



<http://opn.to/a/Oeit1>

ORIGINAL ARTICLE | ARTÍCULO ORIGINAL

## Plasma Membrane Alterations in *Phaseolus vulgaris* L. Variety CC-25-9-N Induced by Metals

### *Alteraciones en la membrana plasmática de Phaseolus vulgaris L. variedad CC-25-9-N inducida por metales*

#### *Alterações na membrana plasmática de Phaseolus vulgaris L. variedade CC-25-9-N induzida por metais*

Dr.C. Liane Portuondo Fariás<sup>I\*</sup>, Dr.C. Dariellys Martínez Balmori<sup>I</sup>, Dr.C. Fernando Guridi Izquierdo<sup>I</sup>,  
Dr.C. Alejandro Falcón Rodríguez<sup>II</sup>, Dr.C. Andrés Calderín García<sup>III</sup>, Dr.C João Paulo Machado Torres<sup>IV</sup>

<sup>I</sup>Universidad Agraria de La Habana, Departamento de Química, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>II</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>III</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratório de Solos, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>IV</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Radioisótopos, Rio de Janeiro, Brasil.

**ABSTRACT.** It is in the early stages of the vegetative phase, when the plant manifests its greatest susceptibility to sudden changes in environmental conditions and unleashes adaptive pathways that include changes in the structure of cell membranes, as they are the first to respond to damage. The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a crop of agricultural interest that can accumulate heavy metals and therefore, the possibility of developing mechanisms of tolerance to this type of stress. For these reasons, the work aimed to determine the existence of changes in the plasma membrane and in the antioxidant activity of leaves in bean plants germinated in presence of heavy metals. Seeds of the variety CC-25-9-N were germinated under controlled conditions with six specific concentrations of Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> cations. Fifteen days after seed's germination, the tolerance limit, the lethal dose and changes in the permeability of the leaf membranes were determined through electrical conductivity, pH and the activity of total peroxidases and guaiacol peroxidase. The variability in the membrane permeability was checked from differences in the values of the electrical conductivity and the pH in each of the treatments, which depended on the metal and the concentration under study, as well as on the activity of the enzymes analyzed. These results suggest a possible specificity in the plant – metal interaction that implicate different response mechanisms.

**Keywords:** beans, toxic metals, oxidative stress, toxicity, peroxidases.

**RESUMEN.** En las primeras etapas de la fase vegetativa es donde la planta manifiesta su mayor susceptibilidad a cambios bruscos en las condiciones del medio, desatándose vías adaptativas que incluyen cambios en la estructura de las membranas celulares, por ser las primeras que responden a un daño. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de interés agrícola que puede acumular metales pesados y, por consiguiente, desarrollar mecanismos de tolerancia a este tipo de estrés. Por estas razones el trabajo tuvo como objetivo determinar la existencia de cambios en la membrana plasmática y en la actividad antioxidante de hojas de plantas de frijol germinadas en presencia de metales pesados. Semillas de la variedad CC-25-9-N fueron germinadas en condiciones controladas en presencia de seis concentraciones específicas para los cationes Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>. A los 15 días después de la germinación se determinó el límite de tolerancia, la dosis letal media, cambios en la permeabilidad de las membranas de las hojas a través de medidas de conductividad eléctrica y pH, y la actividad de peroxidases totales y guaiacol peroxidasa. Fue comprobada la variabilidad en la permeabilidad de la membrana a partir de diferencias en los valores de la conductividad eléctrica y el pH en cada uno de los tratamientos, que dependieron del metal y la concentración en estudio, así como también en la actividad de las enzimas analizadas. Los resultados sugieren una posible especificidad en la interacción planta-metal, lo que implica mecanismos de respuestas diferentes.

**Palabras clave:** frijol, metales tóxicos, estrés oxidativo, toxicidad, peroxidases.

\*Author for correspondence: Liane Portuondo Fariás, e-mail: liane@unah.edu.cu

Received: 10/15/2019.

Approved: 13/03/2020.

**RESUMO.** No início da fase vegetativa é quando a planta manifesta sua maior suscetibilidade às mudanças no meio, desenvolvendo vias adaptativas que incluem câmbios na estrutura das membranas celulares por serem as primeiras na resposta ao dano. O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de interesse agrícola que pode acumular metais pesados e, conseqüentemente, desenvolver mecanismos de tolerância nesse tipo de estresse. Com o presente trabalho objetivou-se determinar a existência de alterações na membrana plasmática e na atividade antioxidante das folhas de feijoeiro, germinadas na presença de metais pesados. Sementes da variedade CC-25-9-N foram germinadas sob condições controladas, na presença de seis concentrações específicas para os cátions  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . Aos 15 dias após a germinação determinou-se o limite de tolerância, a dose letal média, assim como alterações na permeabilidade das membranas foliares através de medidas da condutividade elétrica e pH, atividade enzimática de peroxidases totais e guaiacol peroxidase. A variabilidade na permeabilidade da membrana foi verificada a partir de diferenças nos valores de condutividade elétrica e pH em cada um dos tratamentos, os quais dependeram do metal e da concentração em estudo, bem como da atividade das enzimas analisadas. Os resultados sugerem especificidade na interação planta - metal, o que implica mecanismos diferentes de resposta ante o estresse.

**Palavras chave:** feijão, metais tóxicos, estresse oxidativo, toxicidade, peroxidases.

## INTRODUCTION

Stress conditions are one of the main factors that influence the normal growth and development of plants. Various pollution processes that include anthropogenic action or factors of the natural environment such as changes in salinity, extreme temperatures, drought or high intensity of light can unleash them. Plants respond to these mismatches through natural defense systems that allow them to counteract external conditions, as well as the incidence of biotic and abiotic factors (Shivaraj *et al.*, 2018).

Soil contamination by metals is one of the most serious environmental problems caused by man. Some metals such as copper (Cu), zinc (Zn), nickel (Ni) and manganese (Mn) are essential micronutrients for plants, while others such as cadmium (Cd) and lead (Pb) do not have a known function. The excess of these metals implies damage to the plant and an additional danger if they accumulate and integrate into the food chain. Minimizing the entry of these pollutants into the food chain is an imperative task for sustainable development (Pirzadah *et al.*, 2015).

Although plants control the absorption or rejection of some chemical elements by specific physiological reactions, they are passive receptors of trace elements absorbed by the roots or those that arrive by precipitation. The studies carried out on this topic show results that involve adaptation mechanisms such as: (i) joining metals to the cell wall of the roots and (ii) activation of a reduced transport through the inner membrane of the cells. Others are (iii) active entry or exit into the cellular interior; (iv) compartmentalization within the vacuoles and (v) chelation through the union of the metal with organic, inorganic complexes and specific proteins such as phytochelatin or metallothioneins (Hasan *et al.*, 2017).

Several plant species have been reported with possibilities for the accumulation of toxic metals in their tissues, including some of agricultural interest like beans. This crop shows an accumulation of toxic cations mainly in the roots, not detected in the agricultural fruit (Portuondo, 2011). It is known that plants in the early stages of the vegetative phase, show greater sensitivity to changes in homeostasis, or have the greatest expression of the possible adaptive mechanisms. Therefore, the objective of this work was to determine the existence of changes in the plasma membrane and in the antioxidant activity in the

## INTRODUCCIÓN

Las condiciones de estrés son uno de los principales factores que influyen en el normal crecimiento y desarrollo de las plantas. Pueden desatarse por diversos procesos de contaminación que incluyen la acción antropogénica o factores del medio natural como salinidad, temperaturas extremas, sequía o alta intensidad de la luz. Las plantas han desarrollado diferentes sistemas de defensa que les permiten adaptarse a las condiciones externas, así como a la incidencia de factores bióticos y abióticos (Shivaraj *et al.*, 2018).

