

MODIFICACIONES FISIOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES DE PLÁNTULAS DE TRIGO (*Triticum durum*) DEBIDO A TOXICIDAD DE ARSENIATO

PHYSIOLOGICAL MODIFICATIONS AND ANTIOXIDANTS OF WHEAT (*Triticum durum*) SEEDLINGS DUE TO ARSENATE TOXICITY

Ana I. Mireles-Arriaga¹, Adriana Saldaña-Robles², Luis G. González-Torres¹,
Jesús Hernández-Ruiz¹, Diana Sanzón-Gómez¹, Jorge E. Ruiz-Nieto^{1*}

¹Departamento de Agronomía y ²Departamento de Ingeniería Agrícola, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato C.P. 36500, Guanajuato, México. (jorge.ruiz@ugto.mx).

RESUMEN

El arsénico en el agua de riego y su acumulación en el suelo agrícola se incrementa en zonas con agricultura intensiva e impacta negativamente en la salud humana y la economía de los productores. Las plantas absorben el arsénico en forma de arseniato y pueden translocarlo a las semillas, por lo que el arseniato en especies como el trigo (*Triticum durum*) puede mantenerse en la harina. Los mecanismos celulares no discriminan el fósforo del arsénico por la similitud entre ellos. Esto genera afectaciones metabólicas que restringen el desarrollo de las plantas y su desempeño fisiológico desde las primeras etapas fenológicas, y puede incluso limitar el establecimiento de parcelas productivas. El objetivo de este estudio fue evaluar las modificaciones fisiológicas y los componentes antioxidantes causadas por arseniato en plántulas de trigo. La hipótesis fue que las respuestas dependen de la concentración del arseniato y de la tolerancia de las variedades. En plántulas de las variedades Bárcenas y Cortázar se evaluaron las concentraciones de arseniato 100, 200, 500 y 700 mg L⁻¹ y agua destilada, y el diseño experimental fue de bloques completos al azar. Cada variedad se consideró un bloque y los tratamientos correspondieron a las combinaciones de los bloques con las concentraciones de arseniato y el testigo, y con cinco repeticiones de cada prueba de germinación. Las plántulas de Bárcenas fueron las más vigorosas y con actividad antioxidante mayor, y en concentraciones altas de arseniato sintetizan mayor concentración de prolina y compuestos fenólicos. Con esta variedad se podrían obtener líneas tolerantes que permitan el cultivo de plantas de trigo en concentraciones altas de arsénico.

Palabras clave: metal pesado, arsénico, AsV, ROS, semillas.

ABSTRACT

The presence of arsenic in irrigation water and its accumulation in agricultural soil increases in areas with intensive farming and negatively affects the health and economy of the producers. Plants absorb arsenic in the form of arsenate and can translocate it to the seeds; thus, we can find arsenate in the flour of species like wheat (*Triticum durum*). The plant cellular mechanisms do not differentiate phosphorous from arsenic due to the similarity between them; this generates metabolic disorders that restrict the plant development and its physiological performance from its first phenological stages, and can even limit the productive plot establishment. This study aimed to evaluate the physiological modifications and antioxidant components due to arsenate in wheat seedlings. We hypothesized that the response depends on the concentration of arsenate and the tolerance of the varieties. In the Bárcenas and Cortázar varieties seedlings, we evaluated concentrations of arsenate (100, 200, 500, and 700 mg L⁻¹) and distilled water, using a randomized complete block experimental design. We considered each variety as a block and the treatments corresponded to the block combinations with the concentrations of arsenate and the control, with five repetitions per germination test. The Bárcenas seedlings were the most vigorous and presented the highest antioxidant activity, and with high concentrations of arsenate they synthesize greater concentrations of proline and phenolic compounds. With this variety, it could be possible to obtain tolerant lines that allow the cultivation of wheat plants in high concentrations of arsenic.

Keywords: heavy metal, arsenic, AsV, ROS, seed.

INTRODUCTION

Arsenic (As) is toxic to plants (Garg and Singla, 2011), animals (Ventura-Lima *et al.*, 2011), and humans (Jomova *et al.*, 2011). Exposure to As may result from natural and anthropogenic

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2018. Aprobado: enero, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 841-853. 2019.

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es tóxico para plantas (Garg y Singla, 2011), animales (Ventura-Lima *et al.*, 2011) y humanos (Jomova *et al.*, 2011). La exposición al As puede resultar de fuentes naturales y antropogénicas (O'shea *et al.*, 2007). En el segundo caso, las industrias metaleras descargan las aguas residuales directa o indirectamente al ambiente, en especial en los países en desarrollo (Fu y Wang, 2011). El agua subterránea con As es el principal medio de exposición en poblaciones en diversas áreas del mundo (Gunduz *et al.*, 2010). El agua subterránea contaminada con As es un riesgo para los suelos agrícolas y para la producción de alimentos con los cultivos irrigados con esa agua; todo esto es una amenaza para la agricultura sustentable en las áreas afectadas (Williams *et al.*, 2006).

Los suministros de agua potable están contaminados en más de 70 países (Mondal *et al.*, 2010), y en América Latina la contaminación por As en el agua está en 14 de 20 países. En México, en 13 de los 31 estados hay contaminación del agua por As, entre ellos Guanajuato (Bundschuh *et al.*, 2012), y las principales regiones contaminadas son Salamanca ($180 \mu\text{g L}^{-1}$; Mejía *et al.*, 2007), Cuerámaro ($220 \mu\text{g L}^{-1}$; Martínez y García, 2007) y en especial El Copal ($300 \mu\text{g L}^{-1}$; Rodríguez *et al.*, 2006) en Irapuato. Lo anterior supera el límite máximo permisible de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 (SSA, 1994) de agua para uso y consumo humano de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, así como el nivel máximo para riego agrícola de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ según la NOM-CE-CCA-001/89 (SEDESOL, 1989). Estos municipios de Guanajuato tienen una intensa actividad agrícola y se caracterizan por la producción de cereales, como trigo (*Triticum triticum*). El Bajío es una de las principales zonas de producción con 71% del trigo de nuestro país en el 2017 (SIAP, 2017). Las variedades Bárcenas y Cortázar fueron las más cultivadas por su capacidad para producir con dos y tres riegos, respecto a las demás variedades de la región (Solís-Moya *et al.*, 2009). Ambas variedades se obtuvieron en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo, del Campo Experimental Bajío, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. La variedad Cortázar se obtuvo por hibridación y selección genética a través del método genealógico y tuvo como progenitor femenino 15 genotipos recombinados en seis cruzamientos, mien-

sources (O'shea *et al.*, 2007). In the latter, metallurgical industries discharge their wastewater directly or indirectly to the environment, especially in developing countries (Fu and Wang, 2011). Groundwater with As is the primary source of exposure in populations around the world (Gunduz *et al.*, 2010). Groundwater contaminated with As represents a risk for the agricultural lands and the food production with irrigated farming using this water; all of this threatens the sustainable agriculture in the affected areas (Williams *et al.*, 2006).

