

## ***Rumex acetosa* L.: ¿Es esta pseudometalofita una “caja del tesoro” para la fitorremediación de suelos contaminados con Zn, Cd y Pb?**

### ***Rumex acetosa* L.: Is this pseudometallophyte a “treasure box” for phytoremediation of soils contaminated with Zn, Cd and Pb?**

**Gómez-Sagasti, María T.<sup>1\*</sup>; Barrutia, Oihana<sup>1</sup>; Hernández, Antonio<sup>1</sup>; Garbisu, Carlos<sup>2</sup>; García-Plazaola, J.I.<sup>1</sup>; Fernández-Pascual, Mercedes<sup>3</sup>; Becerril, J.M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), E-48080 Bilbao. España.  
\*e-mail: mariateresa.gomez@ehu.eus

<sup>2</sup> Departamento de Conservación de Recursos Naturales, NEIKER-Tecnalia, C/Berreaga 1, E-48160 Derio. España.

<sup>3</sup> Departamento Suelo, Planta y Calidad Ambiental, Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC, C/Serrano 115b, E-28006 Madrid. España.

#### **Resumen**

Las plantas “pseudometalofitas” son aquellas que, caracterizadas por un amplio rango de tolerancia a metales, son capaces de establecerse tanto en suelos contaminados con diferentes metales y concentraciones como en las áreas no contaminadas. Las adaptaciones ecofisiológicas a ciertos metales sufridas por estas plantas pseudometalofitas les confieren ventajas evolutivas, además de una mayor capacidad de fitoextracción e (hiper)acumulación de metales. *Rumex acetosa* L., comúnmente conocida como “acedera”, podría ser buen ejemplo de ello. En este trabajo se estudiaron dos ecotipos de *R. acetosa*; una tolerante originaria de una mina abandonada de Zn y Pb (ecotipo LAN) y la otra sensible a esos metales (ecotipo LAR). Los dos objetivos fundamentales de este estudio fueron: (i) evaluar sus respectivas capacidades de **fitoextracción (absorber y acumular) Zn, Cd y Pb**, siendo esta una de las fitotecnologías de bajo coste y alta efectividad más utilizadas para la **recuperación de suelos contaminados con metales**; y, (ii) identificar los **mecanismos ecofisiológicos clave** en la tolerancia a metales que podrían ser utilizados para la mejora de esta especie, u otras de interés agronómico, y así garantizar una efectiva recuperación de los suelos contaminados. La presión selectiva a la que se ha visto sometido el ecotipo de *R. acetosa* recolectado de la mina de Zn/Pb, ha hecho que estas plantas fueran especialmente tolerantes (sin apenas síntomas de fitotoxicidad a nivel bioquímico –cambios de los perfiles de pigmentos y antioxidantes–, a nivel ultraestructural –estado y organización de los cloroplastos–, ni en la producción de biomasa) a la vez que eficientes en la fitoextracción de Zn y Cd. Antocianinas y tocoferoles, dos metabolitos secundarios con función antioxidante, demostraron ser biomarcadores del estrés por metales en el ecotipo sensible por lo que resultarán muy útiles en la monitorización de la salud de suelos/plantas. En cuanto a la fitoextracción, los peciolos fueron los órganos con mayor acumulación de metales, pudiendo ser interesante no sólo para mejorar la especie en términos de fitoextracción si no también a la hora de diseñar la cosecha del material vegetal.