La contaminación del suelo por metales es uno de los problemas ambientales más serios causado por el hombre. Algunos metales como el cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y manganeso (Mn) son micronutrientes esenciales para las plantas, mientras que otros como el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) no poseen una función conocida. El exceso de estos metales implica un daño a la planta y un peligro adicional si se acumulan e integran a la cadena trófica. Minimizar la entrada de estos contaminantes a la cadena alimentaria es una tarea imperativa para el desarrollo sostenible (Pirzadah *et al.*, 2015).

Aunque las plantas controlan la absorción o el rechazo de algunos elementos químicos mediante reacciones fisiológicas específicas, son receptoras pasivas de los oligoelementos absorbidos por las raíces o de aquellos que llegan por las precipitaciones. Los estudios realizados en este tema, muestran resultados que implican mecanismos de adaptación como son: (i) unión de metales a la pared celular de las raíces; (ii) activación de un transporte reducido a través de la membrana interna de las células; (iii) entrada o salida activa al interior celular; (iv) compartimentación dentro de las vacuolas y; (v) quelación a través de la unión del metal con complejos orgánicos, inorgánicos y con proteínas específicas como las fitoquelatinas o metalotioneinas (Hasan *et al.*, 2017).

Varias son las especies vegetales que se reportan en la literatura con posibilidades para la acumulación de metales tóxicos en sus tejidos, inclusive algunas de interés agrícola como el frijol. Este cultivo muestra una acumulación de cationes tóxicos fundamentalmente en las raíces, no detectados en el fruto agrícola (Portuondo, 2011). Como las plantas en las primeras etapas de la fase vegetativa muestran mayor sensibilidad a cambios en la homeostasis, o presentan la mayor expresión de posibles mecanismos adaptativos, se planteó como objetivo de este trabajo determinar la existencia de cambios en la membrana plasmática y en la actividad

leaves from germinated bean plants, in presence of heavy metal cations Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>.

## METHODS

### Materials and Experimental Conditions

The experiments were carried out in the vegetative phase of *Phaseolus vulgaris* L. plants, under laboratory conditions, in the Chemistry Department at the Agricultural University of Havana. The plants were obtained from seeds of the CC-25-9-N variety, certified by the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), of which no report was found on their ability to accumulate metals.

### Establishment of Tolerance Limit to Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> cations

Twenty seeds were germinated in plastic trays of 9 × 13 cm with the corresponding solutions of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (high quality, Sigma-Aldrich) at six different concentrations shown in Table 1 and taking into account permissible values previously reported (Kabata, 2001). A control treatment (water) was also used for 19 treatments, with five replicas each.

TABLE 1. Concentrations of the Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> metal solutions  
TABLA 1. Concentraciones de las disoluciones de los metales Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>

	ppm					
Pb <sup>2+</sup>	10	25	50	75	100	125
Ni <sup>2+</sup>	1	5	10	15	20	25
Cu <sup>2+</sup>	5	10	20	30	40	50

Fifteen days after seed germination (DAG), the mean lethal dose (MLD) and phytotoxicity index (PI) evaluations were performed. The MLD was considered as the one that destroyed 50 % of the individuals in the population and the PI as that corresponding to the number of affected plants (Rivera *et al.*, 2005).

### Evaluation of Changes in Membrane Permeability

It was performed through measurements of pH and electrical conductivity. Ten discs of 0.5 cm in diameter were taken in triplicate from the true leaves of five plants of each treatment, which were introduced into containers with 30 mL of deionized water. The system was kept under constant stirring (magnetic stirrer) for 30 min, after this time reading of both variables were made every 5 min at a constant temperature of 25°C (Schulze *et al.*, 2005). The pH of the solution was measured in a pH meter (Model PHSJ-3F, 0.01pH ± 1bit) and the electrical conductivity in a conductometer (Model DDSJ-308, ± 0.5% (FS) ± 1digit).

### Influence of Metal Cations on Antioxidant Systems

Bean seeds to germinate were placed in plastic trays as it was described above, with two concentrations of the

antioxidante de hojas de plantas de frijol germinadas en presencia de los cationes de metales pesados Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>.

## MÉTODOS

### Materiales y Condiciones Experimentales

Los experimentos se desarrollaron en la fase vegetativa bajo condiciones de laboratorio, en el Departamento de Química de la Universidad Agraria de La Habana. Se trabajó con plantas de *Phaseolus vulgaris* L. obtenidas a partir de semillas de la variedad CC-25-9-N, certificadas por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), de la cual no se encontró reporte sobre su capacidad para acumular metales.

### Establecimiento del Límite de Tolerancia a los cationes Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>

Se colocaron 20 semillas para germinar en bandejas plásticas de 9 × 13 cm con las correspondientes disoluciones de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (de calidad QP, Sigma-Aldrich) a seis concentraciones diferentes mostradas en la Tabla 1 y teniendo en cuenta valores permisibles previamente informados (Kabata, 2001). Fue empleado además un tratamiento control (agua) para un total de 19 tratamientos, con cinco réplicas cada uno.

A los 15 días después de la germinación (DDG) de las semillas, se realizaron las evaluaciones de dosis letal media (DLM) e índice de fitotoxicidad (IF). Se consideró como DLM aquella que destruyó al 50 % de los individuos de la población y al IF como aquel correspondiente al número de plantas afectadas (Rivera *et al.*, 2005).

### Evaluación de cambios en la permeabilidad de las membranas

Fue realizado a través de mediciones del pH y la conductividad eléctrica. Se tomaron por triplicado 10 discos de 0,5 cm de diámetro de las hojas verdaderas de cinco plantas de cada tratamiento, que fueron introducidos en recipientes que contenían 30 mL de agua desionizada. El sistema se mantuvo en constante agitación (agitador magnético) durante 30 min, pasado este tiempo lecturas de ambas variables se realizaron cada 5 min a una temperatura constante de 25°C (Schulze *et al.*, 2005). El pH de la disolución fue medido en un pHmetro (Modelo PHSJ-3F, 0.01pH ± 1bit) y la conductividad eléctrica en un conductímetro (Modelo DDSJ-308, ± 0.5 % (FS) ± 1digit).

### Influencia de los cationes de metales en sistemas antioxidantes

Se colocaron semillas de frijol a germinar en bandejas plásticas como fue descrito anteriormente, con dos concentraciones de

metal cations (corresponding to the MLD and the Limit of Tolerance) and a control treatment (water), for seven treatments with five replicas each. The activity of peroxidases enzymes (POX) (EC: 1.11.1.7) was evaluated, which was determined at 15 DAG from a mass of 0.5 g of leaves. A reaction mixture consisting of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 5.5, guaiacol 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 % v: v) and 1 mL of an enzyme extract prepared from the addition of the same buffer at pH 5.8, 5 % PVP, filtered and centrifuged at 10,000 rpm. The absorbance reading was performed at 470 nm for 4 min at 20 sec intervals on a UV-visible spectrophotometer (Rayleigh-1601). The results were expressed in  $\Delta_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  protein (Bronikowski *et al.*, 2018). For guaiacol peroxidase (GPX) (EC: 1.11.1.7) the same mass of plant material was used and the same reaction mixture was prepared with the difference that the buffer used was at a value of pH 6.1 and pH 7.0 for the enzymatic extract. The absorbance reading was performed at 420 nm and the results were expressed in  $\Delta_{420} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  protein (Wilkesman *et al.*, 2014).

