



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y ANALÍTICA

**“DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE GLUTATION POR
ELECTROFORESIS CAPILAR EN PLANTAS BAJO
ESTRÉS POR COBRE”**

Memoria para Optar al Título de Químico

Profesor Patrocinante:
Profesor Jorge Mendoza C.

Director de Tesis:
Profesor Jorge Mendoza C.
Co- Director:
Profesora Inés Ahumada T.

CECILIA CATALINA GONZÁLEZ ROA

Santiago - Chile

2005

A mis padres por su infinito
amor y apoyo.

Esta Memoria fue realizada gracias al financiamiento al proyecto “Memorias 2004”.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

INDICE

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA. | ii |
| RESUMEN. | vi |
| ABSTRACT. | viii |
| ABREVIACIONES. | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1. Objetivos Generales. | 9 |
| 2.2. Objetivos Específicos. | 9 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 3.1 Preparación de Electrolito de Corrida para Electroforesis. | 10 |
| 3.2 Preparación de Estándares de GSH y GSSG. | 10 |
| 3.3 Preparación de Estándares de Calcio, Magnesio y Cobre. | 10 |
| 3.4 Preparación de Estándares de Potasio y Fósforo. | 11 |
| 3.5 Curvas de Calibración y Límites de Detección para GSH y GSSG. ... | 11 |
| 3.6 Condiciones de Trabajo para Electroforesis Capilar de Zona. | 12 |
| 3.7 Experimentos con Plantas. | 12 |
| 3.8 Ensayo con Cobre. | 12 |
| 3.9 Recolección de la Muestra. | 13 |
| 3.10 Preparación de la Muestra. | 14 |
| 3.11 Determinación de Metales Pesados. | 14 |
| 3.12 Análisis Estadístico. | 15 |
| 4. RESULTADOS. | |
| 4.1 Composición y Concentración del Electrolito de Corrida. | 16 |
| 4.2 Largo del Capilar. | 17 |
| 4.3 Polaridad de la Fuente y Voltaje Aplicado. | 17 |
| 4.4 pH del Electrolito. | 19 |
| 4.5 Efecto de la Fuerza Iónica. | 20 |
| 4.6 Efecto del Tiempo de Toma de Muestra. | 20 |
| 4.7 Curvas de Estándares y Límites de Detección para GSH y GSSG. . | 22 |

| | |
|--|----|
| 4.8 Repetitividad de las Mediciones. | 22 |
| 4.9 Porcentaje de Recuperación para GSH y GSSG. | 23 |
| 4.10 Protocolo de Tratamiento de Muestra para Análisis. | 24 |
| 4.11 Rendimiento del Material Vegetal. | 26 |
| 4.12 Absorción de Cobre y Macronutrientes. | 27 |
| 4.13 Cuantificación de Glutattión Reducido (GSH) y Oxidado (GSSG) en Material Vegetal. | 32 |
| 5. DISCUSIÓN. | |
| 5.1 Tratamiento de la Muestra. | 35 |
| 5.2 Niveles de Cobre y Macronutrientes. | 35 |
| 5.3 Niveles de GSH y GSSG. | 36 |
| 6. CONCLUSIONES. | 39 |
| 7. REFERENCIAS. | 41 |
| 8. ANEXOS. | 46 |

RESUMEN

El objetivo de éste estudio fue optimizar un método por Electroforesis Capilar de Zona para la determinación rápida de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en la matriz de tejido vegetal de hojas y raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Se compararon dos tratamientos de muestra diferentes para el aislamiento de los analitos de la matriz vegetal, se determinó los niveles de GSH y GSSG en plantas sometidas a estrés por cobre en dos periodos de tiempo (48 horas y 28 días) y se evaluó el efecto de cobre sobre la biomasa y los niveles de macronutrientes presentes en la planta.

De los resultados obtenidos se concluye que:

La optimización de los parámetros instrumentales, tales como largo de capilar, voltaje aplicado y polaridad de la fuente de poder, así como la optimización de los parámetros relacionados con el electrolito de corrida, tales como composición, concentración, pH y fuerza iónica permiten la separación de ambos analitos en un tiempo inferior a los tres minutos. Las condiciones óptimas fueron: polaridad de la fuente positiva, capilar de 40 cm de largo, voltaje de 20 kV, electrolito borato 300 mM, pH 7,6 y 30 segundos de inyección hidrostática de la muestra.

El método optimizado para la matriz vegetal presenta una muy buena correlación entre área bajo la curva y concentración de GSH y GSSG, con coeficientes de correlación de 0,9995 y 0,9994, respectivamente. Los límites de detección fueron 2,75 y 1,68 $\mu\text{mol/L}$ para GSH y GSSG y la recuperación del analito en el proceso fue de 105 y 87 %, respectivamente.

En la etapa de tratamiento de la muestra, el uso de un método químico (ácido metafosfórico) es más efectivo que el uso de un método físico (copas de ultrafiltración) para el aislamiento de los analitos desde la matriz proteica. Esta efectividad se reflejo en un menor consumo de tiempo, mayor volumen de muestra obtenido y obtención de una matriz mas limpia.

El tratamiento prolongado de las plantas con cobre se manifiesta en síntomas de toxicidad con una drástica disminución de la biomasa de la parte aérea y raíz, en asociación con un descenso de la concentración de potasio en ambos órganos. Este efecto no se observa en plantas tratadas por un periodo corto de tiempo con el metal.

Los niveles de cobre alcanzados en la parte aérea y raíz correlacionan positivamente con la concentración de cobre aplicada en ambos tratamientos, siendo las concentraciones más altas observadas en la raíz

El cobre aplicado a la planta modifica los niveles de glutatión reducido y oxidado tanto en el tratamiento crónico como en el agudo. El efecto más notorio se manifestó sobre el glutatión reducido contenido en la raíz. Este péptido decrece su concentración a medida que incrementa la concentración de cobre, siendo este efecto independiente de los cambios morfológicos que presenta la raíz y del lapso de tiempo en que el cobre fue aplicado.

Los cambios producidos en los niveles de glutatión reducido y oxidado constituyen un buen indicador de la respuesta temprana al estrés por metal en plantas desarrolladas, expuestas a cobre por un periodo de tiempo corto (horas).

ABSTRACT

DETERMINATION OF GLUTATION SPECIES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN PLANTS UNDER COPPER STRESS.

The purpose of this study was to optimize a zone capillary electrophoresis method for fast determination of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in the plant tissue matrix of shoot and root of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) plants. Two different sample treatments were compared in order to isolate analytes from plant matrix, GSH and GSSG levels were determined in plants subjected to copper stress in two time periods (48 hours and 28 days), and assessment was done of the effect of copper on biomass and on macronutrient levels in the plant.

From the results, it may be concluded that:

Optimization of instrumental parameters such as capillary length, voltage applied, and polarity of the power supply as well as optimization of parameters related to running electrolyte such as composition, concentration, pH, and ionic strength permit the separation of both analytes in less than three minutes. Optimum operating conditions were: positive supply polarity; capillary length, 40 cm; voltage, 20 kV; borate electrolyte, 300 mM; pH, 7.6, and time of hydrostatic sample injection, 30 sec.

The optimized method for the plant matrix shows a very good correlation between area under the curve and GSH and GSSH concentration, with correlation coefficients of 0.9995 and 0.9994, respectively. Detection limits were 2.75 and 1.68 $\mu\text{mol/L}$ for GSH and GSSG and analyte recovery in the process was 105 and 87%, respectively.

During the sample treatment stage, using a chemical method (metaphosphoric acid) is more effective than a physical method (ultrafiltration cups) to isolate analytes from the protein matrix. This effectiveness was shown by shorter working time, greater sample volume obtained, and a cleaner matrix.

Prolonged plant copper treatment becomes evident through toxicity symptoms with a sharp decrease of biomass in shoot and root, associated to a decrease in potassium concentration in both organs. This effect is not observed in plants treated with the metal for a short time.

Copper levels reached by the plant in shoot and root correlate positively with the concentration of copper applied in both treatments, the highest concentrations being observed in the root.

Copper applied to the plant modifies reduced and oxidized glutathione both in the acute and in the chronic treatment. The effect becomes most notorious on reduced glutathione in the root. This peptide concentration decreases as copper concentration increases, regardless of morphological changes in the root and period of copper application.

Changes produced in the levels of reduced and oxidized glutathione constitute a good indicator of an early response to metal stress in developed plants exposed to copper for a short time (hours).

ABREVIACIONES

- GSH:** Glutatión reducido.
GSSG: Glutatión oxidado.
ARN: Ácido Ribonucleico.
ADN: Ácido Desoxiribonucleico.
MPA: Ácido Metafosfórico.
EOF: Flujo Electro Osmótico.
MT: Metalotioneina.

1. INTRODUCCIÓN

El cobre como micro nutriente esencial juega un rol vital en el mantenimiento del metabolismo normal de las plantas, involucrando un amplio rango de procesos bioquímicos y fisiológicos como por ejemplo:

1. Juega un papel importante en algunos procesos fisiológicos como fotosíntesis, respiración, redistribución de carbohidratos, reducción y fijación de Nitrógeno y metabolismo de proteínas de la pared celular.
2. Ayuda a la permeabilidad del agua a los vasos del xilema y controla la relación de agua.
3. Controla la producción de ADN y ARN, su deficiencia inhibe la reproducción de las plantas (reduce la producción de semillas, polen estéril).
4. Está involucrado de manera indirecta en mecanismos de defensa de las plantas a ciertas enfermedades.

Si bien los mecanismos de absorción de cobre no han sido muy definidos, se ha podido identificar dos tipos de absorción, una activa y una pasiva, la que ocurre principalmente cuando se encuentran cantidades tóxicas del metal en solución. En las raíces, el cobre se encuentra complejado, postulándose, sin embargo, que el metal ingresa a las células de manera disociada. El transporte de cobre se realiza a través del xilema y floema, en donde alcanza normalmente concentraciones de hasta 140 μM , observándose una relación directa con la concentración de aminoácidos. El transporte del metal, dependerá de los niveles aportados desde el exterior, encontrándose las mayores concentraciones en los tejidos envejecidos (1). El rango de Cu para un crecimiento normal es usualmente entre 5 a 20 ppm, mientras que por encima de 20 ppm se pueden observar síntomas de toxicidad. A niveles de concentración altos, el cobre inhibe el crecimiento de las plantas e incluso causa su muerte. El exceso de cobre en la planta, induce la formación de especies oxigenadas reactivas, como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (figura 1).

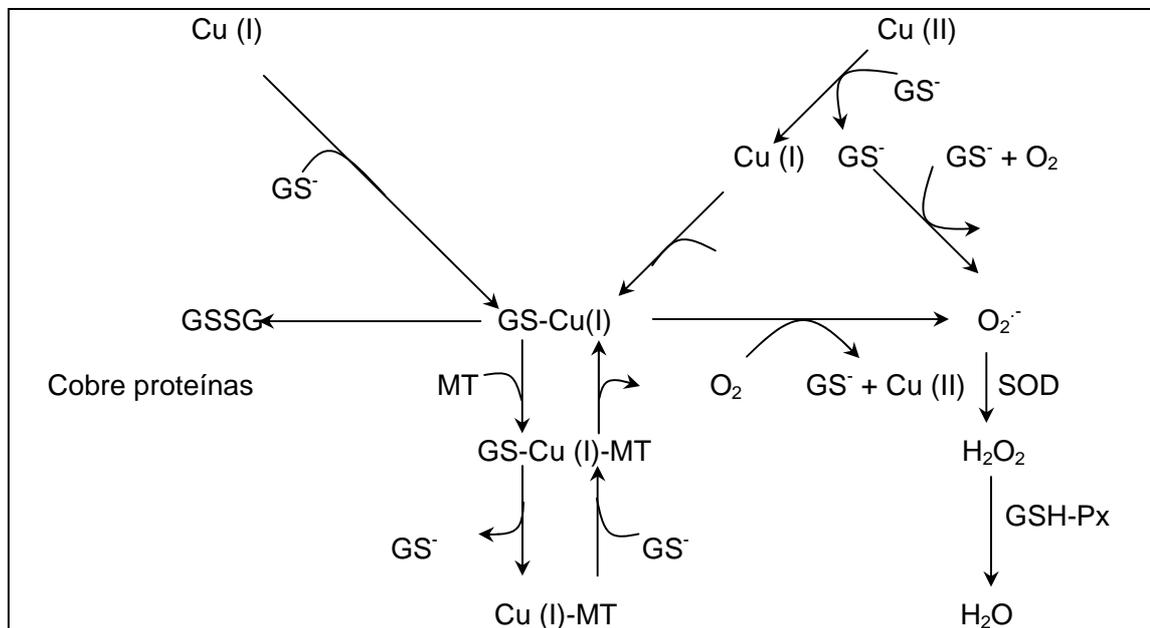


Figura 1: Diagrama del metabolismo celular del cobre. El diagrama representa un mecanismo para la transferencia de cobre desde GSH a MT (metalotioneína). También se presenta el mecanismo celular para remover las especies oxigenadas reactivas, generadas de la oxidación del complejo GS-Cu (I) o del glutatión radical (GS^-).

El efecto tóxico de los metales pesados en las plantas, depende del tiempo y concentración a la que están expuestas. Muchos de estos efectos, están relacionados a la interacción con grupos carboxílicos y tiólicos. Los organismos poseen diversos mecanismos para mantener los niveles de concentración de metal libre, por ejemplo, cambios en la permeabilidad del ión, biotransformación y compartimentación (2,3).

Algunos de los procesos inducidos por el exceso de Cu^{+2} y Cu^+ son:

1. Daño en los tejidos y elongación de las células de la raíz.
2. Alteración en la permeabilidad de la membrana, causando pérdida de iones K^+ y PO_4^{3-} y solutos en la raíz.
3. Peroxidación de lípidos de la membrana de cloroplastos e inhibición del transporte de electrones fotosintéticos.
4. Daño en DNA y consecuentemente inhibición de procesos fotosintéticos.

A nivel nacional, se han realizado estudios en suelos altamente contaminados con cobre (sobre 1000 mg Kg^{-1}) en la zona central (provincias de Santiago y Cachapoal), se determinó que sólo un 0.02% del cobre total se encuentra como forma iónica en la solución del suelo y un 0.04% como formas lábiles potencialmente utilizables por las plantas (4, 5). Estos estudios se realizaron tanto en especies comestibles que poseen distinto grado de sensibilidad frente al cobre tales como tomate, lechuga y cebolla como en especies nativas, determinándose que los niveles de absorción de metal, están determinados por una serie de factores, no sólo por el tiempo de exposición al metal. La fracción de contaminantes biodisponible no es constante en suelos cuyas características fisicoquímicas son distintas, como por ejemplo pH, contenido de materia orgánica, cantidad de carbono disuelto y conductividad del suelo, ya que muchas de estas variables determinan el grado de solubilización de los metales o la capacidad tamponante del suelo. La forma química del cobre que se encuentra en el suelo, la especie de la planta y el tejido estudiado, influyen en una mayor o menor absorción de éste por la planta, es así como el cobre como CuSO_4 (especie de alta solubilidad) al ser absorbido a altas concentraciones por especies sensibles, produce un notable deterioro en las hojas, no así cuando se utilizó CuO (especie de baja solubilidad) (5).

El glutatión ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), una de las especies tiólicas de bajo peso molecular más abundante en los tejidos, participa en múltiples procesos metabólicos, su monómero reducido (GSH), ayuda a desintoxicar de xenobioticos y metales pesados, reduce las proteínas tiólicas, mantiene la membrana celular y desactiva los radicales libres, así como también es asociado a la resistencia del estrés y está involucrado en la regulación redox del ciclo de la célula, pudiendo actuar como buffer. Su dímero oxidado

(GSSG) controla el contenido de metal en las metaloproteínas. El glutatión, participa también en importantes reacciones bioquímicas incluidas en el ADN, síntesis de proteínas y aminoácidos (7, 8). La razón GSH/GSSG en las plantas puede ser perturbada por factores que inducen el estrés, como daño mecánico y contaminación ambiental (9,10). La función más importante del glutatión es la protección en el estrés oxidativo en la reducción del ascorbato en el ciclo del ascorbato-glutatión, este reacciona también de manera no enzimática con el oxígeno singulete y radicales superóxido e hidroxilo. Como componente del ciclo ascorbato-glutatión, está involucrado en el control de la concentración del H_2O_2 (figura 2) en las células (11).

