

(1) Normalidad ($P > 0,05$) & Homogeneidad ($P > 0,05$) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ($P > 0,05$) & Homogeneidad ($P < 0,05$) = ANOVA Games-Hawell test

(3) Normalidad ($P < 0,05$) = No paramétricos (Kruskal – Wallis)

Tabla AII.2. Análisis estadístico para (i) biomasa total (mg PS); (ii) biomasa de raíz (mg PS); (iii) biomasa de cotiledones (mg PS); (iv) biomasa foliar (mg PS); (v) expresión del gen *ASN1* en raíz (órdenes de cambio); (vi) contenido en α -tocoferol (nmol g PF⁻¹) en raíz de plantas de *Cucumis sativus* expuestas a Cu, Zn, Cd y mezcla polimetálica durante 30 días.

| BIOMASA TOTAL | | | | | | |
|--------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|------|
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (2) |
| Polimetálica | a | a | ab | ab | b | (1) |
| BIOMASA RAÍZ | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (3) |
| Polimetálica | ab | a | b | ab | ab | (1) |
| BIOMASA COTILEDONES | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | ab | a | b | ab | ab | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (1) |
| Polimetálica | ab | a | ab | a | b | (1) |
| BIOMASA FOLIAR | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (2) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (2) |
| EXPRESIÓN GEN <i>ASN1</i> | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | b | ab | b | ab | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (3) |
| Cd | b | ab | ab | ab | a | (2) |
| Polimetálica | c | abc | a | bc | ab | (1) |
| α-TOCOFEROL | | | | | | |
| (ppm) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | Test |
| Cu | a | a | a | a | a | (1) |
| Zn | a | a | a | a | a | (1) |
| Cd | a | a | a | a | a | (1) |
| Polimetálica | a | a | a | a | a | (1) |

(1) Normalidad ($P > 0,05$) & Homogeneidad ($P > 0,05$) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ($P > 0,05$) & Homogeneidad ($P < 0,05$) = ANOVA Games-Hawell test

(3) Normalidad ($P < 0,05$) = No paramétricos (Kruskal – Wallis)