Data were processed using a simple classification ANOVA with the Statgraphic statistical package v. 5.1 plus, and the means comparison test was performed by Tukey  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Establishment of Tolerance Limits for $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ and $\text{Cu}^{2+}$ Cations

The mean lethal dose (MLD) values for the  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  cations, where germination of 50 % of the seeds was not reached, were 125, 10 and 30 ppm, respectively. Another indicator to consider is the phytotoxicity index (PI), which represents the plant's response to exposure to metals. The higher PI value represents a greater phytotoxic or stress effect of the metal, while the smaller means the opposite. PI values in bean seedlings exposed to cations of  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  are shown in Figure 1.

los cationes de metales (correspondientes a la DLM y Límite de Tolerancia) y un tratamiento control (agua), para un total de 7 tratamientos con cinco réplicas cada uno. Se evaluó la actividad de enzimas peroxidadas (POX) (EC:1.11.1.7), la cual fue determinada a los 15 DDG a partir de una masa de 0,5 g de hojas. Se preparó una mezcla de reacción consistente en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  de pH 5.5, guaiacol 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 % v: v) y 1 mL de un extracto enzimático preparado a partir de la adición del mismo buffer a pH 5.8, PVP 5 %, filtrado y centrifugado a 10 000 rpm. La lectura de absorbancia se realizó a 470 nm durante 4 min a intervalos de 20 seg en un espectrofotómetro UV-visible (Rayleigh-1601) y los resultados fueron expresados en  $\Delta_{470} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  proteína (Bronikowski *et al.*, 2018). Para la guaiacol peroxidasa (GPX) (EC:1.11.1.7) se utilizó la misma masa de material vegetal y se preparó la misma mezcla de reacción con la diferencia de que el buffer utilizado fue a un valor de pH 6.1 y pH 7.0 para el extracto enzimático. La lectura de absorbancia se realizó a 420 nm y los resultados fueron expresados en  $\Delta_{420} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  proteína (Wilkesman *et al.*, 2014).

Los datos fueron procesados mediante un ANOVA de clasificación simple con el paquete estadístico Statgraphic v. 5.1 plus, y la prueba de comparación de medias se realizó por Tukey  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Establecimiento de los límites de tolerancia de los cationes $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ y $\text{Cu}^{2+}$

Los valores de dosis letal media (DLM) para los cationes  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , donde no se alcanza la germinación del 50 % de las semillas, fueron de 125, 10 y 30 ppm respectivamente. Otro indicador a tener en cuenta es el **índice de fitotoxicidad (IF)**, el cual representa la respuesta de la planta a la exposición a los metales. El valor de IF más elevado representa mayor efecto fitotóxico o de estrés del metal, mientras que el más pequeño significa lo contrario. Los valores de IF en las plántulas de frijol expuestas a los cationes de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  se muestran en la Figura 1.

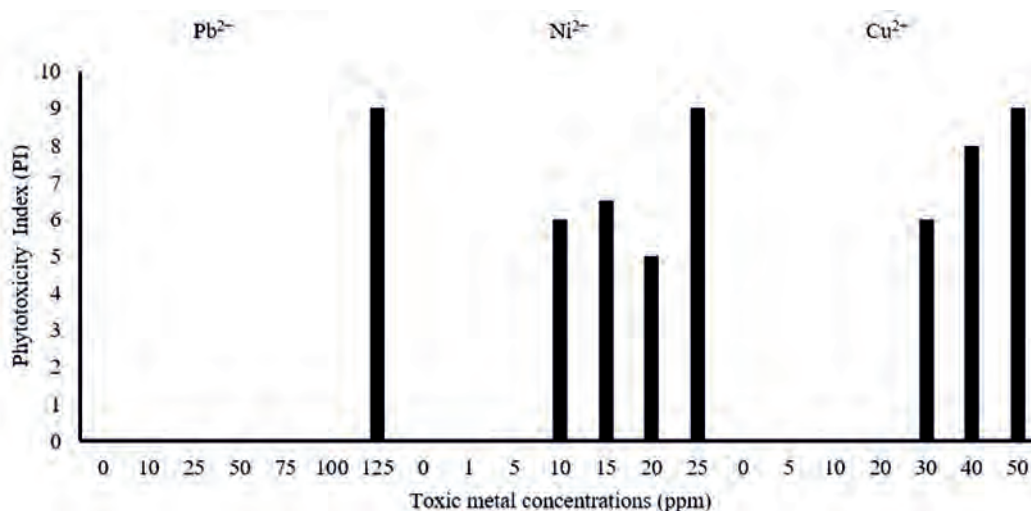


FIGURE 1. Phytotoxicity index (PI) of bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CC-25-9-N with 15 DAG in solutions at different concentrations of toxic metals  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ .

FIGURA 1. Índice de Fitotoxicidad (IF) de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9-N con 15 DDG con disoluciones de concentraciones diferentes de cationes de los metales tóxicos  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ .

For the treatment with  $Pb^{2+}$ , the PI responds with higher values to the highest concentration of 125 ppm. However, in the case of  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  at concentrations below the maximum, a notable PI is already observed. This new and useful result indicates that bean plants, in their early stages of the vegetative phase, tolerate higher concentrations of  $Pb^{2+}$  than other metals such as  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . This is probably because  $Pb^{2+}$  does not present any recognized biological function in plants, so that when introduced into the cell, detoxification mechanisms are activated and rapid accumulation in vacuoles occurs (Shah *et al.*, 2018).

In the cases of  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , they are among the microelements that in small concentrations are used to perform vital functions in plants, such as electron transfer reactions, specific enzyme cofactors and constituents of the structure of several molecules (Pokorska *et al.*, 2018). An increase in the concentration of these metals would not only affect these processes, but, in addition, those associated with oxidative stress at the cellular level, caused by their high concentration. These results allow us to know what are the concentrations from which studies can be carried out on tolerance mechanisms in bean cultivation, since they would be those in which the crop survives without showing apparent damage. These are for the case of  $Pb^{2+}$  100 ppm, for  $Ni^{2+}$  5 ppm and for  $Cu^{2+}$  20 ppm, assuming these are limits of phytotoxicity or crop tolerance.

Those findings are of great importance for current agriculture, mainly because in Cuba the planting of large-scale crops in soils that were unused was accelerated. This implies that, if the objective was to sow beans, a crop of national preference, without carrying out a study of the chemical-physical characteristics of the soil and it had high levels of bioavailable  $Pb^{2+}$ , the risk of direct contamination to the man through the food chain would occur. In the case of  $Ni^{2+}$ , the practical application would be different. Due to its low phytotoxicity limit in this crop, it could give rise to relatively simple bioassays that allow detecting areas at risk of being contaminated with this cation.

### Evaluation of Changes in Membrane Permeability

The pH and electrical conductivity values of seedlings from germinated seeds in the presence of  $Pb^{2+}$  are presented in Figure 2, with variations observed in both indicators in most treatments with respect to control. Regarding the pH, the 25 ppm treatment started with a value greater than 7.4 and after 10 min it went down to find a relatively stable behavior around pH=7 until 30 min. At concentrations of 10 ppm, it started with a pH value lower than 7. However, after 5 min, it rose to 7.6 and after 15 min, it reached stability at values close to pH=7.4.

For the concentrations of 50, 75, 100 and 125 ppm, pH values were started around neutrality, although the concentration of 50 ppm after 25 min rose until it reached its peak next to the 10 ppm treatment. The rest of the concentrations were maintained with constant pH values up to 30 min following a similar behavior to the control, although with values slightly higher than the latter.

Para el tratamiento con  $Pb^{2+}$  el IF responde con mayores valores a la concentración más elevada de 125 ppm. Sin embargo, en el caso del  $Ni^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$  a concentraciones inferiores a las máximas, ya se observa un notable IF. Este nuevo y útil resultado indica que las plantas de frijol en sus primeras fases de la etapa vegetativa toleran mayores concentraciones de  $Pb^{2+}$  que de otros metales como el  $Ni^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$ . Esto es posiblemente debido a que el  $Pb^{2+}$  no presenta ninguna función biológica reconocida en las plantas, por lo que al introducirse en la célula se activan mecanismos de desintoxicación y ocurre una rápida acumulación en vacuolas (Shah *et al.*, 2018).