Mondal *et al.* (2010) found contaminated drinking water supplies in more than 70 countries; in Latin America, the water contaminated with As is in 14 of 20 countries. In Mexico, 13 of the 31 states present water contamination with As, Guanajuato among them (Bundschuh *et al.*, 2012), and the most contaminated regions are: Salamanca ($180 \mu\text{g L}^{-1}$; Mejía *et al.*, 2007), Cuerámaro ($220 \mu\text{g L}^{-1}$; Martínez y García, 2007), and, especially, El Copal ($300 \mu\text{g L}^{-1}$; Rodríguez *et al.*, 2006) in Irapuato. The above exceed the maximum permissible limit of the Official Mexican Standard NOM-127-SSA1-1994 (SSA, 1994) about water for human use and consumption of $25 \mu\text{g L}^{-1}$, and the maximum concentration for agricultural irrigation of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ according to the NOM-CE-CCA-001/89 (SEDESOL, 1989). These municipalities of Guanajuato have an intensive agricultural activity and are characterized by the production of cereals, like wheat (*Triticum triticum*). El Bajío is one of the leading production areas, producing 71% of the wheat in our country in 2017 (SIAP, 2017). The Bárcenas and Cortázar varieties were the most cultivated due to their capacity to produce with two and three irrigations, compared to the other varieties in the region (Solís-Moya *et al.*, 2009). The Wheat Genetic Improvement Program, El Bajío Experimental Field of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) produced both varieties. The Cortázar variety was obtained by genetic hybridization and selection through the genealogical method, with 15 genotypes recombined in six crossings as its female parent; the male parent was the result of the recombination of five genotypes in two crossings (Solís-Moya *et al.*, 1996). The Bárcenas variety was obtained through genealogical hybridization and selection, and the female parents were nine genotypes recombined in five crossings until the appearance of a recombinant line; the variety

tras que en el progenitor masculino se recombinaron cinco genotipos en dos cruzamientos (Solís-Moya *et al.*, 1996). La variedad Bárcenas se obtuvo por hibridación y selección genealógica, y los progenitores femeninos fueron nueve genotipos recombinados en cinco cruzamientos hasta constituirse como línea recombinante; el progenitor masculino fue la variedad Marte M86. Respecto a la calidad del grano entre ambas variedades, la semilla de Cortázar es 6% más dura, pero la composición química y la de gluteninas es similar en el grano de ambas variedades (Solís-Moya *et al.*, 2003).

Respecto al estado redox del suelo, el As puede estar presente como arsenito (AsIII) o arseniato (AsV); el segundo se incorpora con facilidad a las células vegetales a través del sistema de transporte Pi de alta afinidad (Verbruggen *et al.*, 2009). Hay un riesgo alto de contaminación e intoxicación con AS por consumo de especies en las cuales se usa el follaje para la alimentación; además, hay As en especies donde el interés está en el consumo del grano. Zhang *et al.* (2009) identificaron As en raíces, tallos, hojas, raquis, granos, glumas y aristas en plantas de trigo cultivadas en suelo con altas concentraciones de As (50 y 100 mg kg⁻¹). Además, en la harina de esos granos los niveles de As excedieron los límites oficiales permitidos (0.5 mg kg⁻¹) en Taian, China. En los humanos, la exposición y el consumo de alimentos con As se asocia con muchas enfermedades (Jomova *et al.*, 2011).

En relación con la respuesta fisiológica a la toxicidad con el metal pesado, la presencia de As en el agua de riego o en el suelo a un nivel elevado limita el crecimiento en las plantas con síntomas de toxicidad, como la reducción de su biomasa y el rendimiento (Cozzolino *et al.*, 2010). Incluso, en los primeros estadios el As reduce la germinación en semillas de arroz, lechuga y mostaza, lo cual dificulta el establecimiento de unidades productivas (Garg y Singla, 2011). La identificación de variedades con algún nivel de tolerancia a metales pesados desde las primeras etapas fenológicas es importante porque permitirá predecir la respuesta de las plantas adultas a la toxicidad (Akinci y Akinci, 2010).

La respuesta antioxidante comienza después de la supresión del sistema de absorción P/As (Nagajyoti *et al.*, 2010). Luego, debido al incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), las células presentan una respuesta antioxidante enzimática y metabólica en casi todos los compartimentos celulares,

Marte M86 was used as the male parent. Regarding the grain quality between both varieties, the Cortázar seed is 6% harder, but their chemical and glutenin compositions are similar in both varieties (Solís-Moya *et al.*, 2003).

Regarding the soil redox state, As may be present as arsenite (AsIII) or arsenate (AsV); the latter is easily incorporated to the plant cells through the Pi high-affinity transport system (Verbruggen *et al.*, 2009). There is a high risk of As contamination and intoxication due to consumption of species in which the foliage is used for feeding; besides, there is As in species where the focus is on grain consumption. Zhang *et al.* (2009) identified As in roots, stems, leaves, rachis, grains, glumes, and awns of wheat plants cultivated in a land with high concentrations (50 and 100 mg kg⁻¹) of As. Additionally, in the flour of those grains, the concentration of As exceeded the official permissible limit (0.5 mg kg⁻¹) in Taian, China. In humans, the exposure and consumption of food with As is associated with many diseases (Jomova *et al.*, 2011).

Concerning the physiological response to the toxicity with the heavy metal, the presence of high concentrations of As in the irrigation water or the land limits plant growth in the presence of toxicity symptoms, like the reduction of its biomass and yield (Cozzolino *et al.*, 2010). Even in the first stages, As reduces germination in rice, lettuce and mustard, which difficult the establishment of productive plots (Garg and Singla, 2011). The identification of varieties with some level of tolerance to heavy metals since their first phenological stages is important because it will allow to predict the response of the adult plants to toxicity (Akinci y Akinci, 2010).

The antioxidant response starts after the suppression of the P/As (Nagajyoti *et al.*, 2010). Afterward, due to the increasing concentration of reactive oxygen species (ROS), cells present an enzymatic and metabolic antioxidant response in almost every cell compartment, which demonstrates the importance of the ROS detoxification for cellular survival (Hasanuzzaman *et al.*, 2012). The cells of a plant subjected to factors that generate ROS react differently depending on the stress factor, time of exposure, genetic variety, and previous stress encounters (Møller *et al.*, 2007). This study aimed to evaluate the physiological modifications and antioxidant components of wheat seedlings as a response to concentrations of arsenate. The hypothesis

lo que demuestra la importancia de la desintoxicación de los ROS para la supervivencia celular (Hasanuz-zaman *et al.*, 2012). Las células de plantas sometidas a factores que generan ROS, reaccionan de manera distinta dependiendo del factor de estrés, tiempo de exposición, la variedad genética y los periodos previos (Møller *et al.*, 2007). El objetivo de este estudio fue evaluar las modificaciones fisiológicas y los componentes antioxidantes de plántulas de trigo en respuesta a la concentración de arseniato. La hipótesis fue que las variaciones en las respuestas fisiológicas y antioxidantes dependen de la concentración del arseniato y las diferencias en la tolerancia de las variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio se realizó en la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, y se usaron las variedades de trigo Cortázar y Bárcenas liberadas en 1994 y 2002, respectivamente (SNICS, 2017). Dichas variedades tienen importancia económica y agroalimentaria en el estado de Guanajuato, además de presentar una mayor producción bajo riego restringido (Solís-Moya *et al.*, 2009). De acuerdo con Gill y Tuteja (2010), varios tipos de estrés abiótico conducen a la sobreproducción de ROS. La capacidad de Bárcenas y Cortázar de producir en condiciones hídricas limitantes sugiere que podrían presentar una mejor respuesta antioxidante a otro tipo de estrés abiótico como el causado por el As.