**Palabras clave:** acedera, metales, fitoextracción, antioxidantes, peciolos

#### **Abstract**

“Pseudometallophyte” plants are those that, characterized by a wide range of tolerance to metals, are able to grow and survive in soils contaminated with different metals and concentrations and also in non-contaminated areas. The ecophysiological adaptations to certain metals suffered by these pseudometallophyte plants confer them evolutionary advantages, besides a greater capacity of metal phytoextraction and (hyper)accumulation. *Rumex acetosa* L., commonly known as “sorrel”, would be a proper example of it. In this work two ecotypes of *R. acetosa* were studied; one of them was a tolerant ecotype native from an abandoned mine of Zn and Pb (LAN ecotype) and the other was metal susceptible (LAR ecotype). The two main objectives of this study were: (i) evaluate their respective capacities of **phytoextraction (absorb and accumulate) Zn, Cd and Pb**, being phytoextraction one of the most used phytotechnology for recovery metal contaminated soils; and, (ii) identify the **key ecophysiological mechanisms behind metal tolerance** that could be useful for the improvement of this species, or others with agronomic interest, and thus guarantee an effective recovery of contaminated soils. The selective pressure to whom LAN ecotype of *R. acetosa* has been subjected, made these plants especially tolerant (with scarcely signs of phytotoxicity neither at biochemical level –changes in the profiles of pigments and antioxidants–, ultrastructural level –status and organization of chloroplast– nor in the biomass production) and simultaneously efficient in the phytoextraction of Zn and Cd. Anthocyanins and tocopherols, a secondary metabolites with antioxidant function, emerged as biomarkers of metal stress in the susceptible ecotype and, consequently, they could be useful in the monitorization of soil/plant health. Regarding phytoextraction, the petioles were the largest metal accumulation, which could be interesting not only to improve the species in terms of phytoextraction, but also in the design of plant harvest.

**Keywords:** sorrel, metals, phytoextraction, antioxidants, petioles

## Introducción

El alcance global de los problemas medioambientales y sociales derivados de la contaminación del suelo por metales, ha hecho que su recuperación sea una prioridad en política ambiental. En este sentido, y considerando el actual escenario socio-económico, tecnologías de bajo coste y de conservación de recursos como la fitoextracción están siendo empleadas para recuperar un creciente número de suelos contaminados con metales [1].

La fitoextracción se basa en el uso de plantas hipertolerantes capaces de absorber, transportar y acumular metales en su biomasa aérea. En concreto, las plantas "pseudometalofitas", con ecotipos capaces de colonizar un amplio rango de condiciones edáficas, suponen una "caja de tesoro" ya que presentan un gran potencial para la restauración de suelos contaminados. *Rumex acetosa* L. (Polygonaceae, n. com. acedera) cumple con varios requisitos clave para la revegetación y fitoextracción de metales, como tener una gran amplitud ecológica y una producción moderada de biomasa. Barrutia y cols. [2,3] confirmó la tolerancia a Zn, Cd y Pb de un ecotipo de *R. acetosa* (LAN) originaria de una mina abandonada de Zn/Pb y la sensibilidad del ecotipo de *R. acetosa* (LAR) procedente de un entorno rural no contaminado. Sin embargo, los mecanismos específicos que hacen posible esa tolerancia a cada uno de los metales están aún por esclarecer.

Así pues, el objetivo principal del trabajo aquí presentado es identificar y evaluar el impacto de los metales (Zn, Cd y Pb) en dos ecotipos de *R. acetosa* (LAR y LAN). Entre los objetivos específicos están evaluar (i) la fitotoxicidad, distribución y compartimentalización de los metales en los diferentes órganos o tejidos de la planta; (ii) el papel del sistema fotoprotector y antioxidante en la tolerancia o como bioindicadores de estrés en respuesta a los metales; y, por último; (iii) el potencial de los ecotipos LAR y LAN de *R. acetosa* en la fitoextracción de Zn, Cd o Pb y en la revegetación de suelos contaminados.

## Material y métodos

### *Diseño experimental*

Los explantes clonales del ecotipo tolerante de *Rumex acetosa* L. (ecotipo LAN) originaria de una mina de Zn/Pb (3°13"N; 3°26"W), y del ecotipo sensible (ecotipo LAR), se colocaron en recipientes de 15 L con solución Hoagland bajo condiciones controladas [2]. Tras el periodo de aclimatación, la solución nutritiva fue reemplazada por una "solución de tratamiento" formulada con la solución Hoagland diluida suplementada con Zn (500 µM) o Cd (50 µM) o Pb (500 µM) en forma de sales de nitrato o sin metales (tratamiento control). La solución de crecimiento se cambió cada 6 días. A los 18 días de exposición se procedió a la cosecha. Para ello, las raíces se limpiaron con una solución de CaCl<sub>2</sub> para desorber los metales. Se determinó el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de la raíz, hojas y peciolo, tanto jóvenes como maduros [2].