En los casos del  $Ni^{2+}$  y el  $Cu^{2+}$ , ellos se encuentran entre los microelementos que en pequeñas concentraciones son utilizados para llevar a cabo funciones vitales en las plantas, tales como reacciones de transferencia de electrones, cofactores de enzimas específicas y constituyentes de la estructura de varias moléculas (Pokorska *et al.*, 2018). Un incremento en la concentración de estos metales no solo afectaría estos procesos, sino que, además, se suman los propios del estrés oxidativo a nivel celular, originados por su elevada concentración.

Estos resultados permiten conocer cuáles son las concentraciones a partir de las cuales se pueden realizar estudios acerca de mecanismos de tolerancia en el cultivo del frijol, ya que serían aquellas en las cuales sobrevive el cultivo sin mostrar daños aparentes, que serían para el caso del  $Pb^{2+}$  100 ppm, para el  $Ni^{2+}$  5 ppm y para el  $Cu^{2+}$  20 ppm, asumiéndose éstas como **límites de fitotoxicidad o tolerancia del cultivo**.

Lo encontrado es de gran importancia para la agricultura actual, debido fundamentalmente a que en Cuba se aceleró la siembra de cultivos a gran escala en suelos que se encontraban ociosos. Lo anterior implica que, si el objetivo es sembrar frijol, cultivo de preferencia nacional, sin realizar un estudio de las características químico-físicas del suelo y éste se encontrara con elevados niveles de  $Pb^{2+}$  biodisponible, se podría correr el riesgo de una contaminación directa al ser humano a través de la cadena trófica. Para el caso del  $Ni^{2+}$  la aplicación práctica sería diferente, pues dado su bajo límite de fitotoxicidad, pudiera dar origen a bioensayos relativamente simples que permitan detectar áreas con riesgo de estar contaminadas con este catión.

### Evaluación de cambios en la permeabilidad de las membranas

En la Figura 2 se presentan los valores de pH y conductividad eléctrica de plántulas procedentes de semillas germinadas en presencia de  $Pb^{2+}$ , observándose variaciones en ambos indicadores en la mayoría de los tratamientos con respecto al control. En cuanto al pH el tratamiento de 25 ppm comenzó con un valor superior a 7,4 y a los 10 min descendió para encontrar un comportamiento relativamente estable alrededor de un pH=7 hasta los 30 min. A concentraciones de 10 ppm comenzó con un valor de pH inferior a 7. Sin embargo, a partir de los 5 min ascendió a 7,6 y luego de 15 min alcanzó una estabilidad a valores cercanos de pH=7,4.

Para las concentraciones de 50, 75, 100 y 125 ppm se comenzó con valores de pH alrededor de la neutralidad, aunque la concentración de 50 ppm a partir de los 25 min ascendió hasta encontrar su punto máximo junto al tratamiento de 10 ppm. El resto de las concentraciones se mantuvieron con valores de pH constantes hasta los 30 min siguiendo un comportamiento similar al control, aunque con valores ligeramente superiores al de éste.

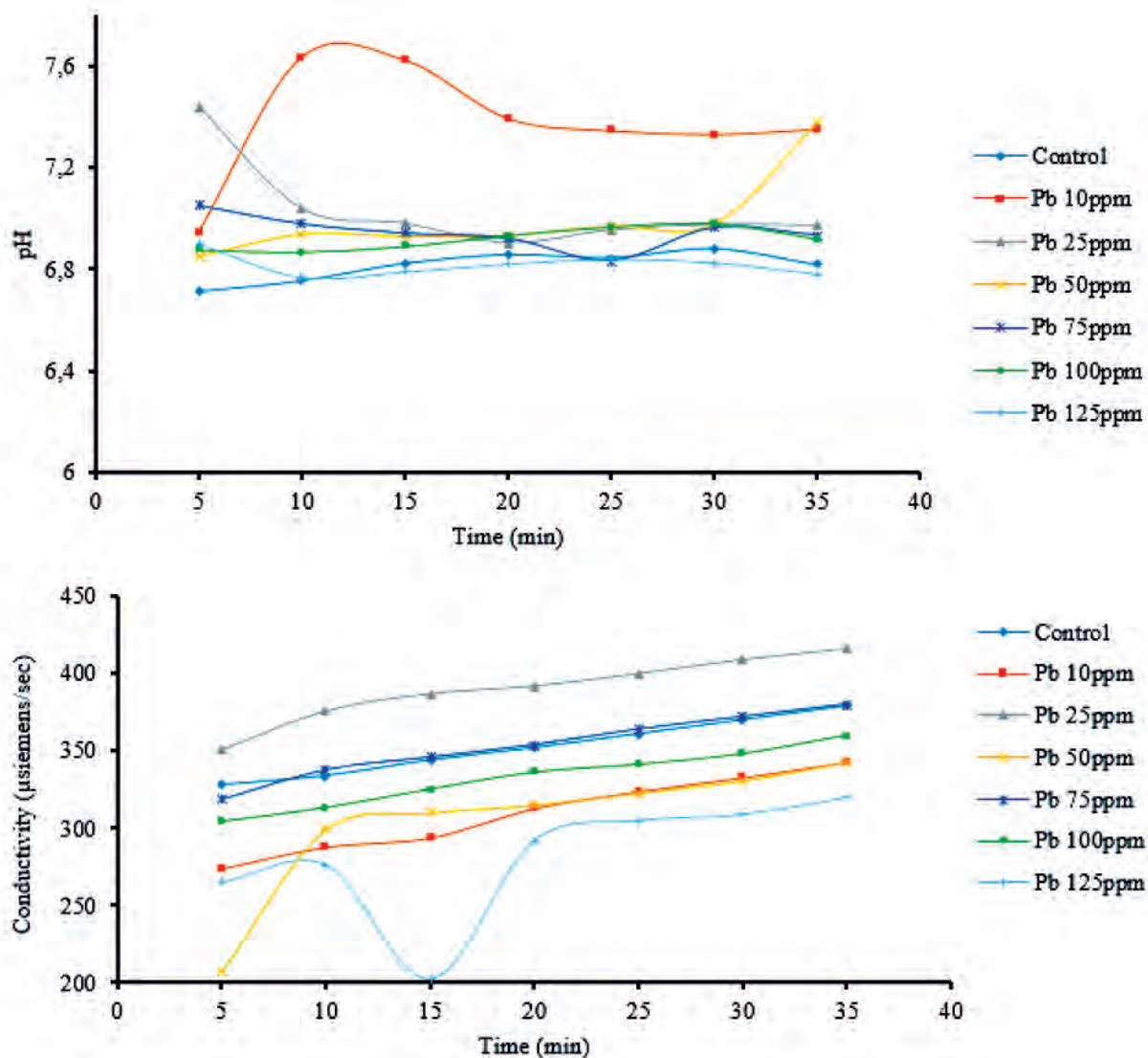


FIGURE 2. Values of pH and electrical conductivity in bean seedling leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CC-25-9-N with 15 DAG in the presence of different  $Pb^{2+}$  concentrations.

FIGURA 2. Valores de pH y conductividad eléctrica de hojas de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9-N con 15 DAG en presencia de disoluciones de concentraciones diferentes del catión  $Pb^{2+}$ .

Although the cytoplasmic pH must be maintained above neutrality, there are changes that can affect this value. Plants when subjected to stress can cause extrusion or entry of  $H^+$  into the cellular interior. Small variations in pH are generally controlled by the buffer capacity of the cytoplasm, but this is a short-lived mechanism that is only maintained for 6-8 min (Budar and Roux, 2011). Therefore, the plants of the present study would have to look for alternative routes of maintenance of membrane integrity, such as synthesizing or destroying organic acids for the control of pH variations, carrying out a physical-chemical mechanism of extrusion of  $H^+$  through the cytoplasm or a pumping of  $H^+$  to the vacuole through the tonoplast (Armbruster *et al.*, 2017).