Tratamientos

Las concentraciones de AsV fueron 100, 200, 500 y 700 mg L⁻¹, y el testigo fue agua destilada. En cada concentración de AsV se obtuvieron 800 plántulas de ambas variedades. Las semillas se desinfectaron 5 min con NaClO al 1% y se enjuagaron con agua destilada. Las semillas germinaron en papel y se usaron 200 mL de cada solución y 100 semillas por prueba. Para evitar la acumulación y modificación de la concentración de AsV en cada prueba se realizó un solo riego. Las pruebas se mantuvieron a 23 °C y una vez emergidas las plántulas, el tejido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Variables evaluadas

Las variables morfológicas y fisiológicas fueron el porcentaje de germinación (GE, %) y el vigor (VI, %) evaluados a los siete y tres días respectivamente (Chun-Xi *et al.*, 2007). La biomasa total (BT, g) se determinó y se dividió en la plúmula (BP) y la radícula

was that the variations in the physiological and antioxidant responses depend on the concentration of arsenate and the different tolerances in the varieties.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

We conducted this study in the Life Sciences Division at the University of Guanajuato, using the Cortázar and Bárcenas wheat varieties liberated in 1994 and 2002, respectively (SNICS, 2017). These varieties have economic and agro-alimentary importance in the state of Guanajuato; they also yield a higher production under restricted irrigation (Solís-Moya *et al.*, 2009). According to Gill and Tuteja (2010), several types of abiotic stress induce the overproduction of ROS. The production ability of Bárcenas and Cortázar in limiting water conditions suggests that they could harbor a better antioxidant response to a different type of abiotic stress, like the one caused by As.

Treatments

The concentrations of AsV were 100, 200, 500, and 700 mg L⁻¹, using distilled water as a control. In each concentration of AsV, we obtained 800 seedlings of both varieties. Seeds were disinfected with NaClO at 1% during 5 min and rinsed with distilled water. The seeds germinated in paper and used 200 mL of each solution and 100 seeds per test. To avoid the accumulation and modification of the concentration of AsV, we irrigated only once in each test. Tests were kept at 23 °C; once the seedlings emerged, we store the tissue at -20 °C until its use.

Evaluated variables

The morphological and physiological variables were the percentage of germination (GE, %) and the vigor (VI, %), which were evaluated at days seven and three, respectively (Chun-Xi *et al.*, 2007). Total biomass (BT, g) was determined and divided into the plumule (BP) and the radicle (BR), which was carried out by drying the seedlings at 90 °C during 24 h. We measured the length (cm) of the plumule (LP) and the radicle (LR). The Germination (IGE) and Vitality (IVI) Indexes were determined with the equations reported by Chun-Xi *et al.*, (2007). Proline concentration (PR, $\mu\text{g mL}^{-1}$) was used as a biochemical stress indicator and determined by the method described by Bates *et al.*, (1973), based on the reaction between proline and ninhydrin (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione), the spectrophotometric measurement was performed at 517 nm. The antioxidant activity

(BR), para lo cual las plántulas se secaron 24 h a 90 °C. La longitud (cm) de la plúmula (LP) y de la radícula (LR) se midió. Los Índices de Germinación (IGE) y Vitalidad (IVI) se determinaron con las fórmulas reportadas por Chun-Xi *et al.*, (2007). Como indicador bioquímico del estrés se evaluó la concentración de prolina (PR, $\mu\text{g mL}^{-1}$) mediante el método descrito por Bates *et al.*, (1973), con base en la reacción entre dicho aminoácido y la ninhidrina (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione), y la medición espectrofotométrica se realizó a 517 nm. La actividad antioxidante (AA, %) se determinó con los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995) y 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Kuskoski *et al.*, 2005). Los extractos se prepararon con el procedimiento descrito por Martínez-Cruz y Paredes-López (2014), con una modificación para ABTS por su reacción con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Las absorbancias se determinaron por espectrofotometría a 515 y 754 nm para DPPH y ABTS respectivamente. La concentración de compuestos fenólicos (CF) se evaluó con el procedimiento de extracción y medición según Martínez-Cruz y Paredes-López (2014). La reacción se midió a 750 nm y los resultados se expresaron como mg mL^{-1} de ácido gálico (Awad *et al.*, 2011). La concentración de clorofila total, a y b (CLT, CLA y CLB, mg mL^{-1}) se evaluó con el método descrito por Dudek *et al.* (2014) con base en las absorbancias 450 y 750 nm, y las ecuaciones publicadas por Lichtenthaler (1987), y Lichtenthaler y Bushmann (2001).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron de acuerdo con un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones, cada variedad fue un bloque y los tratamientos fueron las combinaciones de los bloques con las concentraciones de AsV y el testigo. Además se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software estadístico Minitab® 16.2.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la GE entre variedades, pero sí entre tratamientos ($p \leq 0.01$). Conforme aumentó la concentración de AsV la GE disminuyó; sin embargo, la reducción en Cortázar y Bárcenas fue 13.2 y 7.6% en promedio, respectivamente, hasta la concentración de 700 mg L^{-1} . En Cortázar en esta concentración de AsV no hubo reducción significativa de la GE *versus* el testigo. La reducción en la germinación de semillas de *T. aestivum* se debe al aumento en la concentración de As (Chun-Xi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, de acuerdo con Mahdiah *et al.* (2013), las concentraciones bajas de As (0-2.5 mg L^{-1}) estimularon

(AA, %) was determined with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Kuskoski *et al.*, 2005) radicals. The extracts were prepared with the procedure described by Martínez-Cruz and Paredes-López (2014), with a modification for ABTS due to its reaction with $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. The absorbances of DPPH and ABTS were measured at 515 and 754 nm, respectively. The concentration of phenolic compounds (CF) was evaluated with the procedure reported by Martínez-Cruz and Paredes-López (2014); we measured the reaction at 750 nm and expressed the results as mg mL^{-1} of gallic acid (Awad *et al.*, 2011). The total, a, and b chlorophyll concentration (CLT, CLA, and CLB, mg mL^{-1}) was evaluated with the method described by Dudek *et al.* (2014) based in the absorbances at 450 and 750 nm, and the equations published by Lichtenthaler (1987), and Lichtenthaler and Bushmann (2001).

Statistical analysis

Results were analyzed according to a randomized block design with five replications, each variety corresponded to one block, and the treatments were the block combinations with the concentrations of AsV and the control. Besides, we used the Tukey test ($p \leq 0.05$) with the statistical software Minitab® 16.2.3.

RESULTS AND DISCUSSION

There were no significant differences ($p > 0.01$) in the GE between treatments, but there were between varieties ($p \leq 0.05$). As the concentration of AsV increased, the GE decreased; however, this reduction in Cortázar and Bárcenas was an average of 13.2 and 7.6%, respectively, until the concentration of 700 mg L^{-1} . In Cortázar, with this concentration of AsV, there was no significant decrease in the GE versus the control. The reduction in seed germination of *T. aestivum* is the result of the increased concentration of As (Chun-Xi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). However, according to Mahdiah *et al.* (2013), low concentrations of As (0-2.5 mg L^{-1}) stimulated germination, elongation of plumules and roots, biomass accumulation, and chlorophyll synthesis. Moreover, based on Li *et al.* (2007), 0-1 mg kg^{-1} concentrations stimulated germination. According to Lefèvre *et al.* (2009), this could be due to overproduction of ROS and reactive nitrogen molecules like nitric oxide, which generates a higher level of oxidative stress that stimulates germination. Also, germination requires a strictly regulated concentration of ROS (Bailly *et al.*, 2008).

la germinación, la elongación de las plúmulas y raíces, la acumulación de biomasa y la síntesis de clorofila. Y, según Li *et al.* (2007), las concentraciones de 0-1 mg kg⁻¹ estimularon la germinación. De acuerdo con Lefèvre *et al.* (2009), esto se podría deber a una sobreproducción de ROS y moléculas reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico, lo que genera un nivel mayor de estrés oxidativo que estimula la germinación. Además, la germinación requiere una concentración estrictamente regulada de ROS (Bailly *et al.*, 2008). Kranner y Colville (2011) identificaron los metales pesados Cd, Cu y As, como promotores de ese estímulo en la germinación.