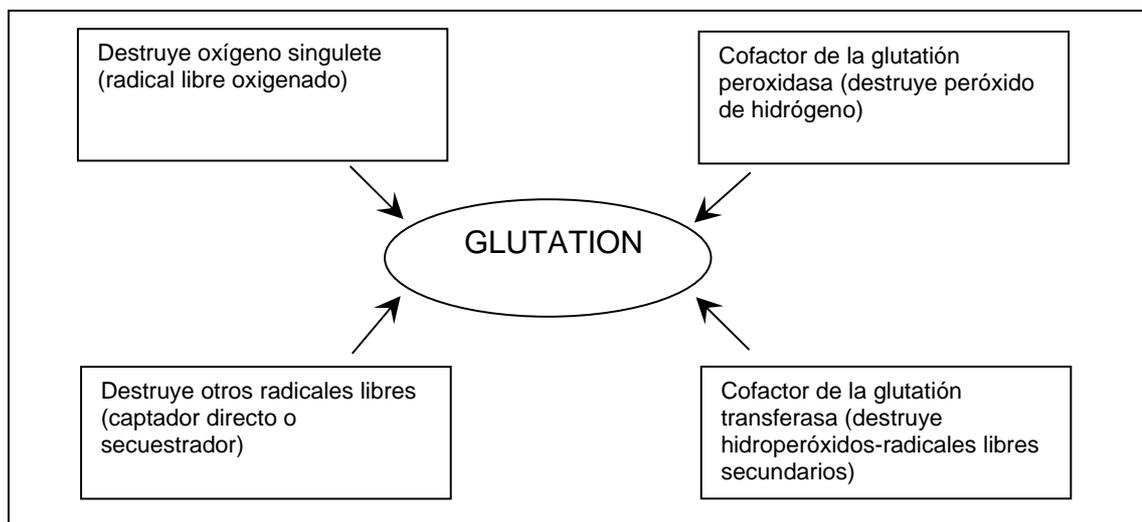


Figura 2: implicancia del glutatión en la protección de las células.

La síntesis del glutatión ocurre en dos etapas, primero se forma glutamylcisteína a partir de cisteína y glutamato a la cual, en una segunda etapa, se le une la glicina, reacción mediada por la enzima glutatión sintetasa, que depende de Mg^{+2} para su actividad, como resultado de este proceso se obtiene γ -L-glutamyl-L-cisteínglicina o glutatión (Figura 3).

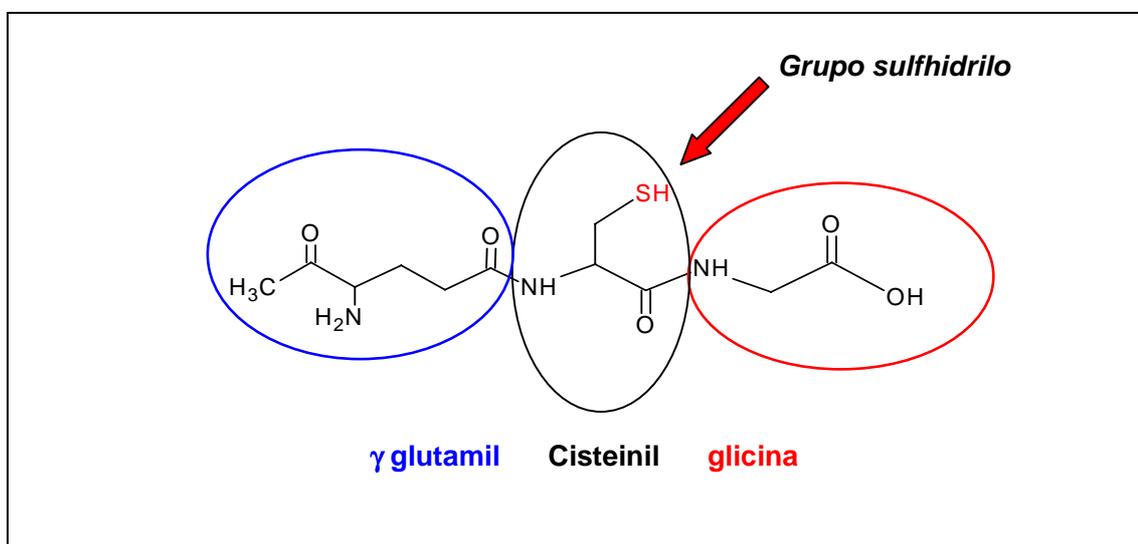


Figura 3: Estructura del glutatión reducido (GSH) y sus principales unidades constituyentes.

El análisis de GSH y GSSG es de continuo interés, por su significancia clínica y biológica. El análisis cualitativo y cuantitativo de glutatión puede proveer información útil, acerca de la respuesta de las plantas a concentraciones elevadas de metales pesados en el ambiente (12). Recientemente se han publicado revisiones exhaustivas y actualizadas de los diferentes métodos para el análisis cuantitativo de las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) de glutatión (13, 14) no definiéndose aun un método de referencia.

La cromatografía HPLC asociada a distintos sistemas de detección, es el método más comúnmente utilizado, siendo limitado por los largos tiempos de análisis (7), en los últimos años se han desarrollado algunos métodos por electroforesis capilar (EC), los cuales permiten determinar ambas formas de glutatión simultáneamente (15, 16).

La electroforesis capilar es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una solución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante, esta técnica se ha aplicado a un conjunto de problemas de separaciones analíticas, como por

ejemplo aniones y cationes inorgánicos, aminoácidos, fármacos, péptidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos entre otras numerosas especies (9, 12, 17). La EC tiene algunas ventajas con respecto a los métodos tradicionales, entre estas podemos nombrar, buena reproducibilidad, simplicidad del procedimiento, tiempo de análisis corto, volumen de inyección pequeño y un costo de análisis bajo (17). Con respecto al glutatión, algunos autores han descrito principalmente la determinación de la especie reducida (18, 19) o de ambos analitos, GSH y GSSG, en tejidos o fluidos de origen animal (15, 20, 21), siendo escasos los estudios en muestras de tejido vegetal (9, 22).

El fundamento de la electroforesis es la migración de partículas o moléculas cargadas eléctricamente en un medio líquido, usualmente acuoso, a través de una diferencia de potencial. En cada extremo del capilar hay un contenedor con el mismo buffer acuoso, llamado electrolito, y en cada uno va colocado un electrodo. Estos electrodos se conectan a una fuente de poder, que permite la diferencia de potencial, que hará migrar las partículas (17). Para iones del mismo tamaño la fuerza que los impulsa, será mayor en el de mayor carga y tendrá una velocidad de migración más rápida. Para iones que presentan igual carga la fuerza de retardo será más pequeña, en el ión de menor tamaño y tendrá una velocidad de migración mayor.

La velocidad de migración de un ión está dada por la siguiente fórmula: $v = \mu_e \cdot E$ donde μ_e es la movilidad electroforética en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ y E es la intensidad del campo eléctrico aplicado en V cm^{-1} . Ahora bien, el campo eléctrico se determina por la magnitud del potencial aplicado en voltios y la longitud L sobre la que se aplica (largo del capilar), esto se expresa en la siguiente fórmula: $v = \mu_e \cdot \frac{V}{L}$. Para obtener migraciones rápidas es necesario aplicar potenciales elevados o acortar el largo del capilar.

Cuando se aplica un potencial a través de un capilar que contiene un electrolito, se produce el movimiento de las moléculas del electrolito, generando un flujo que recibe el nombre de flujo electrosmótico (EOF). En condiciones normales la dirección del flujo va desde el ánodo, que se encuentra cargado positivamente, hacia el cátodo, cargado negativamente (Figura 4).

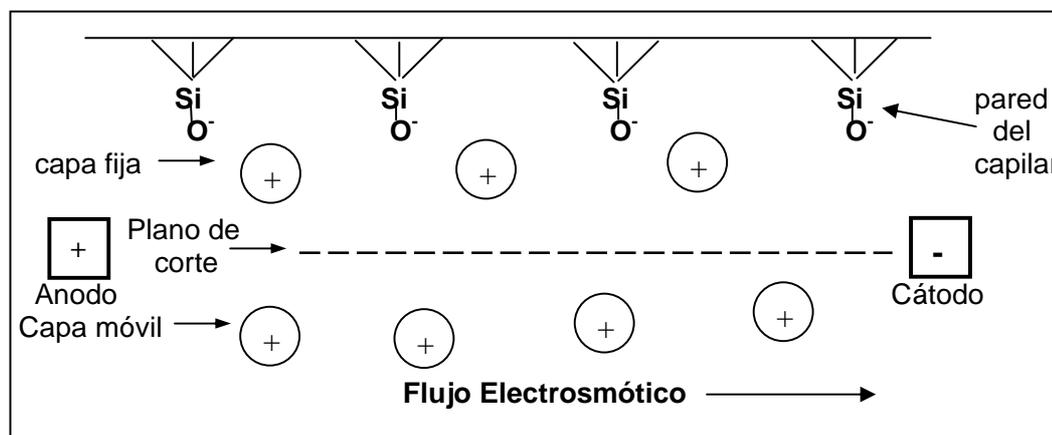


Figura 4: Representación del flujo electrosmótico en un capilar.

El EOF tiene una cierta velocidad (v_{EOF}) que está dada por: $v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{4\pi\eta}$ donde ϵ es la constante dieléctrica del electrolito, ζ es el potencial zeta, E es el campo eléctrico aplicado en V/cm y η es la viscosidad del buffer.

El potencial Z está dado por: $\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon}$, donde δ es el espesor de la doble capa difusa, e es a carga por unidad de área de superficie y ϵ es la constante dieléctrica del electrolito. El espesor de la doble capa difusa es inversamente proporcional a la concentración del electrolito. El pH del electrolito, también posee influencia sobre el potencial Z. Para el capilar de sílice, un aumento en el pH conlleva un aumento en el flujo electrosmótico, ya que un mayor pH produce un aumento en la disociación de las moléculas de SiOH a SiO⁻ en la pared interna del capilar y el potencial Z es proporcional a la superficie cargada en la pared interna del capilar.

Las moléculas cargadas son separadas debido a una diferencia en la movilidad electroforética de estas, por lo que cada soluto migra a diferentes tiempos hacia el electrodo opuesto y la migración se realiza a través de una zona de migración. La movilidad electrosmótica μ_{EOF} esta dada por $\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta}$, en esta ecuación se aprecia que la movilidad depende solamente de las características del electrolito,

como son la constante dieléctrica, viscosidad, pH y concentración y es independiente del campo eléctrico aplicado.

Para el análisis de glutatión por EC, el electrolito de corrida más usado ha sido borato, en cambio, fosfato (9, 10) y acetato (15), han sido utilizados con menor frecuencia. En algunos casos, los electrolitos han sido modificados con el fin de optimizar la separación y los tiempos de migración (22). Usualmente como método de detección, se ha recurrido a la detección fotométrica, sin embargo otros sistemas de detección como fluorescencia inducida por láser (18), espectroscopia de masas, o detección electroquímica (19, 23) se han utilizado de manera exitosa para el mejoramiento de la sensibilidad del método.

La preparación de la muestra para el análisis de glutatión por EC, se hace de forma similar a la utilizada en los métodos convencionales (HPLC). Básicamente se requiere separar los péptidos pequeños (GSH y GSSG) de las proteínas en general y particularmente de las enzimas que utilizan estos péptidos como sustrato o bien que los degradan. Para ello se aplican métodos químicos, los cuales generalmente precipitan las proteínas (24) o métodos físicos que separan las proteínas por peso molecular (ultrafiltración). Como métodos químicos se usan ácidos como tricloroacético (TCA), metafosfórico (MPA), fosfórico, perclórico o sulfosalicílico (21, 25). Como método físico se ha descrito recientemente el uso de membranas microcon-10, con el fin de no alterar el equilibrio entre las formas reducida y oxidada de Glutatión (25), método que ha sido generalmente utilizado para retirar las proteínas que interfieren en el análisis de ácidos nucleicos. Estos autores utilizaron este método de ultrafiltración con el fin de minimizar la oxidación de GSH que ocurriría si las proteínas son eliminadas por precipitación con ácidos.

Por poseer el glutatión, tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada (GSSG), una gran implicancia e importancia en una serie de procesos en las células ya sea de organismos animales como vegetales, se hace de suma importancia contar con métodos de análisis confiables y rápidos, fin que constituye el objetivo principal de este trabajo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

1. Optimizar un método por Electroforesis Capilar de Zona para la determinación rápida de glutatión reducido y oxidado en la matriz de tejido vegetal
2. Evaluar los niveles de GSH y GSSG en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) sometidas a estrés por cobre.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Optimizar los principales parámetros instrumentales que intervienen en la determinación de glutatión oxidado y reducido
2. Optimizar los principales parámetros que dependen del electrolito de corrida
3. Comparar dos tratamientos de muestra diferentes para el aislamiento de los péptidos en la matriz vegetal.
4. Evaluar el efecto de cobre sobre los niveles de glutatión en la planta sometida a estrés por metal en un periodo de tiempo corto (horas) y largo (días).
5. Evaluar el efecto de cobre sobre la biomasa y los niveles de macronutrientes presentes en las plantas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación del electrolito de corrida para electroforesis capilar.

Se probaron diferentes soluciones de electrolito de corrida, todas compuestas de borato en distintas concentraciones. Se diluyó un volumen de solución stock 0,5 M de borato de sodio y luego se ajustó el pH con hidróxido de sodio 0,5 M, utilizando un electrodo combinado y agitador magnético, finalmente se aforó a 100 mL con agua milliQ y se filtró por membrana de nitrato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm . El electrolito Borato 300 mM, se probó a pH 7,6; 7,8; 8,0 y 8,2. Otros electrolitos probados fueron borato 100 mM + 25 mM tris, borato 200 mM + 25 mM tris.

3.2. Preparación de estándares de GSH y GSSG.

Ambos estándares se prepararon a una concentración de 500 μM , para ello se pesó 6,12 y 3,07 mg de GSSG y GSH (Sigma), respectivamente, en una semimicrobalanza, llevándose a un volumen final de 20 mL con agua milliQ. También se prepararon estándares de GSH y GSSG disueltos en MPA al 2%. Las soluciones de estándar se guardaron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales de 1,5 mL.

3.3. Preparación de estándares de calcio, magnesio y cobre.

La determinación de calcio, magnesio y cobre fue llevada a cabo por EAA utilizando un espectrofotómetro U. V. visible UNICAM UV2.

Para la cuantificación de cobre, calcio y magnesio en la parte aérea y raíces de las plantas en estudio se prepararon una serie de estándares, cada curva se preparó con un total de cinco puntos, las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: curva de calcio: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 3,0 y 5,0 ppm; curva de Magnesio: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,3 y 0,5 ppm, cada uno en 400 ppm de estroncio; curva de cobre: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 y 5,0 ppm.

3.4. Preparación de estándares de fósforo y potasio.

Para la cuantificación de fósforo se utilizó el método del azul de molibdeno, usando ácido ascórbico como reductor. El fósforo en el extracto se analizó por colorimetría (26). Para la medición se utilizó un espectrofotómetro U.V. visible UNICAM UV2 a una longitud de onda de 880 nm. La curva de calibración usada fue: 0,1; 0,49; 0,98; 1,96 y 2,93 ppm de fósforo. Para el análisis de potasio se preparó una curva de calibración de cinco puntos cuyas concentraciones fueron: 1,2; 2,0; 4,0; 6,0 y 10 ppm. La determinación de potasio se hizo en un fotómetro de llama marca Jenway PFP 7.

3.5. Curvas de calibración y límites de detección para GSH y GSSG.

Para las curvas de calibración se utilizaron soluciones estándares de 500 μM de GSH y GSSG en MPA 2%. Cada punto se preparó mezclando la cantidad necesaria de estándar de GSH o GSSG, agregándole 800 μl de electrolito y una cantidad variable de MPA 2% para completar 1000 μL . Se consideraron 6 puntos de concentración 5, 7, 10, 20, 40 y 80 μM de cada analito.

Se consideró el límite de detección según J.C. Miller y J.N. Miller (27) como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, Y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco S_B .

$$Y_{est} = Y_B + 3S_B$$

Donde Y_{Est} es el valor estimado de Y en el límite de detección.

Un supuesto estadístico fundamental del método de los mínimos cuadrados sin ponderar es que cada punto en la representación gráfica, incluido el que representa al blanco o ruido de fondo, tiene una variación distribuida normalmente con una desviación estándar estimada por $S_{Y/X}$, por lo tanto es apropiado utilizar $S_{Y/X}$ en lugar de S_B en la estimación del límite de detección.

$$A = Y_B$$

$$DE = S_{y/x} = S_B$$

Luego de obtenida cada curva y de acuerdo a la ecuación de regresión, se utilizaron los valores de intercepto (A), pendiente (B) y desviación estándar (DE) para

el cálculo de los respectivos límites de detección. El cálculo se hizo de acuerdo a las siguientes fórmulas.

$$Y_{Est} = A + 3DE \qquad Y_{Est} = BX + A$$

Donde X corresponde al límite de detección.

3.6. Condiciones de trabajo para la electroforesis capilar de zona.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar marca Waters Quanta 4000E con detección fotométrica directa a 185 nm, mediante una lámpara de mercurio. Se trabajó con fuente de poder positiva, variando los voltajes entre 10 y 30 kV. Se utilizó inyección hidrostática considerándose tiempos de toma de muestra de 30, 45 60 segundos. Y las dimensiones de los capilares utilizados fueron de 40 cm x 75 μm de diámetro interno (d.i.) y 60 cm x 75 μm d.i., los que fueron previamente acondicionados. El acondicionamiento consistió en tres etapas: 2 minutos con KOH 2M, 10 minutos KOH 0,5 M y 20 minutos con H₂O milliQ. La temperatura de trabajo fue de 25 °C.