In the case of electrical conductivity, the more specific behavior was produced by the concentration of 125 ppm that remained similar to that of the control treatment, although with lower values until 10 min, at which point it dropped sharply

Aunque el pH citoplasmático debe ser mantenido sobre la neutralidad, existen cambios que pueden afectar este valor. Las plantas cuando son sometidas a un estrés pueden provocar la extrusión o entrada de  $H^+$  hacia el interior celular. Las pequeñas variaciones del pH generalmente son controladas por la capacidad tampón del citoplasma, pero este es un mecanismo de corta duración que sólo es mantenido de 6-8 min (Budar y Roux, 2011). Por tanto, las plantas del presente estudio tendrían que buscar rutas alternativas de mantención de la integridad de la membrana, como sintetizar o destruir ácidos orgánicos para el control de las variaciones del pH, llevar a cabo un mecanismo físico-químico de extrusión de  $H^+$  a través del citoplasma o un bombeo de  $H^+$  a la vacuola a través del tonoplasto (Armbruster *et al.*, 2017).

Para el caso de la conductividad eléctrica el comportamiento más específico lo produjo la concentración de 125 ppm que se mantuvo similar al del tratamiento control, aunque con valores mucho más bajos hasta los 10 min, momento a partir del cual des-

until a balance or stability was found at 20 min. The highest concentration of 125 ppm of  $Pb^{2+}$  was the one that produced the greatest modification in the cell membrane, since it induced a sharp change in the measurement of electrical conductivity until trying to find a homeostasis of the system.

This balance could be achieved from the exit or entry of  $H^+$ , as well as the entrance of the metal into the cellular interior by means of pumps in the membranes. It has been proven that there are various specific pumps for toxic metal cations in the plants. Specific ATP-dependent enzymes act on these and have a structure similar to  $Na^+/K^+$  pumps of plasma membranes (Li *et al.*, 2016). It is possible that, with the entrance of the metal into the cellular interior, structural changes or rearrangements in the composition of the membrane lipids were being carried out, which caused changes in the conductivity, behavior that is also revealed in the cation  $Ni^{2+}$  shown in Figure 3.

endió bruscamente hasta encontrar un equilibrio o estabilidad a los 20 min. La concentración más elevada de 125 ppm de  $Pb^{2+}$  fue la que produjo la mayor modificación en la membrana celular, ya que indujo un brusco cambio de la medida de la conductividad eléctrica hasta intentar encontrar una homeostasis del sistema.

Este equilibrio pudiera alcanzarse a partir de la salida o entrada de  $H^+$ , así como la entrada del metal al interior celular mediante bombas en las membranas. Se ha comprobado que en las plantas existen diversas bombas específicas para los cationes de metales tóxicos. Sobre éstas actúan enzimas específicas dependientes de ATP y poseen una estructura similar a las de  $Na^+/K^+$  de las membranas plasmáticas (Li *et al.*, 2016). Es posible que, con la entrada del metal al interior celular, se estuviesen llevando a cabo cambios estructurales o reordenamientos en la composición de los lípidos de la membrana, lo cual provocó cambios en la conductividad, comportamiento que también se pone de manifiesto en el catión  $Ni^{2+}$  mostrado en la Figura 3.

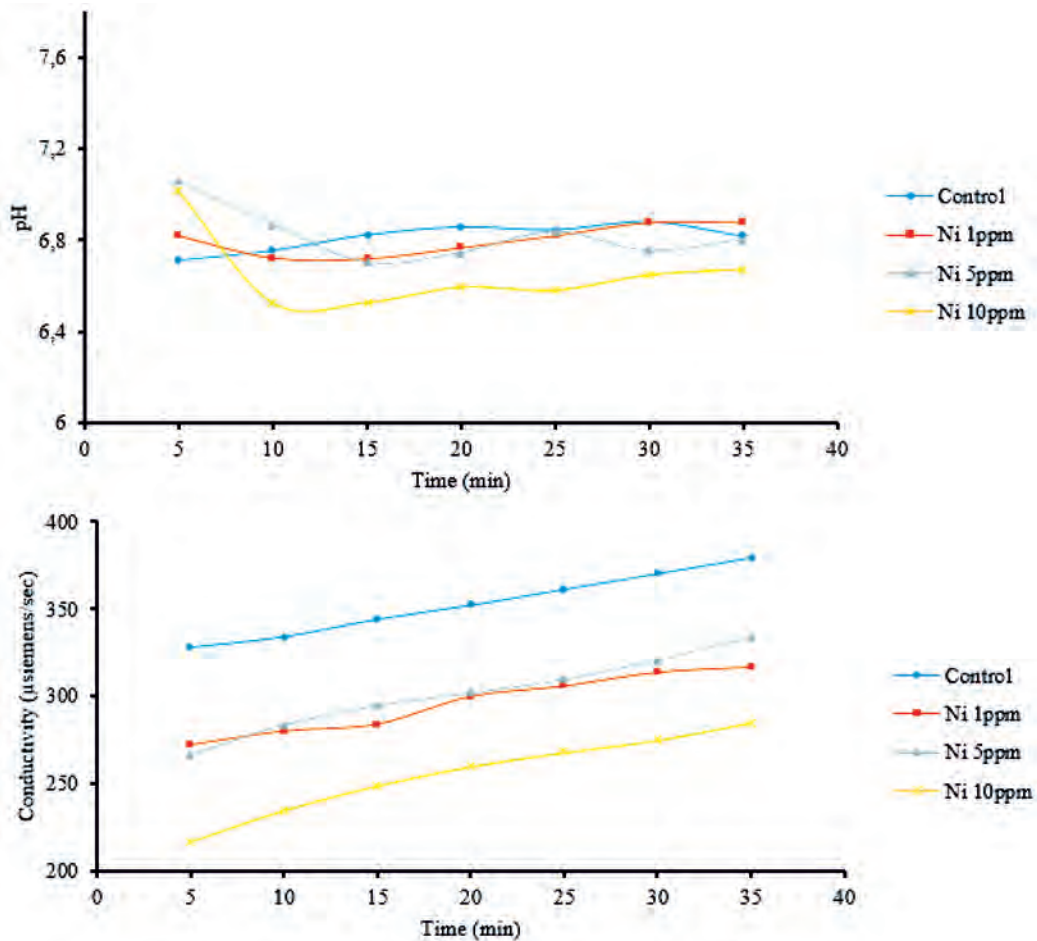


FIGURE 3. Values of pH and conductivity in bean seedling leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CC-25-9-N with 15 DAG in the presence of different  $Ni^{2+}$  concentrations.

FIGURA 3. Valores de pH y conductividad de hojas de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9-N con 15 DDG en presencia de disoluciones de concentraciones diferentes del catión  $Ni^{2+}$ .

In the case of  $Ni^{2+}$ , measurements could only be made in those treatments with sufficient plant material (concentrations of 1, 5 and 10 ppm). The concentration of 5 ppm began with a pH value near to 7, from this moment it began to decrease until 15 min, where it returned to take higher

Para el caso de este metal sólo se pudieron realizar mediciones en aquellos tratamientos con material vegetal suficiente (concentraciones de 1, 5 y 10 ppm). La concentración de 5 ppm comenzó con un valor de pH próximo de 7, a partir de este momento mostró una reducción hasta los 15 min, donde regresó a valores alrededor

values around 6.8 trying to find a stabilization. The concentration of 10 ppm began with a pH value close to 7 and dropped sharply to 10 min, at which point a gradual rise was verified. Finally, the 1 ppm treatment, although it started with values higher than those of the control treatment, over time, it maintained a similar behavior to that. In the case of conductivity, all treatments were maintained with a behavior similar to that of the control treatment, although with lower conductivity values. This trend was also maintained for the case of  $\text{Cu}^{2+}$  shown in Figure 4.

de 6.8 tratando de encontrar una estabilización. La concentración de 10 ppm comenzó con un valor de pH cercano a 7 y descendió bruscamente hasta los 10 min, momento a partir del cual se verificó un paulatino ascenso. Por último, el tratamiento de 1 ppm, aunque comenzó con valores superiores a los del tratamiento control, con el paso del tiempo mantuvo un comportamiento similar al de éste. Para el caso de la conductividad, todos los tratamientos se mantuvieron con un comportamiento similar al del tratamiento control, aunque con valores de conductividad inferiores, tendencia esta que se mantuvo también para el caso del  $\text{Cu}^{2+}$  mostrado en la Figura 4.