Se tomaron muestras de hojas y/o raíces para determinar los siguientes parámetros: (i) metales en planta [2,3]; (ii) pigmentos fotosintéticos [clorofilas a+b – *Chl*–, carotenoides –*Carot.*–] [4] y antioxidantes lipofílicos [tocoferoles – *Tocof.*–] [4] e hidrofílicos [antocianinas – *Antoc.*–] [5]; (iii) microscopía óptica, electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) [6] de las secciones medias de hojas jóvenes y raíces; y, por último; (iv) microanálisis semi-cuantitativo basado en energía dispersiva de rayos X (EDS) [7].

## Resultados y discusión

### *Acumulación de metales en planta*

El ecotipo LAN fue capaz de acumular más Zn y Cd que el ecotipo LAR, tanto en la parte aérea como en la raíz (Tabla 1A y B). Esta capacidad para acumular Zn se debió en parte a su alta movilidad y a ser el metal más abundante en la mina de donde procede el ecotipo LAN. En el caso del Pb, fue el ecotipo LAR el que más metal acumuló por su gran inmovilización en la raíz (Tabla 1A y B).

**Tabla 1** – Concentración de metales (mg metal kg<sup>-1</sup> PS órgano) en la parte aérea (A), raíz (B); hojas jóvenes y hojas maduras (C); peciolo joven y peciolo maduro (D) de los ecotipos LAR (fondo blanco) y LAN (fondo gris) a los 18 días de tratamientos metálicos.

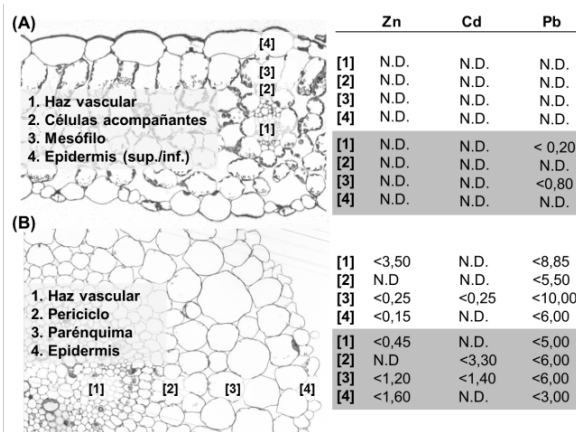
	Zn	Cd	Pb
<b>A) Parte aérea</b>			
	1036,4	383,4	3490,9
	1415,5	379,5	2180,3
<b>B) Raíz</b>			
	4088,8	2586,1	89818,4
	8583,6	3387,1	46263,6
<b>C) Hoja joven / Hoja madura</b>			
	803,5 / 706,7	108,2 / 4,9	281 / 164,6
	3098,6 / 543,1	96,9 / 241,6	787,0 / 328,3
<b>D) Peciolo joven / Peciolo maduro</b>			
	1458,7 / 1581,6	781,4 / 457,5	4123,6 / 6007,8
	2632,7 / 2444,9	862,7 / 853,7	3616,0 / 5234,6

Ambos ecotipos, a pesar de registrar un alto factor de bioacumulación ( $[\text{metal}]_{p.a\acute{e}rea}/[\text{medio}]$ ) para el Cd y Pb, mostraron un bajo factor de translocación ( $[\text{metal}]_{p.a\acute{e}rea}/[\text{metal}]_{ra\acute{z}}$ ), característica que los desmarca como potenciales hiperacumuladoras. Las hojas jóvenes fueron las que más Zn>Pb>Cd acumularon (Tabla 1C). Los peciolo fueron los órganos con mayor acumulación de metales (Tabla 1D). Otros estudios [8] han indicado que los metales pueden reaccionar con los componentes y paredes de los tejidos conductores de la planta. Nuestro estudio de microlocalización (Figura 1), indicó que el Zn y el Cd se acumularon principalmente en las paredes celulares del periciclo, parénquima y en la epidermis de las raíces del ecotipo LAN, lo que sugirió que estaban siendo transportados apoplásticamente. Además, también se observó una gran unión extracelular del Pb (Figura 1), lo que reforzó el papel de la pared celular como barrera a la entrada masiva de iones metálicos.