3.7. Experimentos con plantas.

Se obtuvieron plántulas de tomate (*lycopersicon esculentum* L.) a partir de semillas germinadas en arena. Tanto la germinación como los estudios en solución nutritiva, se realizaron en una cámara climática bajo las siguientes condiciones controladas de luz, humedad y temperatura: 1 hora a 21 °C, 280 $\mu\text{einstein/m}^2\text{s}$; 10 horas a 18 °C, 0 $\mu\text{einstein/m}^2\text{s}$; 1 hora a 21 °C, 280 $\mu\text{einstein/m}^2\text{s}$; 12 horas 24 °C, 480 $\mu\text{einstein/m}^2\text{s}$. Se mantuvo una humedad relativa constante de 50%. Luego de 10 días de crecimiento de las plántulas en los almácigos, se eligieron aquellas de tamaño y aspecto similar y se trasladaron a recipientes plásticos que contenían 1L de solución nutritiva.

3.8. Ensayos con cobre.

Se preparó un stock de soluciones de los distintos componentes necesarios para el crecimiento de la planta, con el fin de suplir los requerimientos nutritivos de esta. De cada una de las soluciones se tomó una alícuota de 10ml para la preparación de 5L de solución nutritiva. La composición final de la solución nutritiva fue la siguiente: N 7,4

(8:1 NO_3^- : NH_4^+), K 1,2; Ca 2,2; Cl 0,06; Mg 0,3; Na 0,06 en mM. Fe (como Fe-EDTA) 19,5; B 15, Mn 5,4; P 20; Zn 1,4; Mo 0,5; Cu 0,4 en μM . Se ajustó a pH 6,0 con NaOH 0,1M utilizando un electrodo combinado y agitador magnético.

Para el ensayo en solución nutritiva, se utilizaron recipientes plásticos de 1L con una tapa de poliestireno, los que fueron cubiertos con plástico negro. A la tapa se le hicieron tres orificios dispuestos en triángulo, en los cuales se pusieron las plántulas soportadas en poliestireno. En el centro de la tapa se dejó un orificio por el que se introdujo una manguera para airear la solución.

Se establecieron dos tratamientos cada uno dividido en tres sub tratamientos. El tratamiento crónico con concentraciones de cobre de 0, 3 y 12 μM y el tratamiento agudo con concentraciones de 0, 9 y 36 μM , correspondientes a un control (sin adición de Cu), nivel bajo de Cu y nivel alto de Cu, respectivamente. Las plantas se cultivaron en la solución nutritiva con Cu por 28 días en el tratamiento crónico. En cambio para el tratamiento agudo las plantas se cultivaron 26 días en solución nutritiva sin Cu y finalmente 48 horas con solución nutritiva que contenía Cu. Para cada nivel de cobre se hicieron cuatro repeticiones, cada una con seis plantas y el cambio de solución nutritiva se efectuó cada dos días.

3.9 Recolección de la muestra.

Para el análisis por electroforesis capilar, se recolectó una muestra de aproximadamente 1g de parte aérea y raíz de cada recipiente. Las muestras fueron almacenadas en viales criogénicos y mantenidas en un termo con nitrógeno líquido (-18 °C), hasta su posterior tratamiento para análisis.

Las plantas en las macetas se retiraron de las soluciones, las raíces se lavaron con agua destilada y se separaron de la parte aérea, ambas partes fueron pesadas y puestas a secar en estufa por 48 horas a 60 °C. Posteriormente, se volvieron a pesar, se molieron y se almacenaron en frascos de polietileno, para el posterior análisis de cobre y macronutrientes.

3.10. Preparación de la muestra.

La muestra almacenada en los viales criogénicos, se trasladó a un mortero, previamente enfriado con nitrógeno líquido, luego se le agregó una cantidad de nitrógeno líquido para reducir la temperatura de la muestra, una vez evaporado el nitrógeno, se procedió a triturar la muestra, agregando posteriormente 2 mL de MPA 2%. El extracto obtenido se centrifugó a 10000 rpm por 3 minutos a 5 °C en una centrifuga con control de temperatura. El líquido sobrenadante se extrajo con jeringa y fue filtrado por membrana de nitrato de celulosa de 0,45 µm. Las soluciones así obtenidas se guardaron inmediatamente a -20 °C.

Para el método por ultrafiltración, la maceración de la muestra se hizo agregando a la muestra previamente enfriada con nitrógeno líquido, 2 mL de agua. El extracto obtenido se centrifugó a 10000 rpm por 3 minutos a 5 °C, luego el líquido sobrenadante se extrajo con jeringa y se traspasó a las copas de ultra filtración, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. La solución obtenida se guardó inmediatamente a -20 °C

3.11. Determinación de metales pesados.

La cuantificación de los metales absorbidos por la planta, desde la solución nutritiva, se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica (E.A.A.) con llama en un Espectrófotometro de Absorción Atómica Perkin Elmer 3110. La cuantificación se hizo previa digestión ácida del material vegetal en un horno de microondas Milestone mls 1200 Mega. Se pesó alrededor de 300 mg de parte aérea y alrededor de 100 mg de raíces. Se les agregó 4 mL HNO₃ y 2 mL de H₂O₂. Se digirieron utilizando un programa de cinco etapas: etapa 1: 1 min. a 125 W, etapa 2: 2 min. a 0 W, etapa 3: 5 min. a 250 W, etapa 4: 6 min a 400 W, etapa 5: 6 min. a 600 W. Los extractos se llevaron a un volumen final de 20 mL, se filtró la solución y se almacenó en frascos de polietileno hasta su análisis.

3.12. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía y los valores de las medias de los distintos tratamientos fueron comparados según el test de Duncan con una diferencia mínima significativa (DMS) a nivel de un 5%. El análisis se llevó a cabo mediante el software estadístico Statgraphics versión 4.0 para windows.

4. RESULTADOS

La evaluación de los principales factores que influyen en el análisis de GSH y GSSG por electroforesis capilar, se hicieron con soluciones estándar de ambos analitos, preparados en agua o bien en la matriz MPA 2% que correspondió al ácido usado en la obtención de la muestra.

4.1. Composición y concentración del electrolito de corrida.

Se comenzó el trabajo con un electrolito compuesto por una mezcla borato-tris a pH 8,2 cuya concentración fue de 100 mM de borato y 25 mM de tris, con capilar de 75 μ m d.i. y 60 cm. de largo, obteniéndose dos señales a 8,3 min y 9,4 min, las que fueron asignadas, luego de corroborar mediante adición de estándar, a GSH y GSSG, respectivamente. Se procedió a aumentar la concentración de electrolito a 200 mM de borato, manteniéndose la concentración de tris, en este caso se apreció un aumento en el tiempo de migración de GSH y GSSG y un aumento de la corriente de 15,7 a 42,9 μ A. Se aumentó la concentración de Borato a 300 mM sin adición de tris, y se observó una disminución del tiempo de migración con señales que aparecen antes de los 9 minutos y una corriente de 72,2 μ A.

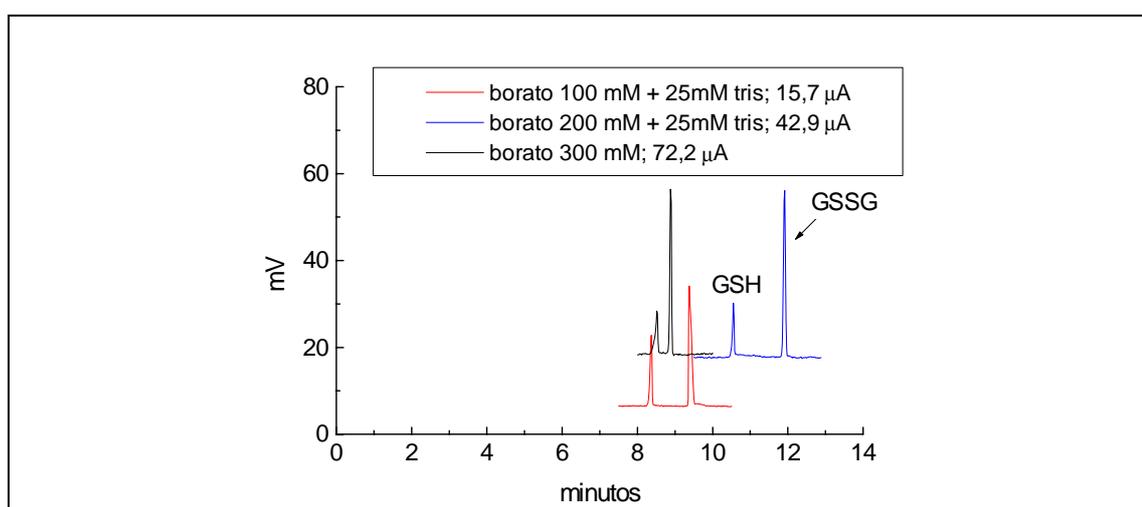


Figura 1: Comparación de electroferogramas obtenidos a distintas concentraciones de electrolito a pH 8,2 con capilar de 60 cm.

4.2. Largo del capilar.

En base a los tiempos de migración observados con el capilar de 60 cm. se optó por disminuir el largo para acortar el tiempo de análisis. Esto dio como resultado una disminución importante del tiempo de migración de GSH y GSSG, apareciendo ambas señales en un máximo de 3 min. de corrida, pero se observó un aumento significativo de la corriente, que en algunos casos fue sobre 200 μA (Figura 2). A pesar de esto se consideró como capilar de trabajo el de 40 cm.

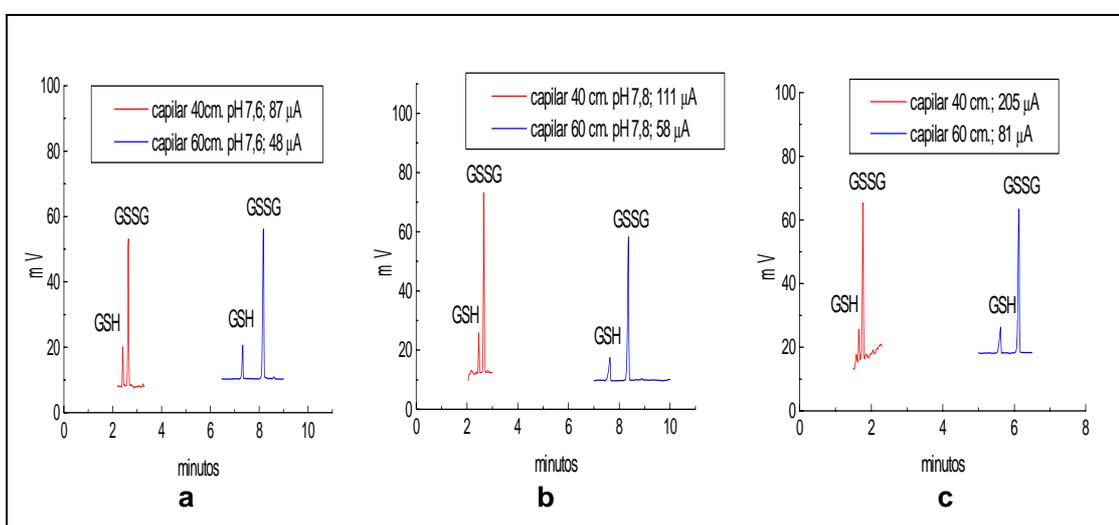


Figura 2: Efecto del largo del capilar sobre los tiempos de migración: **a)** pH 7,6 **b)** pH 7,8, ambos electroferogramas registrados a voltaje de 20 kV y **c)** pH 7,8 registrado a 25 kV.

4.3. Polaridad de la fuente y voltaje aplicado.

Para todos los estudios se utilizó una fuente de poder con polaridad positiva, trabajando a 20, 25 y 30 kV, se observó una relación directa entre el aumento de voltaje y el aumento de la corriente generada, lo que provocó una disminución en la viscosidad del electrolito, aumentando así la velocidad del flujo electrosmótico y por ende disminuyendo los tiempos de migración.

Cambios en el voltaje modifican el flujo electrosmótico pues causa variaciones en el campo eléctrico. Un incremento en el voltaje hará más rápido el flujo electrosmótico reduciéndose los tiempos de migración con lo que el análisis se hace más corto. Sin

embargo, voltajes muy altos generan corrientes muy altas, lo que incrementa la generación de calor dentro del capilar obteniéndose como resultado peaks anchos, tiempos de migración no reproducibles, descomposición o denaturación de la muestra y en algunos casos ebullición del electrolito lo que puede causar cortes en el sistema electroforético (17).

Finalmente el voltaje escogido fue el de 20 kV, comparando el tiempo de migración, la distancia entre las señales y la corriente generada y tomando en cuenta que el trabajo preliminar fue hecho con estándares y no con la muestra real.

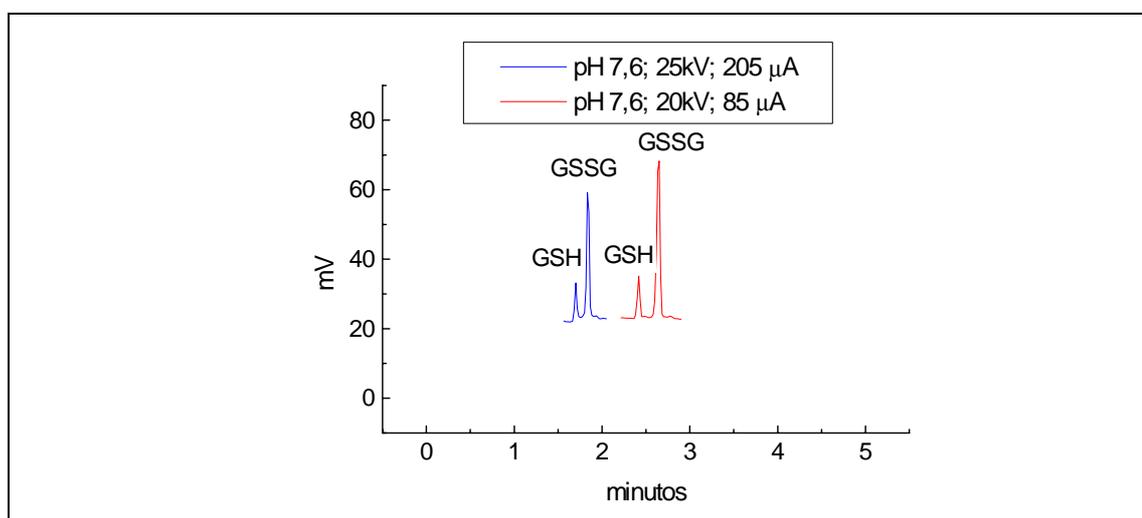


Figura 3: Efecto de la variación de voltaje sobre los tiempos de migración, para el capilar corto (40 cm.) a pH 7,6.

4.4. pH del electrolito.

Para los capilares de sílica, un aumento en el pH aumenta el flujo electrosmótico debido a la disociación de SiOH a SiO^- en la pared interna del capilar. Como el potencial Z es proporcional a la carga de la superficie de la pared del capilar, este aumentaría, produciendo un aumento en la velocidad electrosmótica. Usualmente el pH del electrolito se elige de acuerdo a la mejor separación y no necesariamente a la óptima velocidad electrosmótica (17). En nuestro caso se escogió el pH 7,6 debido a que al acortar el largo del capilar, la corriente aumentó considerablemente, para un igual valor de voltaje aplicado, y el menor valor de pH contribuiría a disminuir el valor de la corriente generada ($85 \mu\text{A}$).

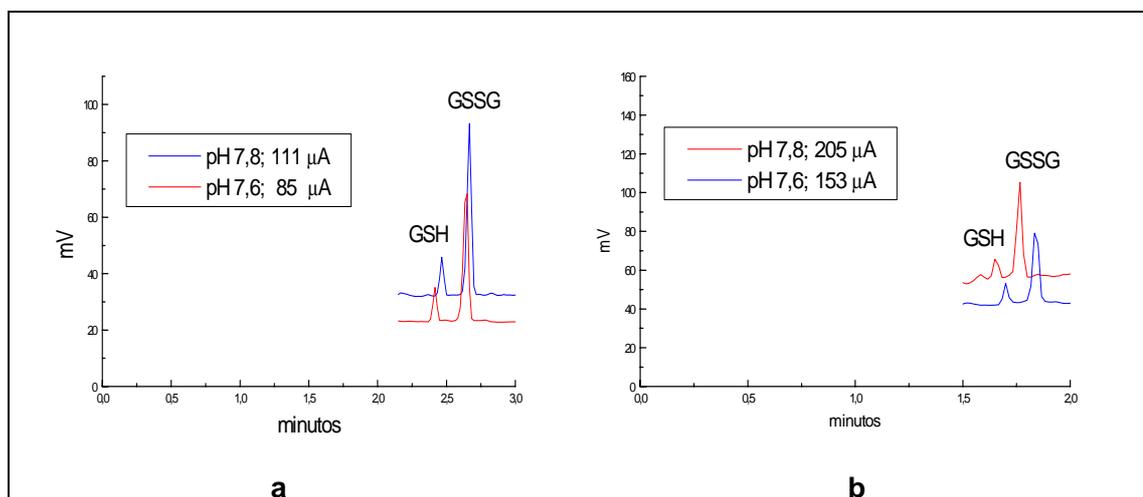


Figura 4: Efecto del pH del electrolito en capilar de 40 cm. de largo, **a)** 20kV y **b)** 25kV

4.5. Efecto de la fuerza iónica.

Al incrementar la concentración del electrolito se incrementó la fuerza iónica, lo que produjo una disminución del tiempo de migración de los analitos, como se aprecia en la Figura 5.