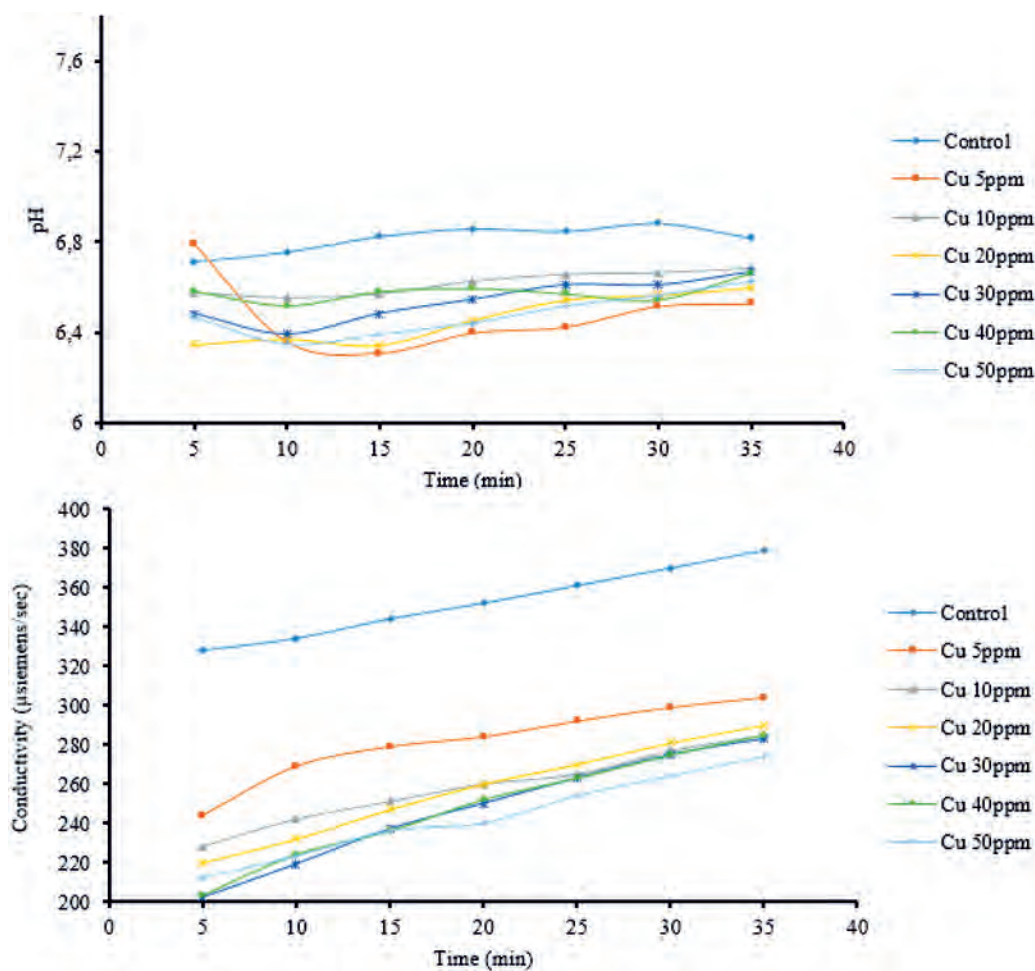


FIGURE 4. Values of pH and conductivity in bean seedling leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CC-25-9-N with 15 DAG in the presence of different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations.

FIGURA 4. Valores de pH y conductividad de hojas de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9-N con 15 DDG en presencia de disoluciones de concentraciones diferentes del catión  $\text{Cu}^{2+}$ .

In the seedlings that germinated with the  $\text{Cu}^{2+}$  solutions, the greatest differences between the treatments were caused in the pH measurement. For all concentrations of the metal under study, similarity was expressed regarding the general trend of variation as a function of time. Except for the concentration of 5 ppm that started with pH values higher than those of the control treatment and had a rapid decrease until 15 min, at which point an increase in its value began approaching that of the other concentrations used.

It is known that  $\text{Cu}^{2+}$  affects among other factors the transport of transmembrane ions, the concentration of intra-

En las plántulas que germinaron con las disoluciones de  $\text{Cu}^{2+}$ , donde se provocaron las mayores diferencias entre los tratamientos fue en la medida del pH. Para todas las concentraciones del metal en estudio se manifestó similitud en cuanto a la tendencia general de variación en función del tiempo, excepto la concentración de 5 ppm que comenzó con valores de pH superiores a los del tratamiento control y tuvo un rápido descenso hasta los 15 min, momento a partir del cual comenzó un ascenso de su valor aproximándose al de las otras concentraciones empleadas.

Es conocido que el  $\text{Cu}^{2+}$  afecta entre otros factores el transporte de iones transmembrana, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y



cellular  $\text{Ca}^{2+}$  and cell turgidity, as well as interfering with the transduction of cellular signals such as those of  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger (Sun *et al.*, 2010). This metal could cause changes in transport in the cell by displacing  $\text{Ca}^{2+}$  from the membranes, and that leads to changes in intracellular pH. Another possible mechanism is the incorporation of  $\text{Cu}^{2+}$ , once it is in the cytosol, to enzymes, amino acids or polypeptides such as phytochelatin, for a transport to the vacuolar interior, which would also cause a change in pH. It has been proven that  $\text{Cu}^{2+}$  induces changes in membrane permeability attributed to an increase in non-selective conductivity and to the inhibition or low activity of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase pumps (Li *et al.*, 2016).

All those changes that affect the permeability of the membrane depend largely on its composition. The opening of the channels from transmembrane proteins and transduction signals, the transporters and the pumps, can be affected depending on the stress that is caused. By penetrating these systems, metal cations can cause the production of reactive oxygen species that are detected by receptors that activate protein kinases or signals in kinase cascades, changes in  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin levels, regulation of gene expression and different transcription factors that would trigger, depending on the metal and its concentration, a specific response in the crop.

It could be considered that the bean variety CC-25-9-N shows a behavior of metal accumulator plant, which leads to establishing its potential in the possible negative effect for the trophic chain, not only because of the possibility of reaching the edible fruit, but because of the danger of using crop residues as a source of organic fertilizer. The results found present a great practical value for the precepts of agroecology and sustainable agriculture, which in turn, technically justify the systematic control of the content of metals in normative documents of agricultural pollution and Codex standards, based on the evaluation of risks organized by FAO and WHO.

### Influence of Metal Cations on Antioxidant Systems

The POX and GPX enzyme activity values for the  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  cations at concentrations corresponding to the MLD and phytotoxicity limit or tolerance, are shown in Table 2.

turgencia de la célula, además de interferir en la transducción de señales celulares como las del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero (Sun *et al.*, 2010). Este metal, al desplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  de las membranas, pudiera provocar en la célula modificaciones en el transporte, lo que conlleva a cambios en el pH intracelular. Otro posible mecanismo es la incorporación del  $\text{Cu}^{2+}$  una vez en el citosol a enzimas, aminoácidos o polipéptidos como las fitoquelatinas, para un transporte al interior vacuolar, lo que provocaría también un cambio en el pH. Se ha comprobado que el  $\text{Cu}^{2+}$  induce cambios en la permeabilidad de la membrana atribuidos a un incremento en la conductividad no selectiva y a la inhibición o baja actividad de las bombas  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática (Liu *et al.*, 2018).