### Fitotoxicidad de los metales

El ecotipo LAN de *R. acetosa* mantuvo la producción de biomasa y el contenido en clorofilas (Chl) en presencia de cada uno de los metales y a niveles similares a los de las plantas control (Tabla 2). Mientras, en las plantas LAR, la presencia de Zn aumentó el contenido en Chl (Tabla 2). Teniendo en cuenta la reducción del PS tanto de la parte aérea como de la raíz de las plantas LAR tratadas con Zn, se concluyó que el aumento de Chl era un

indicador de fitotoxicidad. El cociente carotenoides/Chl fue constante y no se vio afectado en ninguno de los ecotipos, situándose entorno a 0,3 bajo todos los tratamientos.



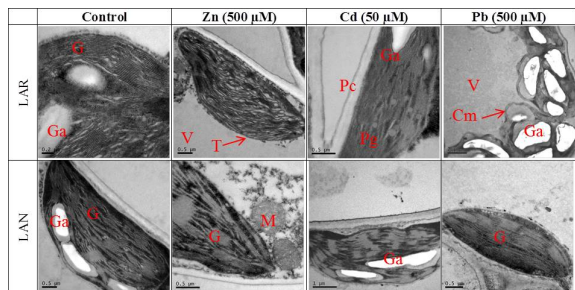
**Figura 1** – Microlocalización del Zn, Cd y Pb de los ecotipos LAR (fondo blanco) y LAN (fondo gris) a los 18 días de tratamientos metálicos. Datos en % de señal del metal respecto a la señal total. N.D.: No detectado.

**Tabla 2** – Peso seco (PS; g) y pigmentos y antioxidantes ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) de los ecotipos LAR (fondo blanco) y LAN (fondo gris) a los 18 días de exposición a Zn, Cd y Pb.

Control	Zn	Cd	Pb
<b>PS Parte aérea</b>			
5,3	1,8	2,7	2,6
3,3	3,1	1,9	2,4
<b>PS Raíz</b>			
1,6	0,4	0,7	0,7
1,5	1,4	1,0	1,4
<b>Chl en Hoja joven / Hoja madura</b>			
271,2 / 380,3	387,8 / 349,2	164,1 / 196,4	224,4 / 226,8
297,9 / 391,9	200,6 / 290,9	286,8 / 353,6	197,8 / 218,1
<b>Carot. en Hoja joven / Hoja madura</b>			
85,5 / 112,5	129,5 / 121,1	56,74 / 82,11	75,0 / 81,25
92,2 / 116,3	67,7 / 98,7	96,9 / 110,6	71,4 / 73,8
<b>Antoc. en Hoja joven / Hoja madura</b>			
0,0 / 23,3	440,6 / 762,0	53,3 / 993,9	181,1 / 638,8
2,4 / 5,7	36,3 / 652,8	13,0 / 8,4	18,0 / 522,9
<b>Tocof. en Hoja joven / Hoja madura</b>			
9,8 / 19,4	63,0 / 79,6	24,7 / 72,8	31,1 / 66,4
8,0 / 17,3	12,4 / 52,6	17,0 / 33,5	24,5 / 57,2

La baja fitotoxicidad indicada en los parámetros anteriores se vio confirmada por la baja afección de la ultraestructura celular de las hojas de las plantas LAN (Figura 2). Sin embargo, en las plantas LAR aparecieron claros síntomas de

fitotoxicidad a nivel de ultraestructura del cloroplasto (i.e. desorganización de los tilacoides, aparición de granulos de almidón, presencia de plastoglóbulos) con los tres metales estudiados (Figura 2).