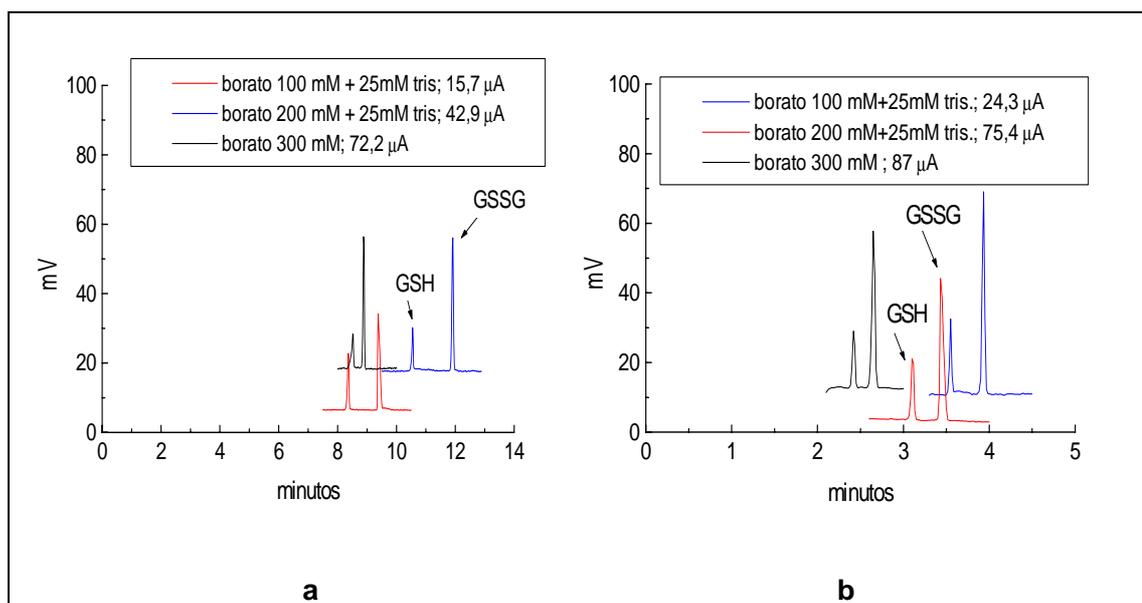


Figura 5: Efecto de la concentración de borato en la fuerza iónica y en la disminución de los tiempos de migración a: **a)** capilar 60 cm., **b)** capilar 40 cm.

4.6. Efecto del tiempo de toma de muestra.

Se evaluó el efecto del tiempo de toma de muestra sobre el tamaño de las señales de ambos analitos, para ello se registró el electroferograma de una mezcla de GSH y GSSG 100 μ M a tres distintos tiempos: 30, 45 y 60 segundos, como se aprecia en la Figura 6, Si bien al aumentar el tiempo de toma de muestra, se apreció un aumento en el tamaño de las señales, también estas aparecen más juntas, por lo que se priorizó, la separación de estas, dejándose un tiempo de toma de muestra de 30 segundos. Se calculó la movilidad electroforética de los solutos a partir de los parámetros obtenidos experimentalmente, para ello se utilizó la siguiente fórmula: $\mu_{EP} = (l/t_m - l/t_{nm})(L/V)$, donde L y l son respectivamente el largo total del capilar utilizado y el largo efectivo

del capilar ambos en centímetros, V es el voltaje aplicado en voltios, t_m y t_{nm} , son el tiempo de migración del soluto y el tiempo de migración desde el solvente respectivamente, expresados en segundos. Para el cálculo de la resolución, se utilizó la fórmula: $R_s = 2(t_2 - t_1)(w_1 + w_2)$, donde t_1 y t_2 son los tiempos de migración de GSSG y GSH respectivamente, w_1 y w_2 son los anchos de picos de GSH y GSSG, expresados en unidades de tiempo.

Los valores de área, tiempo de migración, movilidad y resolución para cada uno de los tiempos de toma de muestra se presentan en la tabla 1.

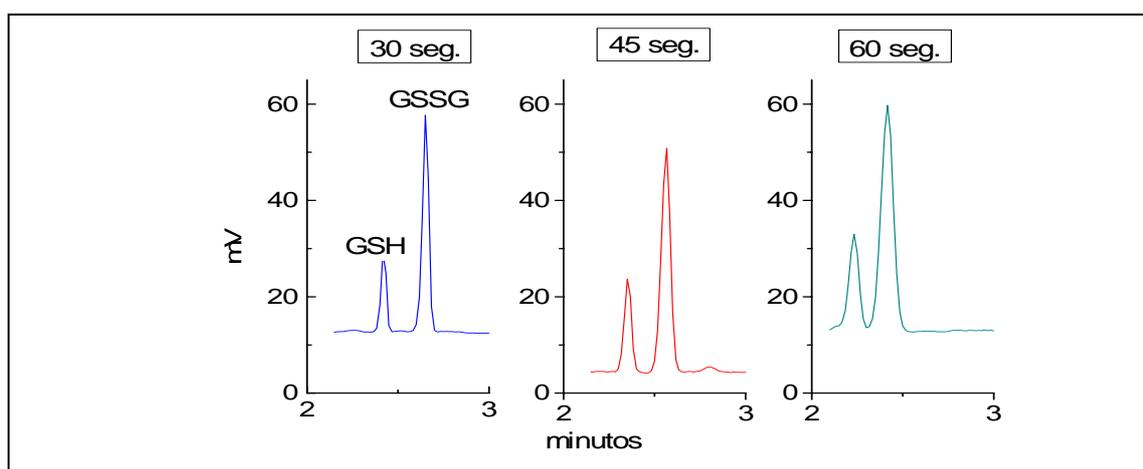


Figura 6: Efecto del tiempo de toma de muestra, en el tamaño y definición de las señales a pH 7,6 con electrolito borato 300mM.

| Tiempo de toma de muestra (s) | GSH | | | GSSG | | | resolución |
|-------------------------------|-------|--------------|--|--------|--------------|--|------------|
| | área | Tiempo (min) | Movilidad (cm*s ⁻¹ *V ⁻¹) | área | Tiempo (min) | Movilidad (cm*s ⁻¹ *V ⁻¹) | |
| 30 | 36290 | 2,42 | -0,1194 | 115195 | 2,65 | -0,0852 | 3,44 |
| 45 | 55719 | 2,36 | -0,1332 | 167515 | 2,57 | -0,0941 | 2,38 |
| 60 | 71167 | 2,23 | -0,1502 | 220040 | 2,42 | -0,1075 | 1,44 |

Tabla 1: Resumen de los valores de área, tiempo y movilidad para GSH y GSSG y la resolución correspondiente a cada tiempo de toma de muestra.

4.7. Curvas de estándares y límites de detección para GSH y GSSG.

Para la cuantificación del GSH y GSSG en todas las muestras de extractos de parte aérea y raíz, se estableció una curva de calibración a partir de estándares preparados en MPA 2% y electrolito Borato 300 mM pH 7.6. La curva de calibración para ambos analitos se estableció en un rango de concentración de 5 a 80 μ M, con un total de cinco puntos. Los valores del coeficiente de regresión lineal, desviación estándar y coeficiente de variación para ambas curvas se muestran en la tabla 2.

| Analito | Curva de calibración | Coefficiente de regresión (r) | Error standard (área) | Limite de detección μ mol/L |
|---------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| GSH | $y = 371,13X - 911,26$ | 0,9996 | 340,20 | 2,75 |
| GSSG | $y = 1145,37X - 1350,99$ | 0,9994 | 642,64 | 1,68 |

Tabla 2: Resumen de los resultados obtenidos en curva de calibración, glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH).

4.8. Repetitividad de las mediciones.

Se estableció la repetitividad de las mediciones en cuanto al área bajo la curva y tiempo de migración, registrando ambos parámetros con las mismas condiciones experimentales, pero distinto día de registro. Estos resultados se presentan en la tabla 3.

| Día | GSH | | GSSG | |
|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| | área | tiempo | área | tiempo |
| 1 | 27402 | 2,583 | 115922 | 2,883 |
| 2 | 25875 | 2,583 | 112824 | 2,883 |
| 3 | 25631 | 2,583 | 112364 | 2,883 |
| 4 | 26271 | 2,583 | 114445 | 2,883 |
| 5 | 25702 | 2,595 | 113516 | 2,883 |
| Prom | 26176 | 2,585 | 113814 | 2,883 |
| D.E. | 728,8 | 0.005 | 1415,4 | 0 |
| C.V.% | 2,78 | 0,21 | 1,24 | 0 |

Tabla 3: Repetitividad de las mediciones con el método optimizado. Conc. GSH=GSSG=100 μ M

4.9. Porcentaje de recuperación para GSH y GSSG.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación, se analizó una muestra, cuantificándose cada uno de los analitos, luego se analizó la misma muestra, pero con un volumen y cantidad conocida de estándar (GSH o GSSG), procediéndose a su posterior cuantificación. El procedimiento se llevó a cabo tres días seguidos. Los resultados obtenidos para GSH y GSSG se muestran en las tablas 4 y 5.

| día | GSH | | | |
|-----|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| | Conc. inicial $\mu\text{moles/L}$ | Conc. 100% $\mu\text{ moles/L}$ | Conc.obt $\mu\text{ moles/L}$ | Recuperación % |
| 1 | 5,92 | 51,37 | 49,25 | 95,3 |
| 2 | 5,93 | 51,38 | 54,23 | 106,3 |
| 3 | 6,24 | 51,69 | 57,84 | 113,5 |

Tabla 4: Recuperación de GSH en una muestra de extracto de hojas de tomate, considerando adición de 20 μL de estándar de concentración 500 μM .

| día | GSSG | | | |
|-----|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| | Conc. inicial $\mu\text{moles/L}$ | Conc. 100% $\mu\text{ moles/L}$ | Conc. obt. $\mu\text{ moles/L}$ | Recuperación % |
| 1 | 6,81 | 52,26 | 46,20 | 87,3 |
| 2 | 5,47 | 50,92 | 43,67 | 84,8 |
| 3 | 5,68 | 51,13 | 46,77 | 90,5 |

Tabla 5: Recuperación de GSSG en una muestra de extracto de hojas de tomate, considerando adición de 20 μL de estándar de concentración 500 μM .

4.10. Protocolo tratamiento de muestra para análisis.

Si bien, por el método de ultrafiltración se obtuvo un electroferograma más limpio y señales más definidas que por la filtración por membrana (Figura 7), debido al pequeño volumen de muestra obtenido y al aumento significativo en el tiempo de tratamiento de la muestra, tres veces más que para la filtración por membrana, se descartó.

Para ambos métodos se obtuvieron una serie de señales anexas, lo que dificultó, la identificación de las señales de interés, por lo que se recurrió a adicionar estándares, para su identificación.

El protocolo para el tratamiento de la muestra tanto por ultrafiltración como por filtración por membrana, se muestra en la Figura 8.

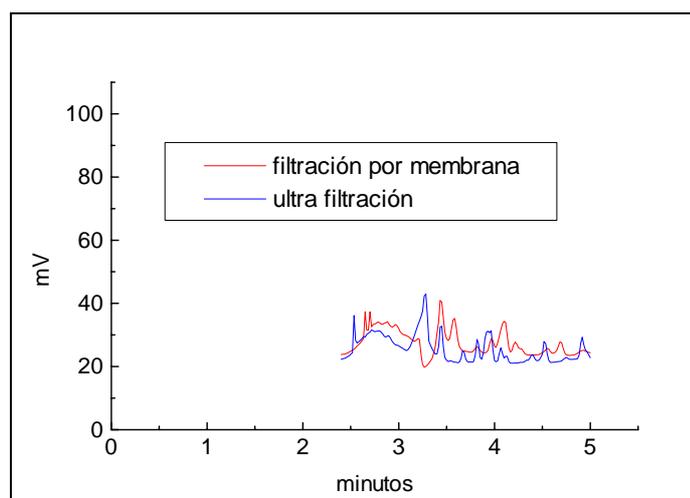


Figura 7: Electroferograma comparativo de los extractos de hojas obtenidos con MPA 2% con filtración por membrana y ultrafiltración con microcon-10.

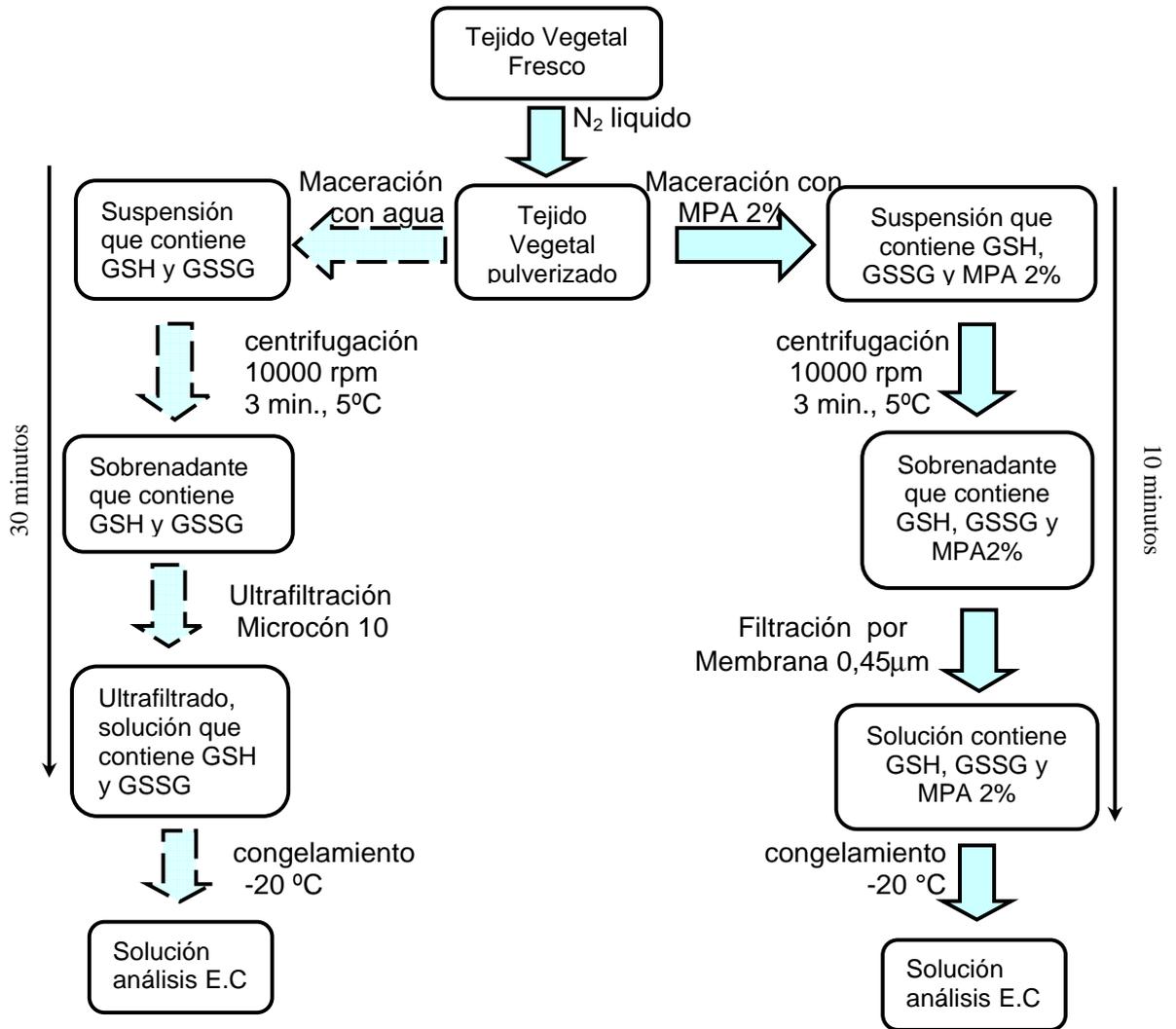


Figura 8: Protocolo para el tratamiento de la muestra

4.11. Rendimiento del material vegetal.

La Figura 9 muestra el aspecto de las plantas una vez finalizado el ensayo. En el tratamiento crónico las plantas tratadas con 3 μM de cobre no difieren del control, en cambio las plantas tratadas con 12 μM disminuyeron el desarrollo de su parte aérea y raíz, observando además cambios en la coloración de las hojas y raíz. En cambio en el tratamiento agudo, las plantas no presentaron grandes diferencias en su desarrollo y coloración.