Todos aquellos cambios que afecten la permeabilidad en la célula, dependen en gran medida de la composición de la membrana plasmática. La apertura de los canales a partir de proteínas transmembrana y señales de transducción, los transportadores y las bombas, se pueden ver afectados en dependencia del estrés que se ocasione. Al penetrar por estos sistemas los cationes de metales, pueden provocar la producción de especies reactivas que son detectadas por receptores que activan proteínas quinasas o señales en cascadas de quinasas, cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina, regulación en la expresión de genes y diferentes factores de transcripción que desencadenarían, en dependencia del metal y su concentración, una respuesta específica en el cultivo.

Pudiera considerarse que la variedad de frijol CC-25-9-N muestra un comportamiento de planta acumuladora de metales, lo cual conlleva a establecer su potencialidad en el posible efecto negativo para la cadena trófica, no solamente por la posibilidad de llegar al fruto comestible, sino por el peligro de utilizar los restos de cosecha como fuente de abono orgánico. Los resultados encontrados presentan un gran valor práctico para los preceptos de la agroecología y la agricultura sostenible, que a su vez justifican técnicamente el control sistemático del contenido de metales en documentos normativos de agrocontaminación y en las normas del Codex, a partir de la evaluación de riesgos organizadas por la FAO y la OMS.

### Influencia de los cationes de metales en sistemas antioxidantes

Los valores de actividad enzimática POX y GPX para los cationes  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  a concentraciones que se corresponden a la DLM y límite de fitotoxicidad o tolerancia, se muestran en la Tabla 2.

**TABLE 2. Activity of POX and GPX enzymes in bean seedling leaves exposed to different metal concentrations.**  
**TABLA 2. Actividad de las enzimas POX y GPX en hojas de las plántulas de frijol expuestas a diferentes concentraciones de metales**

Treatment	POX $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$	GPX $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$
Control	0,51 <sup>b</sup>	0,0019 <sup>c</sup>
Pb-100	0,64 <sup>a</sup>	0,0025 <sup>b</sup>
Pb-125	0,53 <sup>b</sup>	0,0033 <sup>a</sup>
Ni-5	0,13 <sup>d</sup>	0,0010 <sup>d</sup>
Ni-10	0,27 <sup>c</sup>	0,0017 <sup>c</sup>
Cu-20	0,10 <sup>d</sup>	0,0006 <sup>e</sup>
Cu-30	0,12 <sup>d</sup>	0,0009 <sup>de</sup>

a... e: different letters represent means that differ significantly according to multiple range test (Tukey  $p < 0.05$ )  
 a... e: letras distintas representan medias que difieren significativamente según prueba de rangos múltiples (Tukey  $p < 0.05$ )

Enzyme activity values indicate the removal of reactive oxygen species due to oxidative stress. The treatment corresponding to the concentration of 100 ppm of the  $Pb^{2+}$  cation showed higher values than the control, however, at a harmful concentration such as 125 ppm, values that do not differ from the control treatment were obtained, probably due to the activation of other antioxidant systems. The treatments corresponding to the microelements, in each of the concentrations studied, did not exceed the control values, presumably because they were incorporated into the plant's own metabolites or enzymes. The induction of "not so intense" stress could be used in signaling pathways to promote acceleration effects in the growth and development of seedlings, such as the synthesis of intermediary compounds and metabolites. It should be considered that germination was carried out under controlled conditions, not in a natural system where the own soil organic matter or the interaction with the microorganisms facilitated the absorption of the cations under study to the roots.

It is known that POX enzymes catalyze one of the final steps of lignin biosynthesis in roots (Kumar and Prasad, 2018). In addition, GPX participates in metabolic reactions of lignin biosynthesis and AIA decomposition (Falade *et al.*, 2018). It is possible that these seedlings, and mainly those exposed to  $Pb^{2+}$ , could activate as a defensive response the lignification of the root endodermis to prevent transport of the metal to the stem by keeping it out of the central cylinder, behavior demonstrated for metals such as  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  (Ledesma, 2014).

GPX also catalyzes the oxidation of  $H^+$  donor chemical species due to the absence of a specific substrate, sometimes using guaiacol and sometimes ascorbate as a substrate for their reactions (Smirnoff, 2018). Ascorbate is one of the precursors for the synthesis of phytochelatin, so if there is not enough of this peptide in the leaves to transport  $Pb^{2+}$  to the vacuoles, it is still potentially toxic and GPX would continue to eliminate the reactive species that generate inside the cell. It justifies the high values of this enzyme activity for that metal.

Changes in pH values and electrical conductivity, variables associated with membrane permeability, as well as POX and GPX activities depended on both, the metal and its concentration, so it is possible to infer some specificity in the plant - metal interaction, suggesting the predominance of different response mechanisms.

## CONCLUSIONS

- For the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) variety CC-25-9-N, the values of 100, 5 and 20 ppm as limits of phytotoxicity or tolerance to metals  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , respectively, are established.
- Changes in membrane permeability and antioxidant enzymatic activities depended on the metal and its concentration.

Los valores de actividad enzimática indican la remoción de especies reactivas de oxígeno producto de un estrés oxidativo. El tratamiento correspondiente a la concentración de 100 ppm del catión  $Pb^{2+}$  mostró valores superiores al control, en cambio a una concentración dañina como la de 125 ppm se obtuvo valores que no se diferencian del tratamiento control, probablemente producto a la activación de otros sistemas antioxidantes. Los tratamientos correspondientes a los microelementos, en cada una de las concentraciones estudiadas, no superaron los valores del control, debido presumiblemente a que fueron incorporados a metabolitos o enzimas propios de la planta. La inducción de un estrés "no tan intenso" pudo ser utilizado en vías de señalización para propiciar efectos de aceleración en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, como la síntesis de compuestos y metabolitos intermediarios. Se debe considerar que la germinación se llevó a cabo en condiciones controladas, no en un sistema natural donde la propia materia orgánica del suelo o la interacción con los microorganismos les facilitasen a las raíces la absorción de los cationes en estudio.

Se conoce que las enzimas POX catalizan uno de los pasos finales de la biosíntesis de lignina en las raíces (Kumar y Prasad, 2018). Además, la GPX participa en reacciones metabólicas de biosíntesis de lignina y descomposición del AIA (Falade *et al.*, 2018). Es posible que estas plántulas, y principalmente aquellas expuestas al  $Pb^{2+}$ , pudieron activar como una respuesta defensiva la lignificación de la endodermis de la raíz para prevenir el transporte del metal al tallo manteniéndolo fuera del cilindro central, comportamiento demostrado para metales como  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (Ledesma, 2014).

La GPX cataliza también la oxidación de especies químicas donadoras de  $H^+$  debido a la ausencia de un sustrato específico, utilizando en ocasiones al guaiacol y en otras al ascorbato como sustrato para sus reacciones (Smirnoff, 2018). El ascorbato es uno de los precursores para la síntesis de fitoquelatinas, por lo que si no hay suficiente cantidad de este péptido en las hojas para transportar al  $Pb^{2+}$  hacia las vacuolas, éste sigue siendo potencialmente tóxico y la GPX continuaría eliminando las especies reactivas que se generen en el interior de la célula, justificándose los elevados valores de la actividad de esta enzima para este metal.

Los cambios en los valores de pH y de la conductividad eléctrica, variables asociadas a la permeabilidad de la membrana, así como de las actividades POX y GPX dependieron tanto del metal, como de su concentración, por lo que es posible inferir cierta especificidad en la interacción planta - metal, lo que sugiere el predominio de mecanismos de respuesta diferentes.