**Figura 2.** Micrografías electrónicas de cloroplastos de hojas jóvenes de los ecotipos LAR y LAN de *Rumex acetosa* tras 18 días de tratamientos control, Zn, Cd y Pb. Cm: membrana del cloroplasto; Pc: pared celular; G: grana; M: mitocondria; Pg: plastoglóbulo; Ga: gránulos de almidón; T: tonoplasto; V: vacuola.

La concentración de antioxidantes lipofílicos tocoferoles/Chl más alta se obtuvo en las hojas jóvenes de las plantas LAN control (1:37) >Cd (1:17) >Zn (1:16), seguidas de las hojas jóvenes LAR (control>Cd>Zn) (Tabla 2). Esto fue indicativo de la capacidad antioxidante y fotoprotectora del ecotipo LAN ante el estrés oxidativo generado por estos dos metales. Las plantas LAR aumentaron notablemente el contenido en antocianinas, más aún que las plantas LAN y los respectivos controles (Tabla 2). No obstante, la inducción general de antocianinas (en vacuola) [9] y tocoferoles (en membrana) [10] en las plantas sensibles, convierte a estos dos metabolitos secundarios en biomarcadores de exposición a metales muy útiles.

## Conclusiones

El ecotipo LAN de *R. acetosa* es una herramienta biotecnológica valiosa (i.e. una “caja del tesoro”) para la fitorecuperación de suelos contaminados con Zn y Cd dada su tolerancia y capacidad fitoextractora. Además, su toxicidad para los herbívoros limita la entrada de metales en la cadena trófica. La mejora de la especie y/o la optimización de los programas de fitorecuperación de los suelos se podría conseguir potenciando dos aspectos complementarios: (i) la fitoestabilización de los iones metálicos en

las paredes celulares de las raíces y/o (ii) la fitoextracción de metales potenciando el desarrollo de los peciolo o favoreciendo cultivares con peciolo más desarrollados.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos: AGL2015-64481-C2-1 y AGL2013-40758-R2 (MINECO), PhytoSUDOE SOE1/P5/E0189; Fondos FEDER; e IT 1018-16 (Gobierno Vasco). M.T.G.S. agradece al Vicerrectorado de Investigación de la UPV/EHU por las ayudas de especialización postdoctoral y de movilidad de investigadores.

## Referencias bibliográficas

- [1] Koelmel, J., Prasad, M.N.V., Pershell, K. 2015. Bibliometric analysis of phytotechnologies for remediation: global scenario of research and applications. *Int. J. Phytoremediation* 17: 145-153.
- [2] Barrutia, O., Epelde, L., García-Plazaola, J.I., y cols. 2009. Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites: Effect of fertilization. *Chemosphere* 74: 259-264.
- [3] Barrutia, O., Garbisu, C., Hernández-Allica, J., y cols. 2010. Differences in EDTA-assisted metal phytoextraction between metallicolous and non-metallicolous accessions of *Rumex acetosa* L. *Environ. Pollut.* 158: 1710-1715.
- [4] García-Plazaola, J. y Becerril, J.M. 2001. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Australian J. Plant Physiol.* 28: 225-232.
- [5] Gould, K.S., Markhams, K.R., Smith, R.H., y cols. 2000. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata*. *A. Cunn. J. Exp. Bot.* 51: 1107-1115.
- [6] de María, N., de Felipe, M.R., Fernández-Pascual, M., 2005. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 985-996.
- [7] Jorge, A., Polidori, C., Garcia-Guinea, J., y cols. 2017. Spectral cathodoluminescence analysis of hymenopteran mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth. *Arthropod Struct Dev.* 46: 39-48.
- [8] Qiu, R.-L., Thangavel, P., Hu, P.-J., y cols. 2011. Interaction of cadmium and zinc on accumulation and sub-cellular distribution in leaves of hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *J. Hazard. Mater.* 186: 1425-1430.
- [9] Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, y cols. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 113: 859-871.
- [10] Hernández, I., Alegre, L., Breusegem, F.V., y cols. (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends Plant. Sci.* 14: 125-132.