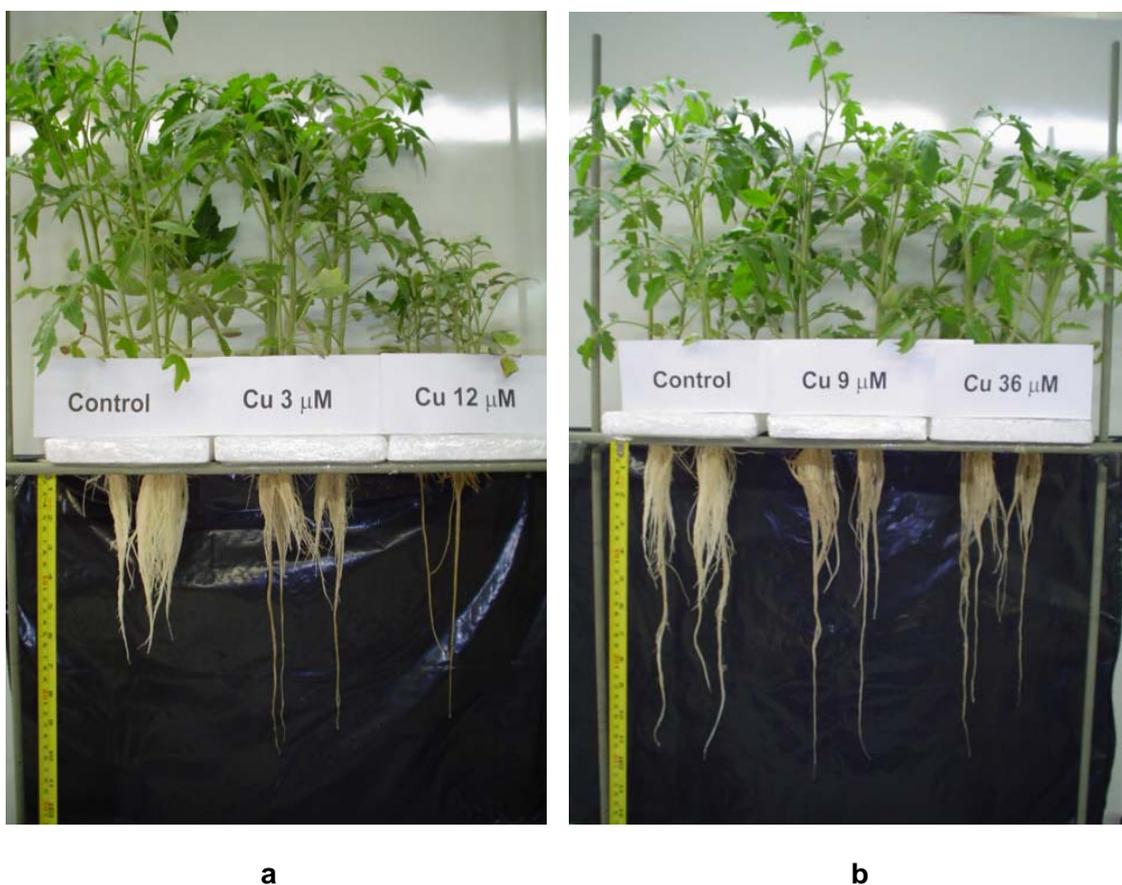


Figura 9: Comparación aspecto de parte aérea y raíz para **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo.

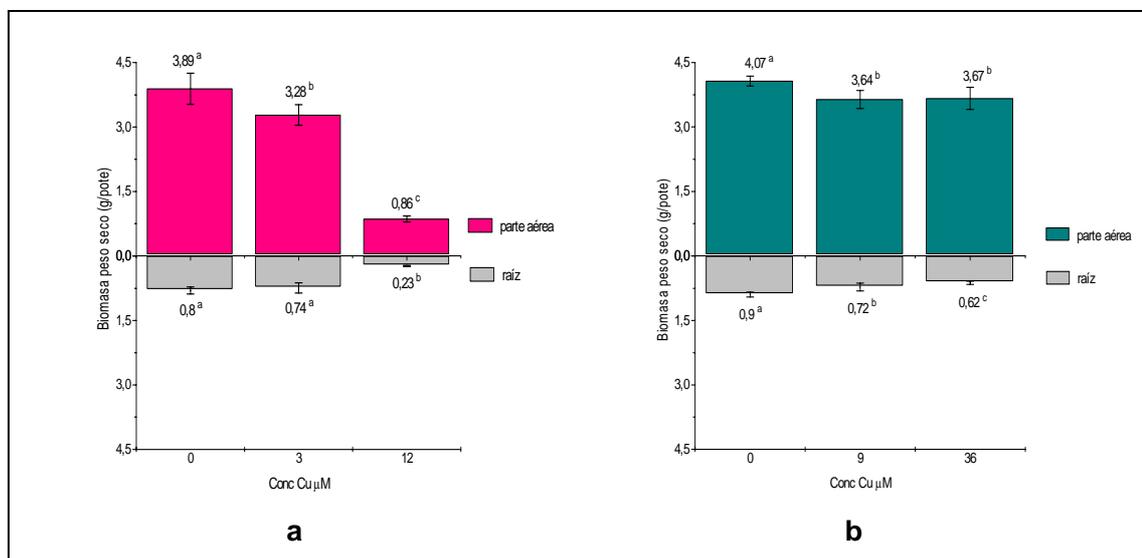


Figura 10: Biomasa peso seco (g/pote) en parte aérea y raíz para **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

Los valores obtenidos para la biomasa se presentan en las tabla 1 de anexos.

4.12. Absorción de cobre y macronutrientes.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el tratamiento agudo y crónico la mayor concentración de cobre se presentó en la raíz de la planta, correlacionando positivamente con la dosis de metal aplicado y con coeficientes de correlación de 0.999 y 0.780, respectivamente. Este efecto fue mayor en el tratamiento agudo (Figura 11), donde la concentración del metal en la raíz superó entre 16 y 47 veces la obtenida en la parte aérea. En cambio, en el tratamiento crónico la concentración en la raíz alcanzó entre 14 y 19 veces la concentración de la respectiva parte aérea. La traslocación de cobre a la parte aérea fue baja para ambos tratamientos, alcanzando como máximo 60 µg/g. los niveles de cobre observados, presentaron una relación directa con el tiempo de contacto de las plantas con las solución, así la concentración foliar alcanzada en el tratamiento crónico (28 días) no difiere entre las dosis de metal aplicado (3 y 12 µM), en cambio en el tratamiento agudo, al estar en contacto sólo 48 horas, la concentración alcanzada con 9 µM es aproximadamente un tercio de aquella obtenida con 36 µM. Los valores obtenidos para Cu se presentan en las tablas 2 y 3 de anexos.

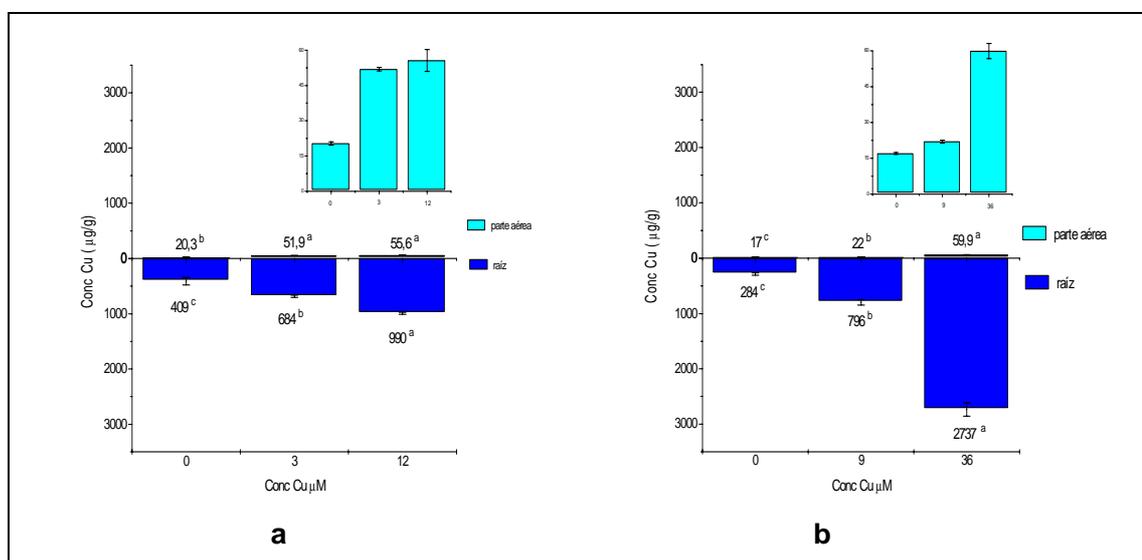


Figura 11: Comparación de la concentración de cobre (mg/g) en parte aérea y raíz, **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

Los resultados obtenidos para el fósforo (Figura 12) indican que este elemento alcanza mayor concentración en la raíz, alrededor de un 50% más que en la parte aérea, excepto con el nivel más alto de cobre del tratamiento agudo, donde la raíz supera en 15% la concentración de la parte aérea. No se observan diferencias en la concentración de fósforo a nivel foliar.

El potasio se distribuyó equitativamente entre parte aérea y raíz (Figura 13) de las plantas que recibieron el tratamiento crónico. En este caso la concentración alcanzada correlacionó negativamente con la dosis de cobre aplicado, con coeficientes de correlación de 0.963 y 0.980, respectivamente. En el tratamiento agudo no se observó efecto de Cu sobre el K foliar pero si una disminución del 60% de la concentración a nivel de la raíz.

Para el calcio se produjo una mayor absorción de metal en la parte aérea como se aprecia en la Figura 14. Para el tratamiento crónico, tanto en parte aérea como raíz, se observa un aumento en la absorción a medida que aumenta la concentración de cobre, en cambio para el tratamiento agudo, se observa una disminución en la absorción del metal en la parte aérea.

En el caso del magnesio (Figura 15), se aprecia, para ambos tratamientos, una disminución en la absorción del metal, a medida que aumenta la concentración de cobre tanto en la parte aérea como raíz, siendo mayor la absorción de metal en la parte aérea de la planta. Los valores obtenidos para los macronutrientes, se presentan en las tablas 4 al 11 de los anexos.

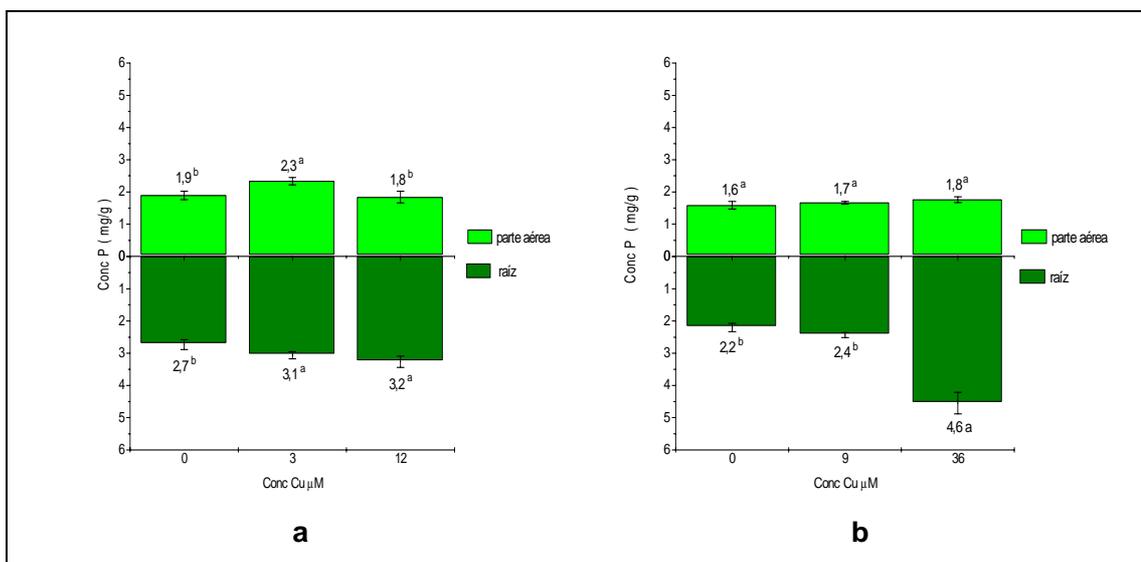


Figura 12: Concentración de fósforo (mg/g) en parte aérea y raíz para **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

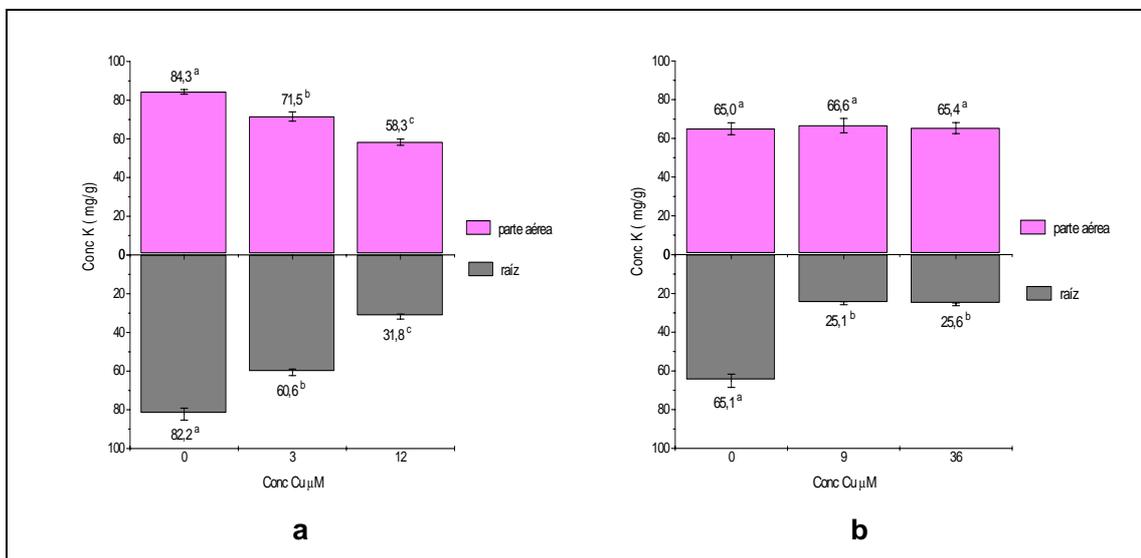


Figura 13: Concentración de potasio (mg/g) en parte aérea y raíz para **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

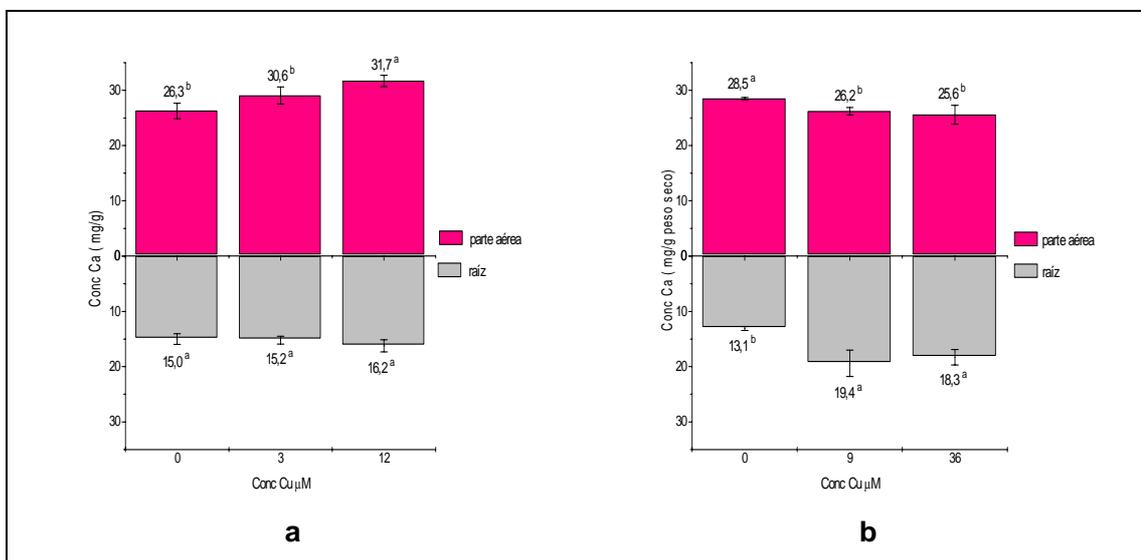


Figura 14: Concentración de calcio (mg/g) en parte aérea y raíz **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

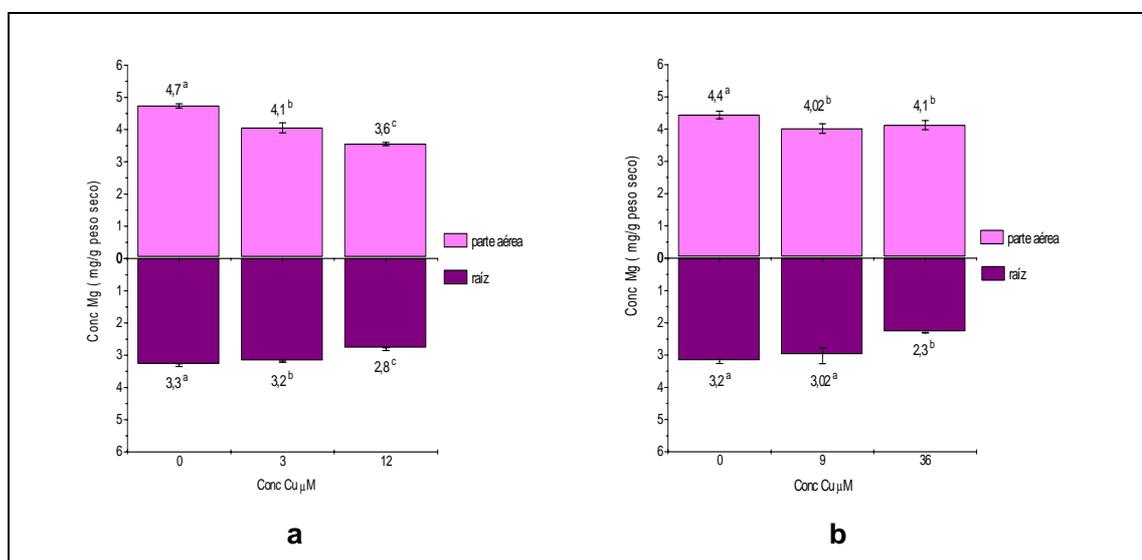


Figura 15: Concentración de magnesio (mg/g) en parte aérea y raíz **a)** tratamiento crónico, **b)** tratamiento agudo. Con n =4

4.13. Cuantificación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en material vegetal.

Los tratamientos con Cobre agudo y crónico presentan mayor efecto en los niveles de GSH y GSSG en la raíz de la planta (Figuras 16 y 17). En este órgano el nivel de GSH fue entre 1,2 y 34 veces superior al de GSSG. Los niveles más altos de GSH en la raíz se apreciaron con el tratamiento crónico. Los niveles de GSSG en la raíz se mantuvieron bajos en el tratamiento crónico sin una tendencia clara en función de la concentración de cobre. No se observaron cambios en este parámetro en el tratamiento agudo

A nivel de parte aérea se presentaron sólo cambios discretos en los niveles de ambos péptidos. El nivel de GSH fue superior al de GSSG en los controles de ambos tratamientos y en la dosis de 12 µM Cu del tratamiento crónico. Los valores obtenidos para el análisis de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) para los tratamientos crónico y agudo, se presentan en las tablas 12 y 13 de anexos respectivamente.