## CONCLUSIONES

- Se establecen para el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9-N, como límites de fitotoxicidad o tolerancia a los metales  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , los valores de 100, 5 y 20 ppm respectivamente.
- Los cambios en la permeabilidad de la membrana y actividades enzimáticas antioxidantes dependieron del metal y de su concentración.

## REFERENCES / REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMBRUSTER, U.; GALVIS, C.V.; KUNZ, H.H.; STRAND, D.D.: "The regulation of the chloroplast proton motive force plays a key role for photosynthesis in fluctuating light", *Current opinion in plant biology*, 37: 56-62, 2017, ISSN: 1369-5266, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.012>.

- BRONIKOWSKI, A.; BARTH, K.; URLACHER, B.V.: "Redesign of a New Manganese Peroxidase Highly Expressed in *Pichia pastoris* towards a Lignin-Degrading Versatile Peroxidase", *ChemBioChem*, 19(23): 2481-2489, 2018, ISSN: 1439-4227, DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201800500>.
- BUDAR, F.; ROUX, F.: "The role of organelle genomes in plant adaptation: time to get to work!", *Plant signaling & behavior*, 6(5): 635-639, 2011, ISSN: 1559-2324, DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.5.14524>.
- FALADE, O.A.; MABINYA, V.L.; OKOH, I.A.; NWODO, U.U.: "Ligninolytic enzymes: Versatile biocatalysts for the elimination of endocrine-disrupting chemicals in wastewater", *Microbiology Open*, 7(6): 1-17, 2018, ISSN: 2045-8827, DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.722>.
- HASAN, M.; CHENG, Y.; KANWAR, M.K.; CHU, X.-Y.; AHAMMED, J.G.; QI, Z.-Y.: "Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review", *Frontiers in plant science*, 8: 1492, 2017, ISSN: 1664-462X, DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>.
- KABATA, P.A.: *Trace elements in soils and plants*, Ed. CRC press, 3rd. includes bibliographical references ed., Boca Raton, London, New York, Washington, DC., 331 p., 2001, ISBN: 0-8493-1575-1.
- KUMAR, A.; PRASAD, M.N.V.: "Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms", *Ecotoxicology and environmental safety*, 166: 401-418, 2018, ISSN: 0147-6513.
- LEDESMA, O.C.I.: *Efecto de la contaminación atmosférica por metales pesados en las hojas de los árboles de la zona metropolitana del Valle de Toluca.*, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), MSc. Thesis, Toluca, México, 2014.
- LI, Y.; PROVENZANO, S.; BLIEK, M.; SPELT, C.; APPELHAGEN, I.; MACHADO DE FARIA, L.; VERWEIJ, W.; SCHUBERT, A.; SAGASSER, M.: "Evolution of tonoplast P-ATP ase transporters involved in vacuolar acidification", *New Phytologist*, 211(3): 1092-1107, 2016, ISSN: 0028-646X, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nph.14008>.
- LIU, J.; WANG, J.; LEE, S.; WEN, R.: "Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves", *PLoS one*, 13(9): e0203612, 2018, ISSN: 1932-6203, DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0203612>.
- PIRZADAH, T.B.; MALIK, B.; TAHIR, I.; KUMAR, M.; VARMA, A.A.A.; REHMAN, R.U.: "Phytoremediation: an eco-friendly green technology for pollution prevention, control and remediation", *Soil Rem Plants Prospects Chall*, 5: 107-126, 2015, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-799937-1.00005-X>.
- POKORSKA, N.K.; RAJKOWSKA, M.M.A.; PROTASOWICKI, M.: "Acute Lethal Toxicity of Heavy Metals to the Seeds of Plants of High Importance to Humans", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 101(2): 222-228, 2018, ISSN: 0007-4861, DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-018-2382-9>.
- PORTUONDO, L.B.: *Efectos de los ácidos húmicos sobre el estrés por metales pesados en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), MSc. Thesis, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, 2011.
- RIVERA, C.M. del C.; TRUJILLO, N.A.; MIRANDA, de L.C.; AURORA, M.; MALDONADO, C.E.: "Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas", *Interciencia*, 30(6): 15-24, 2005, ISSN: 0378-1844.
- SCHULZE, E.D.; BECK, E.; MÜLLER, H.K.: "Plant ecology. Annals of Botany", En: *Berlin/Heidelberg: Springer. Annals of Botany*, Ed. Springer, Oxford University Press, Berlin, Germany, 2005, DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcj018>.
- SHAH, G.M.; NASIR, M.; IMRAN, M.; BAKHAT, H.F.; RABBANI, F.; SAJJAD, M.; FAROOQ, A.B.U.; AHMAD, S.; SONG, L.: "Biosorption potential of natural, pyrolysed and acid-assisted pyrolysed sugarcane bagasse for the removal of lead from contaminated water", *PeerJ*, 6: e5672, 2018, ISSN: 2167-8359, DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5672>.
- SHIVARAJ, Y.; BARBARA, P.; GUGI, B.; VICRÉ, G.M.; DRIIOUICH, A.; RAMASANDRA, G.S.; DEVARAJA, A.; KAMBALAGERE, Y.: "Perspectives on Structural, Physiological, Cellular, and Molecular Responses to Desiccation in Resurrection Plants", *Scientifica*, 2018(ID 9464592): 18, 2018, DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9464592>.
- SMIRNOFF, N.: "Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals", *Free Radical Biology and Medicine*, 122: 116-129, 2018, ISSN: 0891-5849, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>.
- SUN, J.; WANG, M.; DING, M.; DENG, S.; LIU, M.; LU, C.; ZHOU, X.; CHU, X.-Y.; ZHENG, X.; ZHANG, Z.: "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals triggered by the PM H<sup>+</sup>-coupled transport system mediate K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells", *Plant, Cell & Environment*, 33(6): 943-958, 2010, ISSN: 0140-7791, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02118.x>.
- WILKESMAN, J.; CASTRO, D.; CONTRERAS, M.L.; KURZ, L.: "Guaiacol peroxidase zymography for the undergraduate laboratory", *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(5): 420-426, 2014, ISSN: 1470-8175.

*Liane Portuondo Fariás*, Profesora Titular; Universidad Agraria de La Habana, Departamento de Química, Autopista Nacional y Carretera Tapaste km 23½ CP: 32700, Apartado Postal: 18-19, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, e-mail: [liane@unah.edu.cu](mailto:liane@unah.edu.cu)

Dariellys Martínez Balmori, Profesora Titular; Universidad Agraria de La Habana, Departamento de Química, Autopista Nacional y Carretera Tapaste km 23½ CP: 32700, Apartado Postal: 18-19, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, e-mail: [darielly@unah.edu.cu](mailto:darielly@unah.edu.cu)

Fernando Guridi Izquierdo, Profesor Titular; Universidad Agraria de La Habana, Departamento de Química, Autopista Nacional y Carretera Tapaste km 23½ CP: 32700, Apartado Postal: 18-19, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, e-mail: [fguridi@unah.edu.cu](mailto:fguridi@unah.edu.cu)

Alejandro Falcón Rodríguez, Investigador, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, e-mail: [alejandror@inca.edu.cu](mailto:alejandror@inca.edu.cu)

Andrés Calderín García, Professor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratório de Solos, Rio de Janeiro, Brasil, e-mail: [cg.andres@gmail.com](mailto:cg.andres@gmail.com)

João Paulo Machado Torres, professor, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Radioisótopos, Rio de Janeiro, Brasil, e-mail: [liane@unah.edu.cu](mailto:liane@unah.edu.cu)

The authors of this work declare no conflict of interests.

This item is under license Reconocimiento-NoComercial de Creative Commons 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0).

The mention of trademarks of specific equipment, instruments or materials is for identification purposes, there being no promotional commitment in relation to them, neither by the authors nor by the publisher.