En el tratamiento de C700 se determinó una alta concentración de CF y mayor actividad antioxidante respecto al testigo, lo cual concuerda con investigaciones previas. En el VI hubo diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre variedades y tratamientos. El VI y la GE se comportaron de manera similar como se esperaba, pero el número de plántulas normales menos en promedio entre el VI y la GE fue 50.1 y 23.9 para Cortázar y Bárcenas, respectivamente, aunque era semilla procedente del mismo ciclo agrícola. En el IGE no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre variedades, pero sí ($p \leq 0.01$) entre tratamientos; es decir, la determinación depende principalmente del crecimiento de la LP y la GE, y estas variables fueron similares entre variedades, pero no entre los tratamientos; así, el índice calculado se comportó de manera similar.

Entre variedades y tratamientos hubo diferencia en BT ($p \leq 0.01$). Aunque en ambas variedades, desde el testigo hasta la concentración de AsV más alta, la BT se redujo y el comportamiento fue distinto entre variedades. En Cortázar, la BT se redujo de forma gradual 24 mg en promedio en cada tratamiento. En Bárcenas, desde la concentración 100 a 500 mg L⁻¹ hubo un aumento de 19 mg, hasta que la concentración más alta lo inhibió. En ambas variedades se redujo la proporción de la BR conforme disminuyó la BT por el aumento en la concentración de AsV, la reducción promedio fue 1.55 y 1.69% para Cortázar y Bárcenas, respectivamente, y se confirmó con la correlación de 0.98 ($p \leq 0.01$) entre la BT y la BR. El As no es un elemento esencial para las plantas, aunque en pequeñas cantidades puede estimular su crecimiento (Liu *et al.*, 2012), pero causa toxicidad que inhibe el crecimiento de forma severa, al disminuir o detener la expansión y la acumulación de biomasa (Garg y Singla, 2011). En concentraciones suficientemente altas, el As interfiere

Kranner and Colville (2011) identified the heavy metals Cd, Cu, and As, as promoters of germination.

In the C700 treatment, we determined a high concentration of CF and antioxidant activity compared to the control, which agrees with previous research. We observed a significant difference in the VI ($p \leq 0.01$) between varieties and treatments. The VI and GE behaved similarly, as expected, but the average number of normal seedlings was lower between the VI, and the GE was of 50.1 and 23.9 for Cortázar and Bárcenas, respectively, although the seed was from the same agricultural cycle. In the IGE, we observed significant differences ($p \leq 0.01$) between treatments, but not between varieties ($p > 0.05$); that is, the determination depends mainly on the growth of the LP and the GE, these variables were similar between varieties, but not between treatments; thus, the calculated index behaved similarly.

There was a significant difference in the BT ($p \leq 0.01$) between varieties and treatments. Although the BT decreased in both varieties, from the control to the highest AsV concentration, the behavior was different between varieties. In Cortázar, BT decreased gradually 24 mg on average in each treatment. In Bárcenas, from the concentration of 100 to 500 mg L⁻¹, we observed an increase of 19 mg, until the highest concentration inhibited such increase. In both varieties, as the AsV concentration increased, the proportion of BR and the BT decreased; the average reduction was 1.55 and 1.69% for Cortázar and Bárcenas, respectively, as confirmed by the correlation of 0.98 ($p \leq 0.01$) between the BT and the BR. As is not an essential element for plants, although in small quantities it can stimulate their growth (Liu *et al.*, 2012), but is toxic to them, as it severely inhibits their growth, by decreasing or stopping biomass expansion and accumulation (Garg and Singla, 2011). In sufficiently high concentrations, As interferes with crucial metabolic processes that can lead to the death of the plant (Finnegan and Chen, 2012).

The biomass reduction of wheat due to As toxicity is reported in wheat. In winter wheat seedlings, Quanji *et al.* (2008) observed a maximum decrease of 73.9 and 64.0% in the plumule and radicle biomass; while Mahdieh *et al.* (2013) determined a maximum decrease of 77.8% in the radicle biomass of the Zarin variety; Zengin (2015) reported a maximum decrease of 69.6 and 67.0%, in the wheat radicle and coleoptile biomass. There were differences in the BR between

con procesos metabólicos críticos que pueden conducir incluso a la muerte de la planta (Finnegan y Chen, 2012).

La reducción en la biomasa debida a la toxicidad por As se ha reportado en trigo. Quanji *et al.* (2008) observaron una disminución máxima de 73.9 y 64.0% en la biomasa de la plúmula y radícula en plántulas de trigo de invierno; Mahdieh *et al.* (2013) encontraron una disminución máxima de 77.8% en la biomasa de la radícula de plántulas de trigo de invierno de la variedad Zarin; Zengin (2015) midió una disminución máxima de 69.6 y 67.0%, en la biomasa de la radícula y el coleóptilo de plántulas de trigo. En BR hubo diferencias entre variedades ($p \leq 0.05$) y entre tratamientos ($p \leq 0.01$) y diferencias ($p \leq 0.01$) en BP en ambos casos. Además, para esta variable se determinó una correlación negativa de -0.75 ($p \leq 0.05$) con el VI. En la fitotoxicidad por As, este metal se absorbe y acumula en la raíz (Garg y Singla, 2011), donde comienza la detoxificación para reducir el AsV a AsIII intracelular, seguida del flujo a otros órganos por el xilema (Zhao *et al.*, 2009). La translocación eficaz desde la raíz evolucionó en genotipos hiperacumuladores, lo cual parece ser un mecanismo crucial de hipertolerancia (Verbruggen *et al.*, 2009). En nuestros resultados si se considera el medio semi líquido en el que las plantas germinaron, las plántulas de trigo en altas concentraciones de AsV destinaron parte de sus recursos para la elongación de la radícula, y para así acceder a agua libre del metal. Los cambios en la proporción de la biomasa formada en la radícula y la plúmula, también se hallaron en plántulas de trigo obtenidas bajo otros tipos de estrés abiótico, como la sequía (Manschadi *et al.*, 2008) y salinidad (Zabihi-e-Mahmoodabad *et al.*, 2011).

En la LP hubo diferencias entre variedades ($p \leq 0.05$) y entre tratamientos ($p \leq 0.01$). En Cortázar, la LP se redujo al aumentar la concentración de AsV, mientras que en Bárcenas la plúmula mantuvo su crecimiento incluso en altas concentraciones del metal pesado. En la LR se identificaron diferencias entre variedades ($p \leq 0.05$) y entre tratamientos ($p \leq 0.01$). En Cortázar, la radícula se alargó 1.15 cm en promedio conforme la concentración aumentó desde el testigo hasta 500 mg L^{-1} . En Bárcenas, a diferencia de la otra variedad, la radícula se alargó 0.32 cm en promedio con cada nivel desde el tratamiento testigo hasta la concentración de 700 mg L^{-1} . De acuerdo con Chu *et al.* (2010), las plantas o solo algunos órganos como

varieties ($p \leq 0.05$) and between treatments ($p \leq 0.01$); we observed differences in the BP ($p \leq 0.01$) in both cases. Additionally, for this variable, we determined a negative correlation of -0.75 ($p \leq 0.05$) with the VI. In the phytotoxicity due to As, roots absorb and accumulate this metal (Garg and Singla, 2011); it is here where the detoxification starts and reduces AsV to intracellular AsIII, which is transported through the xylem to different organs (Zhao *et al.*, 2009). The efficient translocation from the root evolved in hyperaccumulating genotypes, which seems to be a crucial hypertolerance mechanism (Verbruggen *et al.*, 2009). In our results, we did consider the semi-liquid medium in which the plants germinated, the wheat seedlings in high concentrations of AsV destined part of their resources for the radicle elongation in order to access to free As water. The changes in the proportion of biomass formed in the radicle and plumule were also found in wheat seedlings under different types of abiotic stress, like drought (Manschadi *et al.*, 2008) and salinity (Zabihi-e-Mahmoodabad *et al.*, 2011).