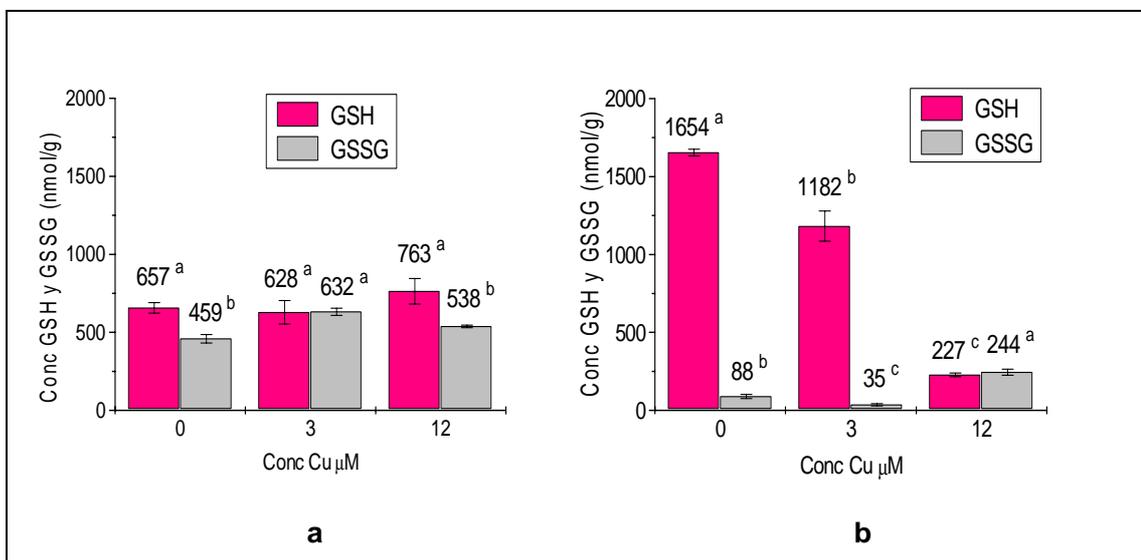


Figura 16: Gráfico comparativo de concentración de GSH y GSSG (nmol/g), para tratamiento crónico en **a)** parte aérea y **b)** raíz. Con n =4

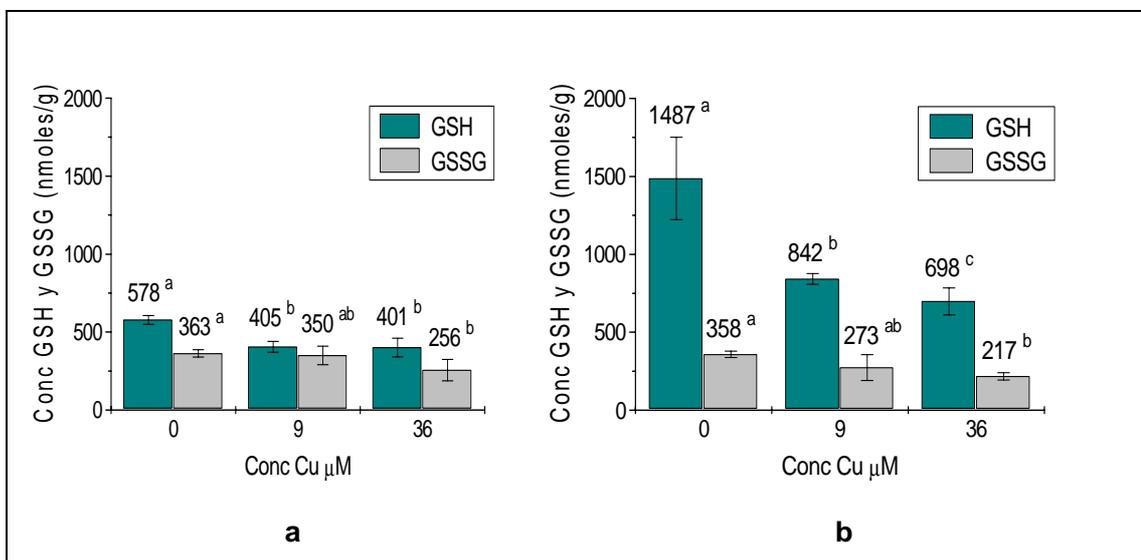


Figura 17: Gráfico comparativo de concentración de GSH y GSSG (nmol/g), para tratamiento agudo **a)** parte aérea, **b)** raíz. Con n =4

5. DISCUSIÓN

El método optimizado en esta tesis se basó en métodos propuestos para el análisis de GSH y GSSG en muestras de fluidos o tejidos de origen animal (13, 14, 15). En la mayoría de los trabajos se ha usado borato como electrolito de corrida, lo cual favorece la permanencia de ambos péptidos en su estado disociado, al igual como ocurre al pH fisiológico. Bajo tales condiciones las formas de GSH y GSSG que prevalecen son las siguientes (28)

Análisis iónico capilar de aniones.

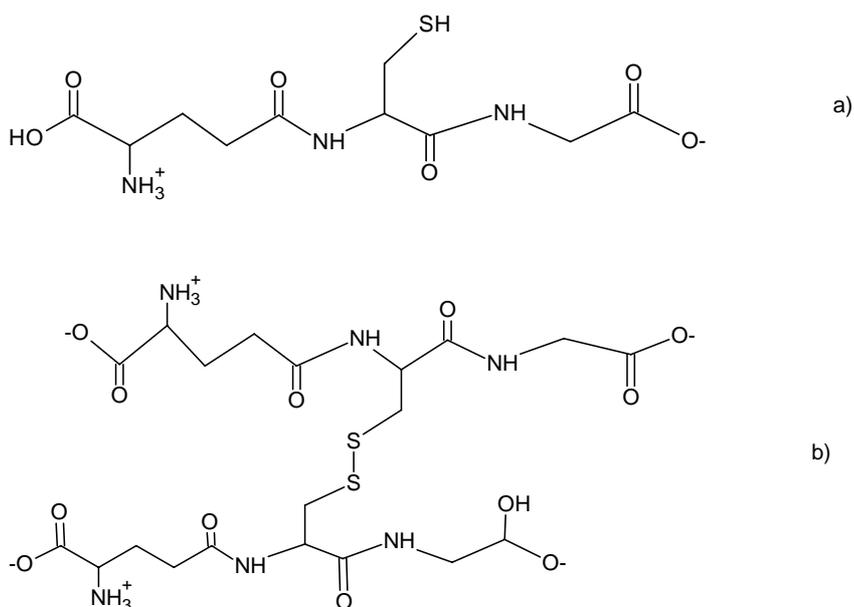


Figura 18: Estructuras de glutatión reducido GSH (a) y oxidado GSSG (b) existentes a pH fisiológico.

El uso de una fuente de poder positiva en las condiciones instrumentales determinó que el ánodo correspondiera al electrodo que se ubica en el punto de inyección de la muestra y el cátodo en el extremo de detección (17) (Figura 19):

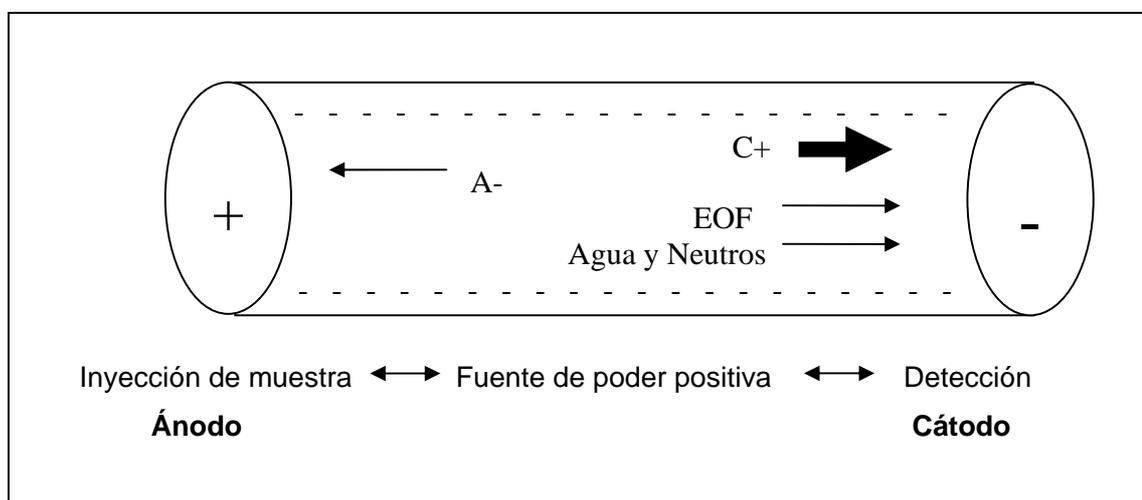


Figura 19: Representación del sistema electroforético aplicado en el análisis de GSH y GSSG

En tales condiciones el flujo electroosmótico fue hacia el cátodo cargado negativamente. El pH del electrolito favoreció la presencia de cargas negativas en la superficie del capilar facilitando el movimiento de los cationes hacia el cátodo, movimiento que fue ayudado por el flujo electroosmótico. Le siguieron las moléculas neutras y agua que migraron con el flujo electroosmótico y luego los aniones como el glutatión que deberían migrar hacia el ánodo pero que por efecto del flujo electroosmótico son arrastrados hacia el cátodo.

Considerando que uno de los principales objetivos de este trabajo fue la disminución del tiempo de migración, se incrementó el voltaje aplicado para aumentar el EOF y disminuir el tiempo, lo cual se logró usando voltajes de entre 20 a 25 mV (Figura 3). A su vez, como la disminución del largo del capilar implica un aumento del campo eléctrico y por lo tanto un incremento del EOF, la aplicación de este principio dio como resultado una disminución del tiempo de migración (Figura 2); sin embargo, implicó también un incremento de la corriente. Tiempos cortos de migración fueron obtenidos por (25) sin embargo el trabajo no describe en detalle las condiciones electroforéticas usadas ni los valores de corriente encontrados. En el presente trabajo no fue posible disminuir más el largo del capilar sin afectar de manera importante la

corriente generada, de lo contrario habría incrementado la temperatura del capilar afectando la estabilidad de la muestra (17).

5.1. Tratamiento de la muestra:

Existen pocos trabajos publicados en que se determine glutatión en una matriz vegetal, esto implica que la adaptación de una metodología usada en tejido animal pueda no ser tan efectiva en el análisis de tejido vegetal. En este sentido se probó la utilidad de las membranas de ultrafiltración para separar la fracción mayor a 10 kDa, correspondiente a la mayoría de las proteínas y enzimas de la matriz, que tienen efecto catalítico en la transformación o consumo de GSH y GSSG, o que pueden interferir en el análisis co-migrando con los analitos. Este procedimiento ha sido usado por algunos investigadores (25) para aislar los péptidos pequeños en sangre. En este trabajo, la aplicación de tal procedimiento a las muestras analizadas no fue efectiva. Una de las dificultades observadas fue que el volumen de filtrado recuperado con las copas de ultrafiltración, fue mucho menor al especificado pese a usar igual o mayor velocidad de centrifugación. Adicionalmente, el electroferograma obtenido del filtrado, demostró la presencia de varias señales cercanas a los analitos de interés, lo que hizo difícil su identificación. Por otra parte, el tiempo de tratamiento de la muestra se triplicó con respecto al uso de un agente químico (ácido metafosfórico) para la separación de las proteínas. En este sentido, el uso de MPA implicó un tiempo estimado de 10 minutos para el tratamiento de la muestra disminuyendo el tiempo total de análisis, lo cual era uno de los objetivos principales de este trabajo.

5.2. Niveles de cobre y macronutrientes.

Se ha demostrado que las plantas ejercen un control sobre los niveles foliares de algunos elementos de tal forma que pueden contrarrestar el déficit o el exceso de elementos que pudieran afectar su desarrollo (1). Particularmente, se ha descrito una homeostasis del cobre (29) en la que participan una serie de biomoléculas como metalotioneinas que se relaciona con la condición de elemento esencial para las plantas.

Considerando el conjunto de resultados de este estudio, es posible que la homeostasis de cobre mantenga los niveles foliares aproximadamente entre aquellos del control (17-20 $\mu\text{g/g}$) y aquellos observados con las dosis mas altas de ambos tratamientos (55-60 $\mu\text{g/g}$), siendo los valores del tratamiento prolongado (28 días), los mas representativos de este efecto. Por el contrario, la raíz no presenta este comportamiento por cuanto en ella los procesos fisiológicos donde participa el cobre son limitados. De allí que la concentración encontrada en esta parte de la planta correlacionó positivamente con la concentración aplicada, incrementando en mas de un orden de magnitud. Este efecto a su vez va en detrimento de la planta, como se demuestra en el tratamiento crónico, donde se observó una importante disminución del desarrollo vegetal debido a la toxicidad del cobre.

Pese al efecto fitotóxico del cobre, en general los niveles de fósforo no fueron afectados por el tratamiento prolongado con cobre. Por el contrario, la absorción de potasio fue muy dependiente del nivel de cobre en la parte aérea y raíz (Fig. 12), implicando una correlación negativa con coeficientes de 0,963 y 0,980, respectivamente, en el tratamiento crónico.

5.3. Niveles de GSH y GSSG.

Los niveles de GSH y GSSG encontrados en plantas que han sido sometidas a estrés por metal son variables, dependiendo de la especie, órgano de la planta, concentración de metal aplicada, tiempo de contacto entre planta y metal, entre otros. En este sentido, Shgerri y col. (30) en plantas de rabanito tratadas con cobre entre 0 y 15 μM por 10 días, encontraron más glutatión total en hojas que en raíces. Este parámetro se mantuvo constante al incrementar la concentración de Cu pero la concentración de GSH en la raíz disminuyó, siendo este efecto asociado al incremento de la biosíntesis de fitoquelatinas. Estos autores encontraron una concentración de alrededor de 1,5 y 3 $\mu\text{mol/g}$ de glutatión total y alrededor de 1 y 2 $\mu\text{mol/g}$ de GSH en hojas y raíces, respectivamente. Por otra parte, Drazkiewicz y col. (11) describieron que la especie *Arabidopsis thaliana*, la cual fue tratada con dosis crecientes de Cu entre 0 y 100 μM , por 1, 3 y 7 días, presentó un nivel de GSH en hojas que fue dependiente del tiempo, siendo superior al control a los 3 días pero inferior al control a

los 7 días. Los cambios en los niveles de GSSG fueron menos visibles con incrementos observados solo con las concentraciones altas (50 y 100 μM) a los tres días. Los valores encontrados en hojas estuvieron entre 100 y 200 nmol/g para GSH y entre 60 y 140 nmol/g para GSSG. Adicionalmente, Wang y col. (31) en experimentos realizados con *Brassica juncea*, la cual fue tratada por 4 días con cobre entre 0 y 16 μM , encontraron una disminución del contenido de GSH después de iniciar el tratamiento que fue significativa desde el cuarto día, pero que excedió el valor del control al final del experimento. El GSSG mostró un progresivo incremento. Los valores encontrados fueron: GSH 86-110 nmol/g y GSSG 42-68 nmol/g.