In the LP, we observed differences between varieties ($p \leq 0.05$) and between treatments ($p \leq 0.01$). In Cortázar, the LP decreased as the AsV concentration increased; while, in Bárcenas, the plumule kept its growth even at high concentrations of the heavy metal. We identified differences in the LR between varieties ($p \leq 0.05$) and between treatments ($p \leq 0.01$). In Cortázar, the radicle lengthened an average of 1.15 cm as the concentration increased from the control to 500 mg L^{-1} . In Bárcenas, unlike the other variety, the radicle lengthened an average of 0.32 cm with each concentration, from the control treatment up to the 700 mg L^{-1} concentration. According to Chu *et al.* (2010), plants or just some organs, like the root, develop thinning due to the limited resources or to several stress sources. In our results, plumule growth stopped while radicles elongated, and at the same time, both organs lost biomass, which led to the thinning of the seedlings. Also, a negative correlation of -0.72 ($p \leq 0.05$) between the GE and the LR, which can be interpreted as an increase in the radicle length as the germination decreases due to the increase in the concentration of AsV (Table 1).

Proline is a compatible and inert osmolyte that protects subcellular structures and macromolecules in response to stress (Szabados and Savoure, 2010), which is why it functions as a biochemical stress indicator and even as an indicator of heavy metal-induced toxicity.

la raíz presentan adelgazamiento debido a la limitación de recursos o a diversas fuentes de estrés. En nuestros resultados, el crecimiento de las plúmulas se detuvo mientras que las radículas se alargaban, y al mismo tiempo ambos órganos perdían biomasa lo cual conducía al adelgazamiento de las plántulas. Además, una correlación negativa de -0.72 ($p \leq 0.05$) entre la GE y la LR, se puede interpretar como un aumento en la longitud de la radícula a medida que la germinación se reduce por el incremento en la concentración de AsV (Cuadro 1).

La prolina es un osmolito compatible e inerte que protege las estructuras subcelulares y macromoléculas en respuesta al estrés (Szabados y Savoure, 2010), por lo que se usa como indicador bioquímico de estrés e incluso para la toxicidad por metales pesados como el As. Hasanuzzaman y Fujita (2013) lo demostraron en plántulas de *Triticum aestivum* en presencia de AsV y Pavlík *et al.* (2010) en plantas de *Spinacia oleracea* con As. En el caso específico de la toxicidad por As, la prolina actúa como protector enzimático (Mishra y Dubey, 2006). En nuestros resultados se identificaron diferencias significativas en la concentración de prolina entre variedades ($p \leq 0.05$) y en las concentraciones de AsV ($p \leq 0.01$) evaluadas. En Cortázar, la síntesis de prolina se redujo desde la exposición de las plántulas a las primeras concentraciones de AsV, mientras que en Bárcenas la síntesis de prolina aumentó gradualmente desde 100 hasta 700 mg L⁻¹. No se comprende por completo el mecanismo por el cual un alto contenido

Hasanuzzaman and Fujita (2013) demonstrated this use of proline in *Triticum aestivum* seedlings in the presence of AsV; and Pavlík *et al.* (2010) in *Spinacia oleracea* with As. In the specific case of As toxicity, proline works as an enzymatic protector (Mishra and Dubey, 2006). In our results, we identified significant differences in the concentration of proline between varieties ($p \leq 0.05$) and in the evaluated concentrations of AsV ($p \leq 0.01$). In Cortázar, the synthesis of proline decreased from the exposure of the seedlings to the first concentrations of AsV; meanwhile, proline synthesis gradually increased from 100 to 700 mg L⁻¹ in Bárcenas. The different genotypes, the mechanism, as well as its possible versions, of the association between a high content of proline and As detoxification (Zengin, 2015) is still unknown. Evidence, suggest the regulation of AsIII by chelation in the cytoplasm, which reduces the heavy metal admission to avoid damage to the membrane and proteome (Mishra and Dubey, 2006) (Figure 1).

In the CF we identified differences between varieties ($p \leq 0.05$) and between treatments ($p \leq 0.01$). Compared to their corresponding controls, both varieties showed an increase in CF as a response to the AsV-induced toxicity. However, in Cortázar, the highest concentration of CF was observed in the 100 and 200 mg L⁻¹ treatments; meanwhile, in Bárcenas, the highest concentrations of CF were in the 200, 500, and 700 mg L⁻¹ treatments. The latter would explain part of the tolerance of the Bárcenas

Cuadro 1. Variables morfológicas y fisiológicas evaluadas en las semillas de trigo bajo cinco concentraciones de arseniato.
Table 1. Morphological and physiological variables evaluated in wheat seeds under five concentrations of arsenate.

| Var | C0 | C100 | C200 | C500 | C700 | B0 | B100 | B200 | B500 | B700 |
|-----|---------|----------|-----------|--------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| GE | 96.0 a | 87.6 abc | 88.0 abc | 60.4 e | 90.4 abc | 92.8 ab | 88.0 abc | 82.8 bcd | 73.2 d | 80.0 cd |
| VI | 62.0 a | 52.4 abc | 42.4 abc | 22.0 e | 36.8 abc | 74.8 ab | 73.2 abc | 72.0 bcd | 44.0 d | 55.6 cd |
| LP | 10.6 a | 10.2 a | 9.6 ab | 10.6 a | 7.2 c | 9.5 ab | 10.5 a | 8.0 bc | 10.7 a | 10.7 a |
| LR | 5.6 de | 6.1 cde | 8.2 ab | 9.1 a | 5.2 e | 6.8 bcde | 7.4 bc | 7.4 bc | 7.1 bcd | 8.1 ab |
| BT | 325 a | 323 a | 294 c | 255 e | 228 g | 307 b | 238 f | 252 e | 276 d | 215 h |
| BP | 62 cd | 68 ab | 68 ab | 70 a | 58 de | 53 ef | 50 f | 52 f | 65 bc | 51 f |
| BR | 262 a | 255 b | 226 c | 184 f | 170 g | 254 b | 188 f | 199 e | 210 d | 163 h |
| IGE | 13.7 a | 12.5 abc | 12.6 abc | 8.6 e | 12.9 abc | 13.3 ab | 12.6 abc | 11.8 bcd | 10.5 d | 11.4 cd |
| IVI | 145.1 a | 128.2 ab | 121.3 abc | 92.2 d | 92.5 d | 125.6 ab | 132.5 ab | 95.4 cd | 111.8 bcd | 122.7 abc |

Variable (Var), Cortázar (C), Bárcenas (B), concentraciones de arseniato (0, 100, 200, 500 y 700 mg L⁻¹), germinación (GE, %), vigor (VI, %), longitud (cm) de la plúmula (LP) y la radícula (LR), biomasa total (BT, mg) de la plúmula (BP) y la radícula (BR), índice de germinación (IGE), índice de vigor (IVI). Los valores con letra diferente en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$).

❖ Variable (Var), Cortázar (C), Bárcenas (B), arsenate concentrations (0, 100, 200, 500, and 700 mg L⁻¹), germination (GE, %), vigor (VI, %), plumule (LP) and radicle (LR) length (cm), plumule (BP) and radicle (BR) total biomass (BT, mg), germination index (IGE), vigor index (IVI). Values with different letter in a row are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

de prolina se asocia con la desintoxicación del As (Zengin, 2015), ni las posibles versiones de dicho mecanismo debido a las diferencias entre genotipo. Las evidencias sugieren la regulación del AsIII por quelación en el citoplasma, lo cual reduce la admisión del metal pesado para evitar el daño de la membrana y proteoma (Mishra y Dubey, 2006) (Figura 1).