Mediante el método por ECZ optimizado en el presente trabajo, la concentración de GSH y GSSG determinada presentó valores parecidos a los descritos en la literatura, para estudios realizados en el mismo tipo de matriz pero con métodos espectrofotométricos o cromatográficos (11). En nuestro estudio, las mayores concentraciones se obtuvieron para GSH en la raíz, concordando con los resultados que obtuvieron Wang y col (31) para cobre y Shanker y col. (32) para cromo. A diferencia de estos trabajos, los resultados de este estudio indican mayor variabilidad en los niveles de GSH, oscilando entre 230 y 1650 nmol/g. La disminución de GSH en la raíz de ambos tratamientos, a medida que incrementa la concentración de Cu, podría indicar una mayor utilización de este péptido en la raíz como precursor de biomoléculas con propiedades complejantes de metal, tales como las fitoquelatinas. A su vez este efecto parece ser independiente del daño que haya manifestado la raíz frente al metal, por cuanto en el tratamiento crónico hubo una importante disminución de la biomasa de la raíz, no así en el tratamiento agudo, aun así la razón GSH/GSSG fue mucho mas marcada en el tratamiento crónico, lo cual reflejaría que el consumo de GSH es dependiente del tiempo de contacto con el metal. La mayoría de los estudios (11, 28, 29, 32) consideran tiempos de contacto breves entre planta y el metal, pudiendo ser de horas a unos pocos días, demostrando que este tiempo es suficiente para inducir alguna respuesta de la planta que se refleja en cambio en los niveles de GSH y GSSG.

La respuesta de las plantas al tratamiento agudo con el metal en este estudio siguió la misma tendencia que en el tratamiento crónico, lo que indicaría que el efecto del metal sobre los niveles de ambos péptidos es inmediato. Si bien la razón GSH/GSSG fue mayor en el tratamiento crónico, los valores observados en el tratamiento agudo se diferencian claramente entre plantas tratadas con 9 o 36 μM de Cu y plantas control. En este sentido, la evaluación del estado redox de glutatión en la raíz, a las pocas horas de exposición frente al metal constituiría un buen índice de la respuesta temprana de la planta frente a cobre.

6. CONCLUSIONES

- En la determinación de glutatión reducido y oxidado por Electroforesis Capilar de Zona, la optimización de los parámetros instrumentales tales como largo de capilar, voltaje aplicado y polaridad de la fuente de poder, así como los parámetros relacionados con el electrolito de corrida, tales como composición, concentración, pH y fuerza iónica permiten la determinación de ambos analitos en un tiempo inferior a los tres minutos. Las condiciones óptimas fueron: polaridad de la fuente positiva, capilar de 40 cm de largo, 20kV, electrolito borato 300 mM, pH 7,6 y 30 segundos de inyección hidrostática de la muestra.
- El método optimizado presenta una muy buena correlación entre área bajo la curva y concentración de GSH y GSSG, con coeficientes de correlación de 0,9995 y 0,9994, límites de detección de 2,75 y 1,68 $\mu\text{mol/L}$ y recuperación del analito en el proceso fue de 105 y 87% respectivamente.
- En la etapa de tratamiento de la muestra, el uso de un método químico (ácido metafosfórico) es más efectivo que el uso de un método físico (copas de ultra filtración) para el aislamiento de los analitos desde la matriz proteica. Esta efectividad se reflejó en un menor consumo de tiempo, mayor volumen de muestra obtenido y obtención de una matriz mas limpia.
- El tratamiento prolongado de las plantas con cobre se manifiesta en síntomas de toxicidad con una drástica disminución de la biomasa de la parte aérea y raíz, en asociación con un descenso de la concentración de potasio en ambos órganos. Este efecto no se observa en plantas tratadas por un periodo corto de tiempo con el metal.

- Los niveles de cobre alcanzados en la parte aérea y raíz correlacionan positivamente con la concentración de cobre aplicada en ambos tratamientos. En este sentido, el metal fue escasamente traslocado a la parte aérea, siendo las concentraciones más altas observadas en la raíz
- El cobre aplicado a la planta modifica los niveles de glutatión reducido y oxidado tanto en el tratamiento crónico como en el agudo. El efecto más notorio se manifestó sobre el glutatión reducido contenido en la raíz. Este péptido decrece su concentración a medida que incrementa la concentración de cobre, siendo este efecto independiente de los cambios morfológico que presenta la raíz y del lapso de tiempo en que se le aplicó cobre.
- En plantas que ya han alcanzado un desarrollo, los cambios producidos en los niveles de glutatión reducido y oxidado cuando son expuestas a cobre por un periodo de tiempo corto (horas), constituyen un buen indicador de la respuesta temprana al estrés por metal.

7. REFERENCIAS.

1. Kabata-Pendias 2000. Cobre, En: "Trace Elements in Soils and Plants", CRC Press U.S.A., capítulo 5
2. .Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R., Loza-Tavera H., Hernández-Navarro A., 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protist and plants. *Fems Microbiology Reviews*. 29, 653-671.
3. Clemens S. 2001. Molecular mechanism of plant tolerance and homeostasis. *Planta* (212), 4, 475-486.
4. R. Badilla-Ohlbaum, R. Ginocchio, P.H. Rodríguez, A. Céspedes, S. González, H. E. Allen, G. E. Lagos. 2001. Effect of soil copper content on copper load of selected crop plants in central Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2749-2757.
5. R Ginocchio, P. H. Rodríguez, R. Badilla-Ohlbaum, H. E. Allen, G. E. Lagos. 2002. Effect of Soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1736-1744.
6. R. Ginocchio, J. Narváez. 2002. Importancia de la forma química y de la matriz del substrato en la toxicidad en *Noticastrum sericeum* (Less.) Less. ex Phil. *Revista Chilena de Historia Natural*. 75: 603-612.
7. Hu Z., Zhang J., Chen X., 2005. Quantification of glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Talanta*, 65, 986-990.
8. Bayle C., Caussé E., Cordero F. 2004. Determination of aminothiols in body fluids, cells and tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 25, 1457-1472.
9. Herrero-Martínez J.M., Simó-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G., Deltoro V.I., Calatayud A., Barreno E. 2000. Simultaneous determination of L ascorbic Acid, glutathione and their oxidized forms in ozone-exposed vascular plants by Capillary Zone Electrophoresis. *Environ Sci Technol*. 34, 1331-1336,
10. Chen G., Zhang L., Wang J. 2004. Miniaturized capillary electrophoresis system with a carbon nanotube microelectrode for rapid separation and detection of thiols. *Talanta*. 64, 1018-1023.

11. Drazkiewicz M., Skorzunska-Polit E., Krupa Z. 2003. Response of ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). Plant Science.164, 195-202.
12. Sutter K., Friebe S., Krauss G.J., 1999. Capillary zone electrophoresis of phytochelatin and their precursors using on-line derivatization with N-ethylmaleimide. Int. J. Environ. Anal. Chem. 74, 167-178,
13. Camera E., Picardo M., 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. J of. Chromatography B, 781, 181-206,
14. Lock J., Davis J., 2002. The determination of disulphide species within physiological fluids. Trend Anal. Chem. 21, 807-815.
15. Kratumacher C., Schilling D., Pittelkow M.R., Naylor S. 2002. Simultaneous analysis of oxidized and reduced glutathione in cell extracts by capillary zone electrophoresis. Biomed. Chromatogr., 16 (3), 224-228,
16. Carlucci F., Tabucchi A., Biagioli B., Sani G., Lisi G., Maccherini M., Rosi F., Marinello E. 2000. Capillary electrophoresis in the evaluation of ischemic injury: simultaneous determination of purine compounds and glutathione, Electrophoresis. 21(8), 1552- 1557,
17. Baker, D.R. 1995. Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons Inc., New York
Capítulo 2
18. Lochman P., Adam T., Friedecký D., Hlídková E., Skopková Z. , 2003. High-throughput capillary electrophoretic method for determination of total aminothiols in plasma and urine. Electrophoresis.24, 1200-1207.
19. Wang W., Xin H., Shao H.L., Jin W.R., 2003. Determination of glutathione in single human hepatocarcinoma cells by capillary electrophoresis with electrochemical detection. J. Chromatography B. 789, 425-429.
20. Sbrana E., Patadini A., Brananti E., Spinetti M, Raspi G. 2004. Quantitation of reduced glutathione and cysteine in human immunodeficiency virus-infected patients. Electrophoresis. 25, 1522-1529,
21. Davey M.W., Bauw G., Van Montagu M. 1997. Simultaneous high-performance capillary electrophoresis analysis of the reduced and oxidized forms of ascorbate and glutathione. J. Chromatography B.697, 269-276.

22. Mendoza J., Soto P., Ahumada I., Garrido T. 2004. Determination of oxidized and reduced glutathione, by capillary zone electrophoresis, in *Brassica juncea* plants treated with copper and cadmium. *Electrophoresis*. 25, 890-896.
23. Jin W., Li X., Gao N. 2003. Simultaneous Determination of Tryptophan and Glutathione in individual Rat Hepatocytes by Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection at a Carbon Fiber Bundle-Au/Hg dual electrode. *Anal. Chem*75. 3859-3864.
24. Mathews C., Van Holde K. E. 2002. *Bioquímica*. Pearson Educación S.A.; Madrid. Capítulo 5.
25. Carru C., Zinellu A., Pes G. M., Marongiu G., Tadotini B., Deiana L. 2002. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. *Electrophoresis*. 23, 1716-1721.
26. Sadzuka A., Grez R., Mora M., Saavedra N., Carrasco M., Rojas C. 2000. Fósforo en Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos, Comisión de Normalización y Acreditación (CNA).
27. Miller J.C., Miller J. N., 1993, "Estadística para Química Analítica", Addison-Wesley Iberoamericana, 2º Edición, Capítulo 5.
28. Krezel A., Bal W. 2004. Studies of Zinc (II) complex of GSH, GSSG and their analogs shed more light on their biological relevance. *Bioinorganic chemistry and applications*; 2, 293-305.
29. Roosens N., Bernard C., Verbruggen N., Leplae R. 2004. Evidence for Copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *thlaspi caerulcens*. *FEBS Letters*. 577, 9-16.
30. Sgherri C., Cosi E., Navari-Izzo F. 2004. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grow in copper excess. *Physiologia Plantarum*. 118, 21.
31. Wang S-H, Yang Z-M, Yang H., Lu B., Li S-Q., Lu Y-P. 2004. Copper induced stress and antioxidative response in roots of *Brassica juncea* L. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 203-212.
32. Shanker A. K., Djanaguiraman M., Sudhagar R. 2004. Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*vigna radiate* (L) R. Wilczek. Cv CO4) roots. *Plant science*. 166, 1035-1043.

-
33. Carru C., Deiana L., Sotgia S., pes G. M., Zinellu A. 2004. Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 25, 882-889.
 34. Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* (10), 264, 5598-5605.
 35. Wilczek G., Babczynska A., Augustyniak M., Migula P. 2004. Relation between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Env. Pollution*. 132, 453-461.
 36. Barazani O., Golan-Goldhirsh A., Khadka U. R., Dudai N. 2004. Cadmium accumulation in *Allium schoenoprasum* L. Grow in an aqueous medium. *Chemosphere*, 57 (9), 1213-1218.
 37. Gupta D. K., Tohoyama H., Joho M., Inouche M. 2002. Possible role of phytochelatins and glutathione metabolism inn cadmium tolerance in chickpea roots. *J Plants Res*. 115, 429-437.
 38. Lenton K. J., Therriault H., Wagner R., 1999. Analysis of glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal. Biochem*, (274), 125-130.

ANEXOS

Tabla 1: Biomasa (gr/pote) parte aérea y raíz tratamiento crónico y tratamiento agudo.

| Parte de la planta | Conc. Cu | Tratamiento Crónico | | | | | | Tratamiento Agudo | | | | | |
|--------------------|----------|---------------------|-----------|-------|-------|---------|----------|-------------------|-----------|-------|-------|-------|----------|
| | | Peso seco | \bar{x} | D.E | F | P | C.M £ | Peso seco | \bar{x} | D.E | F | P | C.M £ |
| Parte Aérea | Control | 4,24 | 3,89 | 0,362 | 159,8 | 9,31E-8 | a | 4,11 | 4,07 | 0,115 | 5,58 | 0,027 | a |
| | | 4,08 | | | | | | 3,90 | | | | | |
| | | 3,41 | | | | | | 4,15 | | | | | |
| | | 3,82 | | | | | | 4,12 | | | | | |
| | Bajo | 3,612 | 3,28 | 0,235 | | | b | 3,57 | 3,64 | 0,208 | | | b |
| | | 3,094 | | | | | | 3,62 | | | | | |
| | | 3,133 | | | | | | 3,44 | | | | | |
| | | 3,280 | | | | | | 3,93 | | | | | |
| | Alto | 0,891 | 0,862 | 0,071 | | | c | 3,55 | 3,67 | 0,258 | | | b |
| | | 0,948 | | | | | | 3,54 | | | | | |
| | | 0,798 | | | | | | 4,06 | | | | | |
| | | 0,811 | | | | | | 3,53 | | | | | |
| Raíz | Control | 0,896 | 0,795 | 0,079 | 56,79 | 7,88E-6 | a | 0,812 | 0,896 | 0,058 | 16,27 | 0,001 | a |
| | | 0,762 | | | | | | 0,931 | | | | | |
| | | 0,710 | | | | | | 0,903 | | | | | |
| | | 0,812 | | | | | | 0,940 | | | | | |
| | Bajo | 0,790 | 0,740 | 0,116 | | | a | 0,786 | 0,722 | 0,092 | | | b |
| | | 0,652 | | | | | | 0,677 | | | | | |
| | | 0,639 | | | | | | 0,614 | | | | | |
| | | 0,881 | | | | | | 0,811 | | | | | |
| | Alto | 0,226 | 0,233 | 0,013 | | | b | 0,623 | 0,623 | 0,038 | | | c |
| | | 0,248 | | | | | | 0,596 | | | | | |
| | | 0,241 | | | | | | 0,677 | | | | | |
| | | 0,219 | | | | | | 0,594 | | | | | |

C.M : Comparación de medias.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 2: Concentración de Cu tratamiento crónico.

| Tratamiento crónico | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|--------------------------|-----------|-------|------|-------|---------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g)¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte Aérea | control | 1 | 19,9 | 20,3 | 0,698 | 3,4 | 226,2 | 9,11E-8 | b |
| | | 2 | 21,2 | | | | | | |
| | | 3 | 20,6 | | | | | | |
| | | 4 | 19,6 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 49,6 | 51,9 | 0,733 | 1,4 | | | a |
| | | 2 | 52,3 | | | | | | |
| | | 3 | 52,2 | | | | | | |
| | | 4 | 51,0 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (68,9) | 55,6 | 4,65 | 8,4 | | | a |
| | | 2 | 54,4 | | | | | | |
| | | 3 | 51,7 | | | | | | |
| | | 4 | 60,7 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 459 | 409 | 66,4 | 6,2 | 147,7 | 7,88E-6 | c |
| | | 2 | 334 | | | | | | |
| | | 3 | 436 | | | | | | |
| | | 4 | (300) | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 688 | 684 | 19,9 | 2,9 | | | b |
| | | 2 | 662 | | | | | | |
| | | 3 | (781) | | | | | | |
| | | 4 | 701 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (1020) | 990 | 18,2 | 1,8 | | | a |
| | | 2 | 996 | | | | | | |
| | | 3 | 969 | | | | | | |
| | | 4 | 1004 | | | | | | |

C.M : Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 3: Concentración de Cu tratamiento agudo.

| Tratamiento agudo | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|-------|---------|------------------|
| Parte de la planta | tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. ϵ |
| Parte aérea | control | 1 | 16,0 | 17,0 | 0,399 | 2,3 | 549,4 | 2,02E-8 | c |
| | | 2 | 16,8 | | | | | | |
| | | 3 | 17,5 | | | | | | |
| | | 4 | 16,8 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (25,1) | 22,0 | 0,618 | 2,8 | | | b |
| | | 2 | 22,7 | | | | | | |
| | | 3 | 21,5 | | | | | | |
| | | 4 | 21,7 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 63,5 | 59,9 | 3,23 | 5,4 | | | a |
| | | 2 | (49,2) | | | | | | |
| | | 3 | 57,3 | | | | | | |
| | | 4 | 58,9 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 266 | 284 | 20,0 | 7,0 | 328 | 1,21E-7 | c |
| | | 2 | (229) | | | | | | |
| | | 3 | 267 | | | | | | |
| | | 4 | 301 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 739 | 796 | 49,0 | 6,2 | | | b |
| | | 2 | 825 | | | | | | |
| | | 3 | 823 | | | | | | |
| | | 4 | (683) | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 2710 | 2737 | 166 | 6,1 | | | a |
| | | 2 | 2763 | | | | | | |
| | | 3 | 2453 | | | | | | |
| | | 4 | 2937 | | | | | | |

C.M : Comparación de medias.