En los CF se identificaron diferencias entre las variedades ($p \leq 0.05$) y entre tratamientos ($p \leq 0.01$). En ambas variedades se determinó un incremento de CF en respuesta a la toxicidad por AsV respecto a cada testigo. Sin embargo, en Cortázar la mayor concentración de CF se determinó en los tratamientos de 100 y 200 mg L^{-1} , mientras que en Bárcenas las concentraciones más altas de CF fueron en los tratamientos 200, 500 y 700 mg L^{-1} . Lo anterior explicaría parte de la tolerancia de las plántulas de Bárcenas para mantener su desarrollo y funciones fisiológicas en concentraciones altas de AsV. Los metabolitos secundarios protegen contra el estrés oxidativo y desempeñan una función importante en las plantas, al permitir su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Drzewiecka *et al.*, 2018). Entre estos metabolitos, los compuestos fenólicos son claves en la respuesta a varios tipos de estrés abiótico, incluidas las concentraciones excesivas de metales tóxicos (Woźniak *et al.*, 2017). Mohamed *et al.* (2016) y Sánchez-Viveros *et al.* (2011) reportaron el aumento en la concentración de los compuestos fenólicos por la toxicidad causada por As.

seedlings to keep their development and physiological functions in high concentrations of AsV. Secondary metabolites protect against oxidative stress, and play an important function by allowing plants to adapt to different environmental conditions (Drzewiecka *et al.*, 2018). Among these metabolites, phenolic compounds are essential in the response to several types of abiotic stress, including excessive concentrations of toxic metals (Woźniak *et al.*, 2017). Mohamed *et al.* (2016) and Sánchez-Viveros *et al.* (2011) reported the increasing concentration of phenolic compounds due to the toxicity caused by As.

In the antioxidant activity with both radicals, we identified differences ($p \leq 0.01$) between varieties and treatments. Using the radical DPPH, we determined that with the 100 and 200 mg L^{-1} concentration of AsV, the AA was higher compared to the controls. With the radical ABTS, the concentration of 500 mg L^{-1} showed the higher AA in both varieties, but with this radical, Bárcenas showed a higher AA in each treatment. Results were different for both radicals, these differences may be due to the distinct methodologies employed; for the determination of the AA with DPPH we used freshly prepared solutions, and with ABTS it is necessary to keep the reaction in the dark during at least 12 h to generate free radicals, because of the short shelf-life of ABTS.

Since the time of reaction of the ABTS solution is not always the same, the solution capacity to react

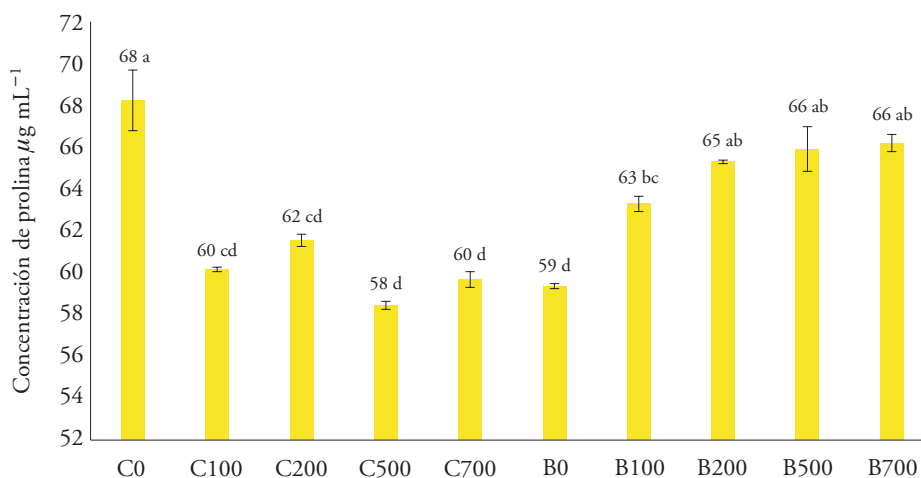


Figura 1. Concentraciones de prolina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en plántulas de trigo en función de la concentración de AsV. Cortázar (C), Bárcenas (B), concentraciones de arseniato (0, 100, 200, 500 y 700 mg L^{-1}). Los valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 1. Proline concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in wheat seedlings depending on the concentration of AsV. Cortázar (C), Bárcenas (B), arsenate concentrations (0, 100, 200, 500, and 700 mg L^{-1}). Values with different letter are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para la actividad antioxidante con ambos radicales se identificaron diferencias ($p \leq 0.01$) entre variedades y tratamientos. Mediante el radical DPPH se determinó que con las concentraciones de AsV 100 y 200 mg L⁻¹ hubo la mayor AA respecto a sus testigos. En el radical ABTS, la concentración de 500 mg L⁻¹ tuvo la mayor AA en ambas variedades, pero con este radical Bárcenas presentó mayor AA en cada tratamiento. Para ambos radicales los resultados fueron diferentes, al parecer porque para la determinación de la AA por DPPH se usaron soluciones recién preparadas, mientras que para la determinación por ABTS es necesario mantener la reacción en oscuridad por al menos 12 h para generar radicales libres porque el ABTS tiene una vida corta de utilidad.

Debido a que la solución de ABTS no siempre tiene el mismo tiempo de reacción, la capacidad de la solución para reaccionar con extractos de las variedades podría explicar las distintas determinaciones de la AA con los radicales ABTS y DPPH (Thaipong *et al.*, 2006). En nuestros resultados, el grupo de metabolitos antioxidantes que interactúan con el radical ABTS explicarían mejor la tolerancia a la fitotoxicidad en las plántulas de Bárcenas. El incremento de la AA se debe a la alta capacidad de los metabolitos y enzimas antioxidantes para quelar metales pesados por grupos hidroxilo y carboxilo; y suprimir las reacciones y la formación de ROS (Cervilla *et al.*, 2012). Respecto a la CLT, hubo diferencias ($p \leq 0.01$) entre variedades y tratamientos. Así, se determinaron 4.4 mg mL⁻¹ (promedio) más de concentración de CLT en las plántulas de Cortázar en cada tratamiento, respecto a Bárcenas. En las plántulas de Cortázar y Bárcenas las concentraciones de 200 y 500 mg L⁻¹ fueron las que más redujeron la concentración de CLT. Las disminuciones en la concentración de CLT se debieron a que los metales pesados como el AsV pueden sustituir al ion Mg central o limitar la síntesis de clorofila por la inhibición de la actividad de las enzimas asociadas (Yilmaz y Temizgül, 2012). Además hubo diferencias ($p \leq 0.01$) en la concentración de clorofila a y b, entre variedades y tratamientos. La principal diferencia fue la modificación en la proporción del tipo de clorofila, en respuesta a la presencia de AsV; en Cortázar la proporción de clorofila a y b fue 55 y 45% en promedio, mientras que en Bárcenas fue 65 y 35% en promedio (Cuadro 2). Nuestros resultados son congruentes con la reducción en la síntesis de clorofila b reportada por Hu *et al.*, (2014) en plántulas de *Triticum aestivum*.

with the extracts of different varieties could explain the different determinations of the AA with the ABTS and DPPH radicals (Thaipong *et al.*, 2006). In our results, the group of antioxidant metabolites that interact with the ABTS radical would better explain the tolerance to the phytotoxicity observed in Bárcenas seedlings. The increase in the AA is the result of the high capacity of the antioxidant metabolites and enzymes to chelate heavy metals by hydroxyl and carboxyl groups; and the suppression of the reactions and the formation of ROS (Cervilla *et al.*, 2012). Regarding the CLT, we observed differences ($p \leq 0.01$) between varieties and treatments. Thus, in each treatment, we determined a concentration of 4.4 mg mL⁻¹ (average) more of CLT in the Cortázar seedlings, compared to Bárcenas. In the Cortázar and Bárcenas seedlings, the 200 and 500 mg L⁻¹ concentrations were the ones that most reduced the concentration of CLT. These reductions in the concentration of CLT occurred because of the ability of heavy metals, like AsV, to substitute the central Mg ion or limit the synthesis of chlorophyll by inhibiting the activity of the associated enzymes (Yilmaz and Temizgül, 2012). Also, we observed differences ($p \leq 0.01$) in the concentration of chlorophyll a and b, between varieties and treatments. The main difference was the change in the proportion of the type of chlorophyll due to the presence of AsV; in Cortázar, the proportion of chlorophyll a and b was 55 and 45% on average; while in Bárcenas, it was of 65 and 35% on average (Table 2). Our results agree with the reduction of the synthesis of chlorophyll b reported by Hu *et al.*, (2014) in seedlings of *Triticum aestivum*.

CONCLUSIONS

The seedlings showed different responses to concentrations of arsenate and between the Cortázar and Bárcenas wheat varieties.

Bárcenas produced more vigorous seedlings, with higher antioxidant activity, proline content, and phenolic compounds in elevated concentrations of arsenate, which indicates a greater degree of tolerance to arsenic.

—End of the English version—



Cuadro 2. Variables bioquímicas y componentes antioxidantes de trigo bajo cinco concentraciones de arseniato.

Table 2. Biochemical variables and antioxidant components of wheat under five concentrations of arsenate.

| Var | C0 | C100 | C200 | C500 | C700 | B0 | B100 | B200 | B500 | B700 |
|------|---------|----------|---------|----------|---------|--------|---------|---------|--------|----------|
| CF | 0.25 bc | 0.35 a | 0.39 a | 0.31 abc | 0.33 ab | 0.25 b | 0.23 c | 0.38 a | 0.37 a | 0.32 abc |
| DPPH | 11.1 b | 8.1 bc | 6.3 c | 21.0 a | 21.8 a | 6.8 c | 5.0 c | 5.9 c | 19.8 a | 19.4 a |
| ABTS | 51.2 bc | 49.2 bcd | 69.3 a | 21.5 ef | 57.9 b | 40.7 d | 23.8 ef | 47.3 cd | 15.6 f | 30.6 e |
| CLT | 15.1 a | 14.6 b | 12.8 d | 14.2 bc | 13.8 c | 12.0 e | 10.5 g | 11.3 f | 4.6 i | 9.9 h |
| CLA | 7.8 b | 8.7 a | 7.5 bcd | 7.6 bc | 8.8 a | 7.4 cd | 7.3 d | 7.4 d | 3.2 f | 5.6 e |
| CLB | 7.4 a | 5.9 c | 5.3 d | 6.6 b | 5.1d | 4.6 e | 3.2 h | 3.9 g | 1.5 i | 4.3 f |

Variable (Var), Cortázar (C), Bárcenas (B), concentraciones de arseniato (0, 100, 200, 500 y 700 mg L⁻¹), compuestos fenólicos (CF, mg mL⁻¹ de ácido gálico), actividad antioxidante por el radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, %), actividad antioxidante por el radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, %), clorofila total, a y b (CLT, CLA, CLB, mg mL⁻¹). Los valores con diferente letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey (p≤0.05)). ❖ Variable (Var), Cortázar (C), Bárcenas (B), arsenate concentrations (0, 100, 200, 500, and 700 mg L⁻¹), phenolic compounds (CF, mg mL⁻¹ of gallic acid), antioxidant activity by the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, %) radical, antioxidant activity by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, %) radical, total, a, and b chlorophyll (CLT, CLA, CLB, mg mL⁻¹). Values with different letter in a row are statistically different (Tukey (p≤0.05)).

CONCLUSIONES

Las plántulas presentaron respuestas diferentes a las concentraciones de arseniato y entre las variedades de trigo Cortázar y Bárcenas.

Bárcenas produjo plántulas más vigorosas, con más actividad antioxidante, contenido de prolina y compuestos fenólicos en concentraciones altas de arseniato, lo cual indica un mayor grado de tolerancia al arsénico.

AGRADECIMIENTOS

A la SEP por su constante apoyo a la generación y aplicación innovadora de conocimientos a través del PRODEP en sus diferentes vertientes.

LITERATURA CITADA

- Awad, M. A., A. D. Al-qurashi, and S. A. Mohamed. 2011. Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. *Sci. Hort.* 129: 688-693.
- Akinci I. E., and S. Akinci. 2010. Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 9: 4589-4594.
- Bailly C., H. El-Maarouf-Bouteau, and F. Corbineau. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331: 806-814.
- Bates L. S., R. P. Waldren, and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Brand-Williams W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30.
- Bundsuh J., M. I. Litter, F. Parvez, G. Román-Ross, H. B. Nicolli, J. Jiin-Shuh, L. Chen-Wuing, D. López, M. A. Armienta, L. R. Guimaraes G., A. Gomez C., L. Cornejo, L. Cumbal, and R. Toujaguez. 2012. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.* 429: 2-35.
- Cervilla L. M., B. Blasco, J. J. Rios, M. A. Rosales, E. Sánchez-Rodríguez, M. M. Rubio-Wilhelmi, L. Romero, and J. M. Ruiz. 2012. Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *J. Bot.* 2012: 1-17.
- Chu C. J., J. Weiner, F. T. Maestre, Y. S. Wang, C. Morris, S. Xiao, J. L. Yuan, G. Z. Du, and G. Wang. 2010. Effects of positive interactions, size symmetry of competition and abiotic stress on self-thinning in simulated plant populations. *Ann. Bot.* 106: 647-652.
- Chun-Xi L., F. Shu-Li, S. Yun, J. Li-Na, L. Xu-Yang, and H. Xiao. 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *J. Environ. Sci.* 19: 725-732.
- Cozzolino V., M. Pigna, V. Di Meo, A. G. Caporale, and A. Violante. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth of *Lactuca sativa* L. and arsenic and phosphorus availability in an arsenic polluted soil under non-sterile conditions. *Appl. Soil Ecol.* 45: 262-268.
- Drzewiecka K., M. Gąsecka, P. Rutkowski, Z. Magdziak, P. Goliński, and M. Mleczeck. 2018. Arsenic forms and their combinations induce differences in phenolic accumulation in *Ulmus laevis* Pall. *J. Plant Physiol.* 220: 34-42.
- Dudek G., A. Strzelewicz, M. Krasowska, A. Rybak, and R. Turczyn. 2014. A spectrophotometric method for plant pigments determination and herbs classification. *Chem. Pap.* 68: 579-583.
- Finnegan P. M., and W. Chen. 2012. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Fronti. Physiol.* 3: 1-18.