¥ : Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

ϵ : Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 4: Concentración de fósforo tratamiento crónico.

| Tratamiento Crónico | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|------|-------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 1,75 | 1,89 | 0,131 | 6,9 | 4,9 | 0,047 | b |
| | | 2 | 2,00 | | | | | | |
| | | 3 | (2,35) | | | | | | |
| | | 4 | 1,94 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 1,88 | 2,34 | 0,116 | 5,6 | | | a |
| | | 2 | 2,29 | | | | | | |
| | | 3 | 2,47 | | | | | | |
| | | 4 | 2,25 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (2,53) | 1,84 | 0,181 | 9,8 | | | b |
| | | 2 | 1,82 | | | | | | |
| | | 3 | 1,67 | | | | | | |
| | | 4 | 2,03 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | (3,15) | 2,73 | 0,156 | 5,7 | 6,51 | 0,025 | b |
| | | 2 | 2,86 | | | | | | |
| | | 3 | 2,56 | | | | | | |
| | | 4 | 2,78 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 3,12 | 3,06 | 0,111 | 3,6 | | | a |
| | | 2 | 3,14 | | | | | | |
| | | 3 | (2,80) | | | | | | |
| | | 4 | 2,94 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 3,13 | 3,20 | 0,175 | 5,5 | | | a |
| | | 2 | 3,29 | | | | | | |
| | | 3 | 2,99 | | | | | | |
| | | 4 | 3,39 | | | | | | |

C.M : Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 5: Concentración de fósforo tratamiento agudo.

| Tratamiento Agudo | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|--------|---------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 1,73 | 1,59 | 0,121 | 7,6 | 1,26 | 0,33 | a |
| | | 2 | 1,81 | | | | | | |
| | | 3 | 1,53 | | | | | | |
| | | 4 | 1,51 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 1,61 | 1,66 | 0,044 | 2,6 | | | a |
| | | 2 | 1,70 | | | | | | |
| | | 3 | 1,85 | | | | | | |
| | | 4 | 1,68 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (1,49) | 1,76 | 0,089 | 5,1 | | | a |
| | | 2 | 1,66 | | | | | | |
| | | 3 | 1,84 | | | | | | |
| | | 4 | 1,79 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 2,09 | 2,20 | 0,129 | 5,9 | 129,06 | 2,99E-6 | b |
| | | 2 | 2,18 | | | | | | |
| | | 3 | 2,34 | | | | | | |
| | | 4 | (1,87) | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (2,69) | 2,44 | 0,077 | 3,2 | | | b |
| | | 2 | 2,37 | | | | | | |
| | | 3 | 2,43 | | | | | | |
| | | 4 | 2,52 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 4,86 | 4,55 | 0,335 | 7,4 | | | a |
| | | 2 | 4,29 | | | | | | |
| | | 3 | 4,82 | | | | | | |
| | | 4 | 4,27 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 6: Concentración de potasio tratamiento crónico.

| Tratamiento Crónico | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|------|------|-------|---------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | (73,7) | 84,3 | 1,24 | 1,5 | 154,1 | 6,96E-6 | a |
| | | 2 | 84,9 | | | | | | |
| | | 3 | 85,1 | | | | | | |
| | | 4 | 82,9 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 70,6 | 71,5 | 2,39 | 3,3 | | | b |
| | | 2 | 69,8 | | | | | | |
| | | 3 | (80,2) | | | | | | |
| | | 4 | 74,2 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 59,2 | 58,3 | 1,60 | 2,7 | | | c |
| | | 2 | 57,0 | | | | | | |
| | | 3 | 60,1 | | | | | | |
| | | 4 | (56,9) | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 89,0 | 82,2 | 3,12 | 3,8 | 256,5 | 2,83E-7 | a |
| | | 2 | 85,7 | | | | | | |
| | | 3 | 80,0 | | | | | | |
| | | 4 | 80,8 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 61,5 | 60,6 | 1,71 | 2,8 | | | b |
| | | 2 | (57,5) | | | | | | |
| | | 3 | 61,7 | | | | | | |
| | | 4 | 58,6 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (29,1) | 31,8 | 1,34 | 4,2 | | | c |
| | | 2 | 30,2 | | | | | | |
| | | 3 | 32,5 | | | | | | |
| | | 4 | 32,5 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 7: Concentración de potasio tratamiento agudo.

| Tratamiento Agudo | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|------------------------------------|-----------|------|------|-------|---------|------------------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | (80,9) | 65,0 | 3,06 | 4,7 | 0,196 | 0,83 | a |
| | | 2 | 66,7 | | | | | | |
| | | 3 | 66,8 | | | | | | |
| | | 4 | 61,5 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (52,8) | 66,6 | 3,72 | 5,6 | | | a |
| | | 2 | 63,5 | | | | | | |
| | | 3 | 70,7 | | | | | | |
| | | 4 | 65,6 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 62,1 | 65,4 | 2,92 | 4,5 | | | a |
| | | 2 | (58,2) | | | | | | |
| | | 3 | 67,5 | | | | | | |
| | | 4 | 66,7 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 62,9 | 65,1 | 3,38 | 5,2 | 384,2 | 4,65E-7 | a |
| | | 2 | 63,5 | | | | | | |
| | | 3 | (72,3) | | | | | | |
| | | 4 | 69,0 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 24,4 | 25,1 | 0,77 | 3,1 | | | b |
| | | 2 | (21,9) | | | | | | |
| | | 3 | 24,9 | | | | | | |
| | | 4 | 25,9 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 25,4 | 25,6 | 0,73 | 2,9 | | | b |
| | | 2 | 24,9 | | | | | | |
| | | 3 | (30,0) | | | | | | |
| | | 4 | 26,3 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥ : Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£ : Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 8: Concentración de Calcio tratamiento crónico.

| Tratamiento Crónico | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|------|-------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 27,7 | 26,3 | 1,39 | 5,3 | 12,1 | 0,008 | b |
| | | 2 | 26,3 | | | | | | |
| | | 3 | (29,8) | | | | | | |
| | | 4 | 24,9 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 28,6 | 30,6 | 1,54 | 5,3 | | | b |
| | | 2 | 30,8 | | | | | | |
| | | 3 | (34,5) | | | | | | |
| | | 4 | 27,8 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 31,9 | 31,7 | 1,04 | 3,3 | | | a |
| | | 2 | (29,6) | | | | | | |
| | | 3 | 30,6 | | | | | | |
| | | 4 | 32,6 | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 14,3 | 15,0 | 0,965 | 6,4 | 1,58 | 0,28 | a |
| | | 2 | (12,0) | | | | | | |
| | | 3 | 14,5 | | | | | | |
| | | 4 | 16,1 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 14,5 | 15,2 | 0,714 | 4,7 | | | a |
| | | 2 | (17,8) | | | | | | |
| | | 3 | 15,9 | | | | | | |
| | | 4 | 15,2 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 16,4 | 16,2 | 1,09 | 6,7 | | | a |
| | | 2 | (23,0) | | | | | | |
| | | 3 | 15,1 | | | | | | |
| | | 4 | 17,2 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥ : Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 9: Concentración de Calcio tratamiento agudo.

| Tratamiento agudo | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|------|-------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 28,1 | 28,5 | 0,217 | 0,8 | 8,21 | 0,01 | a |
| | | 2 | 29,5 | | | | | | |
| | | 3 | 28,5 | | | | | | |
| | | 4 | 28,5 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (29,1) | 26,2 | 0,674 | 2,6 | | | b |
| | | 2 | 26,5 | | | | | | |
| | | 3 | 25,5 | | | | | | |
| | | 4 | 26,7 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 23,6 | 25,6 | 1,71 | 6,7 | | | b |
| | | 2 | 26,6 | | | | | | |
| | | 3 | 26,6 | | | | | | |
| | | 4 | (33,1) | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 13,5 | 13,1 | 0,356 | 2,7 | 13,6 | 0,006 | b |
| | | 2 | 12,9 | | | | | | |
| | | 3 | 12,8 | | | | | | |
| | | 4 | (15,4) | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (13,6) | 19,4 | 2,38 | 12,2 | | | a |
| | | 2 | 17,8 | | | | | | |
| | | 3 | 22,1 | | | | | | |
| | | 4 | 18,3 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (22,5) | 18,3 | 1,39 | 7,6 | | | a |
| | | 2 | 16,7 | | | | | | |
| | | 3 | 19,2 | | | | | | |
| | | 4 | 18,9 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 10: Concentración de magnesio tratamiento crónico.

| Tratamiento Crónico | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---------------------------|-----------|-------|------|-------|---------|---------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 4,81 | 4,73 | 0,067 | 1,4 | 109 | 0,00002 | a |
| | | 2 | (4,86) | | | | | | |
| | | 3 | 4,68 | | | | | | |
| | | 4 | 4,72 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 4,03 | 4,06 | 0,155 | 3,8 | | | b |
| | | 2 | 3,92 | | | | | | |
| | | 3 | (4,47) | | | | | | |
| | | 4 | 4,22 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 3,53 | 3,55 | 0,047 | 1,3 | | | c |
| | | 2 | 3,54 | | | | | | |
| | | 3 | 3,61 | | | | | | |
| | | 4 | (4,08) | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 3,34 | 3,31 | 0,041 | 1,2 | 228,7 | 8,73E-8 | a |
| | | 2 | 3,26 | | | | | | |
| | | 3 | 3,17 | | | | | | |
| | | 4 | 3,32 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 3,22 | 3,20 | 0,024 | 0,7 | | | b |
| | | 2 | 3,18 | | | | | | |
| | | 3 | 3,18 | | | | | | |
| | | 4 | 3,22 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 2,83 | 2,81 | 0,045 | 1,6 | | | c |
| | | 2 | (3,56) | | | | | | |
| | | 3 | 2,76 | | | | | | |
| | | 4 | 2,84 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 11: Concentración de magnesio tratamiento agudo.

| Tratamiento Agudo | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|------------------------------------|-----------|-------|------|-------|--------|------------------|
| Parte de la planta | Tratamiento | R | Conc mat vegetal (mg/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ |
| Parte aérea | control | 1 | 4,39 | 4,44 | 0,117 | 2,6 | 7,35 | 0,024 | a |
| | | 2 | (4,73) | | | | | | |
| | | 3 | 4,57 | | | | | | |
| | | 4 | 4,35 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 4,18 | 4,02 | 0,147 | 3,7 | | | b |
| | | 2 | 3,97 | | | | | | |
| | | 3 | 3,90 | | | | | | |
| | | 4 | (4,59) | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 4,04 | 4,12 | 0,140 | 3,4 | | | b |
| | | 2 | 4,04 | | | | | | |
| | | 3 | 4,28 | | | | | | |
| | | 4 | (4,39) | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 2,97 | 3,20 | 0,065 | 2,0 | 40,19 | 0,0001 | a |
| | | 2 | 3,22 | | | | | | |
| | | 3 | 3,13 | | | | | | |
| | | 4 | 3,25 | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 2,76 | 3,02 | 0,245 | 8,1 | | | a |
| | | 2 | (2,62) | | | | | | |
| | | 3 | 3,24 | | | | | | |
| | | 4 | 3,06 | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (2,55) | 2,31 | 0,010 | 0,4 | | | b |
| | | 2 | 2,31 | | | | | | |
| | | 3 | 2,31 | | | | | | |
| | | 4 | 2,29 | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥ : Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£ : Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 12: concentración de GSH en parte Aérea y Raíz para tratamiento crónico

| Parte de la planta | Tratamiento | R | GSH | | | | | | GSSG | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|-------------------------------|-----------|------|------|-------|---------|---------|-------------------------------|-----------|------|------|-------|----------|---------|----------|----------|----------|---|
| | | | Conc mat vegetal (nmoles/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ | Conc mat vegetal (nmoles/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ | | | | |
| Parte aérea | control | 1 | 697 | 657 | 36,8 | 5,6 | 3,31 | 0,11 | a | 375 | 459 | 113 | 24,7 | 5,06 | 0,051 | b | | | | |
| | | 2 | 650 | | | | | | | 413 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | (946) | | | | | | | (777) | | | | | | | | | | |
| | | 4 | 625 | | | | | | | 587 | | | | | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 705 | 628 | 75,4 | 12,0 | | | a | 660 | 632 | 23,1 | 3,7 | | | | 5,06 | 0,051 | a | |
| | | 2 | 555 | | | | | | | 615 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | (888) | | | | | | | 621 | | | | | | | | | | |
| | | 4 | 624 | | | | | | | (487) | | | | | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 856 | 763 | 81,6 | 10,7 | | | a | 530 | 538 | 7,28 | 1,4 | | | | 174,4 | 4,83 E-6 | b | |
| | | 2 | 732 | | | | | | | 542 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | (559) | | | | | | | (641) | | | | | | | | | | |
| | | 4 | 701 | | | | | | | 543 | | | | | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 1710 | 1668 | 21,3 | 2,0 | 484,2 | 2,34e-7 | a | 82 | 87,7 | 13,3 | 15,2 | 174,4 | 4,83 E-6 | b | | | | |
| | | 2 | 1654 | | | | | | | 78 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | 1675 | | | | | | | 103 | | | | | | | | | | |
| | | 4 | (1632) | | | | | | | (28) | | | | | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 1248 | 1182 | 97,0 | 8,2 | | | b | (176) | 34,6 | 7,94 | 23,0 | | | 174,4 | | | 4,83 E-6 | c |
| | | 2 | 1071 | | | | | | | 28 | | | | | | | | | | |
| | | 3 | 1223 | | | | | | | 43 | | | | | | | | | | |
| | | 4 | (950) | | | | | | | 32 | | | | | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 216 | 227 | 12,1 | 5,3 | | | c | 266 | 244 | 19,5 | 8,0 | | | 174,4 | 4,83 E-6 | a | | |
| | | 2 | 226 | | | | | | | (276) | | | | | | | | | | |
| | | 3 | 240 | | | | | | | 230 | | | | | | | | | | |
| | | 4 | (358) | | | | | | | 236 | | | | | | | | | | |

C.M: Comparación de medias.

¥ : Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico.

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$.

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición.

Tabla 13: concentración de GSH y GSSG en parte Aérea y Raíz para tratamiento Agudo.

| Parte de la planta | Tratamiento | R | GSH | | | | | | GSSG | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|-------------------------------|-----------|-------|------|------|-------|---------|-------------------------------|-----------|------|------|-----|------|---------|------|----|
| | | | Conc mat vegetal (nmoles/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ | Conc mat vegetal (nmoles/g) ¥ | \bar{x} | D.E | Cv % | F | P | C. M. £ | | |
| Parte aérea | control | 1 | 588 | 578 | 28,6 | 5,0 | 16,5 | 0,001 | a | 371 | 363 | 23,4 | 6,5 | 3,4 | 0,10 | a | | |
| | | 2 | (644) | | | | | | | (328) | | | | | | | | |
| | | 3 | 545 | | | | | | | 336 | | | | | | | | |
| | | 4 | 599 | | | | | | | 380 | | | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | 369 | 405 | 34,5 | 8,5 | | | b | 401 | 350 | 59,2 | 16,9 | | | 5,7 | 0,04 | ab |
| | | 2 | 438 | | | | | | | (173) | | | | | | | | |
| | | 3 | 430 | | | | | | | 364 | | | | | | | | |
| | | 4 | 381 | | | | | | | 285 | | | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | 408 | 401 | 60,8 | 15,2 | | | b | (90) | 256 | 69,0 | 26,9 | | | | | b |
| | | 2 | 347 | | | | | | | 261 | | | | | | | | |
| | | 3 | 365 | | | | | | | 185 | | | | | | | | |
| | | 4 | 483 | | | | | | | 323 | | | | | | | | |
| Raíz | control | 1 | 1228 | 1487 | 264,7 | 17,8 | 20,2 | 0,002 | a | 337 | 358 | 20,5 | 5,7 | 5,7 | 0,04 | | | a |
| | | 2 | 1757 | | | | | | | 378 | | | | | | | | |
| | | 3 | (2246) | | | | | | | 358 | | | | | | | | |
| | | 4 | 1477 | | | | | | | (435) | | | | | | | | |
| | Nivel bajo | 1 | (621) | 842 | 34,0 | 4,0 | | | b | 185 | 273 | 82,9 | 30,4 | | | ab | | |
| | | 2 | 873 | | | | | | | (446) | | | | | | | | |
| | | 3 | 849 | | | | | | | 284 | | | | | | | | |
| | | 4 | 806 | | | | | | | 350 | | | | | | | | |
| | Nivel alto | 1 | (567) | 698 | 86,5 | 12,4 | | | c | 205 | 217 | 23,8 | 10,9 | | | b | | |
| | | 2 | 759 | | | | | | | 245 | | | | | | | | |
| | | 3 | 599 | | | | | | | 203 | | | | | | | | |
| | | 4 | 736 | | | | | | | (284) | | | | | | | | |

C.M: Comparación de media

¥: Los valores en paréntesis no fueron considerados en el análisis estadístico

£: Las letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias con $p < 0,05$

\bar{x} : Promedio.

R: Repetición