- Fu F., and Q. Wang. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J. Environ. Manage. Ment.* 92: 407-418.
- Garg N., and Singla P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ. Chem. Lett.* 9: 303-321.
- Gill S. S., and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Gunduz O., C. Simsek, and A. Hasozbek. 2010. Arsenic pollution in the groundwater of Simav Plain, Turkey: Its impact on water quality and human health. *Water Air Soil Pollut.* 205: 43.
- Hasanuzzaman M., M. A. Hossain, J. A. Teixeira da S., and M. Fujita. 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. *In: Venkateswarlu, B., A. K. Shanker, C. Shanker, and M. Maheswari (eds). Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies.* Springer Netherlands. pp: 261-315.
- Hasanuzzaman M., and M. Fujita. 2013. Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. *Ecotoxicology.* 22: 584-596.
- Hu X., J. Kang, K. Lu, R. Zhou, L. Mu, and Q. Zhou. 2014. Graphene oxide amplifies the phytotoxicity of arsenic in wheat. *Sci. Rep.* 4: 6122.
- Jomova K., Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. J. Rhodes, and M. Valko. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* 31: 95-107.
- Kranner I., and L. Colville. 2011. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ. Exper. Bot.* 72: 93-105.
- Kuskoski E. M., A. García A., A. M. Troncoso G., J. Mancini-Filho, y R. Fett. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci. Technol. (Campinas).* 25: 726-732.
- Li C. X., S. Feng L., Y. Shao, L. Jiang N., X. Lu Y., and X. Hou L. 2007. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *J. Environ. Sci.* 19: 725-732.
- Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
- Lichtenthaler H. K., and C. Buschmann. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *In: Wrolstad, R. E., T. E. Acree, H. An, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, and P. Sporns (eds). Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* John Wiley and Sons. New York, USA. F4: 3.1-3.8.
- Liu Q., C. Zheng, C. X. Hu, Q. Tan, X. C. Sun, and J. J. Su. 2012. Effects of high concentrations of soil arsenic on the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and rape (*Brassica napus*). *Plant Soil Environ.* 58: 22-27.
- Lefèvre I., G. Marchal, E. Corréal, A. Zanuzzi, and S. Lutts. 2009. Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regul.* 59: 1-11.
- Mahdih S., S. M. Ghaderian, and N. Karimi. 2013. Effect of arsenic on germination, photosynthesis and growth parameters of two winter wheat varieties in Iran. *J. Plant Nutr.* 36: 651-664.
- Manschadi A. A., G. L. Hammer, J. T. Christopher, and P. de Voil. 2008. Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil.* 303: 115-129.
- Martínez P., and M. García. 2007. Distribución de iones mayores y metales en el agua subterránea de la subcuenca del Río Turbio, estados de Guanajuato y Jalisco. *Rev. Geociencia.* 1: 37-54.
- Martínez-Cruz O., and O. Paredes-López. 2014. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1346: 43-48.
- Mejía J. A., R. Rodríguez, M. A. Armienta, E. Mata, and A. Fiorucci. 2007. Acuífero vulnerabilidad zoning, an indicator of atmospheric pollutants input? Vanadium in the Salamanca acuífero, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* 185: 95-100.
- Mishra S., and R. S. Dubey. 2006. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *J. Plant Physiol.* 163: 927-936.
- Mohamed H. I., H. H. Latif, and R. S. 2016. Influence of nitric oxide application on some biochemical aspects, endogenous hormones, minerals and phenolic compounds of *Vicia faba* plant grown under arsenic stress. *Gesunde Pflanzen.* 68: 99-107.
- Møller I. M., P. E. Jensen, and A. Hansson. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459-481.
- Mondal D., M. Banerjee, M. Kundu, N. Banerjee, U. Bhattacharya, A. K. Giri, B. Ganguli, S. S. Roy, and D. A. Polya. 2010. Comparison of drinking water, raw rice and cooking of rice as arsenic exposure routes in three contrasting areas of West Bengal, India. *Environ. Geochem. Health.* 32: 463-477.
- Nagajyoti P. C., K. D. Lee, and T. V. M. Sreekanth. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8: 199-216.
- O'Shea B., J. Jankowski, and J. Sammut. 2007. The source of naturally occurring arsenic in a coastal sand aquifer of eastern Australia. *Sci. Total Environ.* 379: 151-166.
- Pavlík M., D. Pavlíková, L. Staszková, M. Neuberger, R. Kaliszová, J. Száková, and P. Lustoš. 2010. The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 1309-1313.
- Quanji L., H. Chengxiao, T. Qiling, S. Xuecheng, S. Jingjun, and L. Yuexiang. 2008. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. *J. Environ. Sci.* 20: 326-331.
- Rodríguez R., A. Armienta, P. Morales, T. Silva, y H. Hernández. 2006. Evaluación de Vulnerabilidad Acuífera del valle de Irapuato Gto. Junta de Agua Potable y Alcantarillado del Municipio de Irapuato. Reporte Técnico II. 90 p.
- Sánchez-Viveros G., R. Ferrera-Cerrato, and A. Alarcón. 2011. Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents, and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. *Water Air Soil Pollut.* 217: 455-462.
- SEDESOL. 1989. NOM-CE-CCA-001/89. Criterios Ecológicos de Calidad del Aguas. Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología. México.
- SIAP. 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México.

- SNICS. 2017. Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. 9: 5. México.
- Solís-Moya E., A. Salazar-Zazueta, y J. Narro-Sánchez. 1996. *Cortázar S94*: Nueva Variedad de Trigo harinero para el Bajío. Folleto Técnico Número 2. INIFAP-SAGARPA. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3702>. México.
- Solís-Moya E., A. J. Salazar-Zazueta, J. Huerta-Espino, H. E. Villaseñor-Mir, E. Espitia-Rangel, A. Ramírez-Ramírez. 2003. *Bárceñas S2002*: Nueva Variedad de Trigo harinero para el Bajío. Folleto Técnico Número 1. INIFAP-SAGARPA. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3740>. México.
- Solís-Moya E., H. E. Villaseñor-Mir, A. Ramírez-Ramírez, M. F. Rodríguez-García, E. Espinosa-Trujillo, y R. H. Santa-Rosa. 2009. Respuesta de variedades de trigo al riego restringido en el Bajío. Desplegable Técnica Número 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- SSA. 1994. Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994: Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe de someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>
- Szabados L., and A. Savoure. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: 89-97.
- Thaipong K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, and D. H. Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19: 669-675.
- Ventura-Lima J., M. R. Bogo, and J. M. Monserrat. 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 211-218.
- Verbruggen N., C. Hermans, and H. Schat. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 364-372.
- Williams P. N., M. R. Islam, E. E. Adomako, A. Raab, S. A. Hossain, Y. G. Zhu, J. Feldmann, and A. A. Meharg. 2006. Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters. *Environ. Sci. Technol.* 40: 4903-4908.
- Woźniak A., K. Drzewiecka, J. Kęsy, L. Marczak, D. Narożna, M. Grobela, R. Motala, J. Bocianowski, and I. Morkunas. 2017. The influence of lead on generation of signalling molecules and accumulation of flavonoids in pea seedlings in response to pea aphid infestation. *Molecules.* 22: 1404.
- Yilmaz D. D., and A. Temizgül, . 2012. Assessment of arsenic and selenium concentration with chlorophyll contents of sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) and wheat (*Triticum aestivum*) exposed to municipal sewage sludge doses. *Water Air Soil Pollut.* 223: 3057-3066.
- Zabihi-e-Mahmoodabad R., S. Jamaati-e-Somarin, M. Khayatnezhad, and R. Gholamin. 2011. The study of effect salinity stress on germination and seedling growth in five different genotypes of wheat. *Adv. Environ. Biol.* 5: 177-179.
- Zengin F. 2015. Effects of exogenous salicylic acid on growth characteristics and biochemical content of wheat seeds under arsenic stress. *J. Environ. Biol.* 36: 249.
- Zhang W. D., D. S. Liu, J. C. Tian, and F. L. He. 2009. Toxicity and accumulation of arsenic in wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties of China. *Phyton-Int. J. Exp. Bot.* 78:147-154.
- Zhao F. J., J. F. Ma, A. A. Meharg, and S. P. McGrath. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol.* 181: 777-794.

